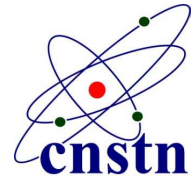




Université Tunis El Manar
Faculté des Sciences de Tunis



MASTERE

Microbiologie

Isolement et caractérisation biochimique et moléculaire de *Listeria monocytogenes* à partir des denrées alimentaires

Présenté par
Salma HELEL

Soutenu le 20 Octobre 2008

Jury :

Président : Mr. Ali RAIES

Membres : Mr. Abdellatif BOUDABOUS

Mr. Ameer CHERIF

Mme. Fatma HMAIED

Mme. Insaf BARKALLAH

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire du CNSTN et à la Plateforme Biopuces du Genopole, INSA Toulouse.

Année universitaire 2007-2008

Sommaire

Introduction générale	1
1. Historique	1
2. Taxonomie du genre <i>Listeria</i>	2
2-1. Taxonomie.....	2
2-2. Caractéristiques morphologiques	2
2-3. Caractères biochimiques.....	3
2-4. Caractères cultureux.....	4
2-5. Caractéristiques antigéniques	5
2-5-1. Sérotypie	5
2-5-2. Lysotypie	6
3. Physiologie de <i>Listeria monocytogenes</i>	7
3-1. Température et croissance	7
3-2. pH (potentiel hydrogène) et croissance	7
3-3. Activité de l'eau (a_w) et croissance.....	7
3-4. Pression osmotique (NaCl).....	7
4. <i>Listeria monocytogenes</i> et les produits alimentaires	7
4-1. Lait et produits laitiers.....	8
4-2. Viandes et produits carnés.....	9
4-3. Poissons et produits de la pêche	9
4-4. Oeufs et ovoproduits.....	10
4-5. Produits d'origine végétale.....	10
5. Listériose humaine.....	11
5-1. Épidémiologie.....	11
5-2. Physiopathologie	12
5-2-1. Physiopathogénie	12
5-2-1-1 Dose minimum infectante.....	12
5-2-1-2 Les facteurs de pathogénicité bactériens.....	15
5-2-1-2-1 Variations de la virulence	15
5-2-1-2-2 Cycle intracellulaire et facteurs de virulence	15
Objectifs du travail.....	18
Matériels et méthodes.....	19
1. Souches bactériennes :.....	19
2. Isolement des souches du genre <i>Listeria</i>	20
3. Purification et conservation des souches du genre <i>Listeria</i> :.....	22
4. Caractérisation biochimique des souches isolées:	22
4-1. Le test Gram	22
4-2. Le test catalase	23
4-3. Le test oxydase :.....	23
4-4. Le test mobilité.....	23
4-5. Test d'hémolyse.....	23
4-6. Test Camp	24
4-7. Galerie Api <i>Listeria</i>	25
5. Caractérisation moléculaire	26

5-1. Amplification de l'ADN par PCR : polymerase chain reaction :.....	26
5-1-1. Extraction de l'ADN total par ébullition :	26
5-1-2. L'amplification par PCR :	26
5-2. Analyse électrophorétique :	27
5-3. Analyses statistiques	28
6. Identification par la technologie de biopuces	28
6-1. Principe	28
6-2. Conception des sondes :	29
6-3. Extraction d'ADN et amplification par PCR	30
6-4 Hybridation et système d'acquisition d'image ou scanner.....	30
Résultats et Discussion	32
CHAPITRE 1 : Isolement et identification biochimique des souches du genre <i>Listeria</i>	33
1. Isolement	34
2. Identification morphologique et biochimique des souches isolées	34
2-1. Identification des souches isolées par des tests classiques.....	34
2-2. Identification des souches isolées par le système API.....	36
2-3. Analyse numérique.....	39
CHAPITRE 2 : Caractérisation moléculaire des souches du genre <i>Listeria</i>	41
1. Détection des gènes de virulence des isolats du genre <i>Listeria</i> par amplifications géniques PCR	42
1-1. Détection du gène <i>iap</i> :	42
1-2. Détection du gène <i>hly</i>	44
1-3. Détection du gène <i>plcA</i>	44
1-4. Détection du gène <i>plcB</i>	46
2. Identification par biopuces	47
Discussion	51
1. Incidence de <i>Listeria sp.</i> et <i>L. monocytogenes</i> dans les aliments tunisiens.....	51
2. Identification biochimique des souches du genre <i>Listeria</i>	52
3. Identification des souches du genre <i>Listeria</i> d'origine clinique et alimentaire au stade de l'espèce par des méthodes moléculaires	53
Conclusion générale.....	54
Bibliographie.....	57
Annexe	64

Dédicaces

*A mes parents
En témoignage de leur amour et soutien
Que dieu les préserve en bonne santé
Et leur accorde longue vie*

A mon frère et ma sœur

*A ma belle famille
A toute ma famille et mes amis*

*A tout ceux qui de prés ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail,
en guise de reconnaissance.*

Remerciements

Monsieur TRABELSI Adel, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, Directeur du Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Nous le remercions de nous avoir permis de réaliser ce travail au CNSTN.

Madame BARKALLAH Insaf, chef d'unité de Microbiologie et Biologie Moléculaire au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Promotrice de ce travail. Nous la remercions de nous avoir permis de réaliser ce travail dans l'unité qu'elle dirige, pour son aide précieuse.

Madame HMAIED Fatma, Maître-assistante à l'unité de Microbiologie et Biologie Moléculaire au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Nous la remercions d'avoir guidé nos premiers pas dans le domaine de la recherche, de son assistance pour la réalisation de ce travail et de sa constante disponibilité.

Monsieur BOUDABOUS Abedalatif, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis. Nous le remercions d'avoir veillé à la réalisation de ce travail. Nous avons pu apprécier la richesse de son savoir, son sens critique et l'intérêt constant qu'il a manifesté.

Je voudrais aussi exprimer mes sentiments de profonde gratitude à Monsieur RAIES Ali Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a fait l'honneur d'avoir bien voulu présider le jury d'évaluation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Mes remerciements vont également à Monsieur CHERIF Ameer, maître de conférence à l'ISBST pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame KECHRID Amel, chef du Service de Laboratoire de Microbiologie à l'Hôpital d'enfants de Tunis. Nous la remercions de nous avoir aimablement fourni les isolats de *Listeria*.

Madame SMAOUI Hanen, Assistante au Laboratoire de Microbiologie à l'Hôpital d'enfants de Tunis. Nous la remercions de nous avoir aimablement fourni les isolats de *Listeria*.

Monsieur JEAN MARIE François, Directeur de la Plateforme Biopuces du Genopole, INSA Toulouse et Madame LE BERRE Véronique, Responsable technique de la Plateforme Biopuces du Genopole, INSA Toulouse. Nous les remercions pour nous avoir permis de réaliser un stage dans le service.

Aux membres de l'Unité de Microbiologie et Biologie Moléculaire au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires. Nous les remercions pour leur aide et leur chaleur amicale.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
 a_w : Activité de l'eau
BET : Bromure d'éthidium
DIM : Différenciation *Listeria innocua* / *Listeria monocytogenes*
dNTP : Désoxyribonucléosides triphosphate
EDTA : Ethylène diamine tetracétique acide
g : Gramme
HACCP : Hazard Analysis Control Critical Point
kDa : Kilo Dalton
l : Litre
L. : *Listeria*
LCR : Liquide céphalorachidien
LiCl : Chlorure de Lithium
LLO : Listériolysine
M : Molaire
min : Minute
ml : Millilitre
mV : Millivolt
NCTC : National Collection of Type Culture
nm : Nano Molaire
pb : Paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel hydrogène
TBE : Tris Borate EDTA
Tr/min : tours par minute
UV : Ultrat-Violet
V : volt
°C : Degré Celsius
 μ l : Microlitre

Introduction

Introduction générale

Au cours des dernières décennies, l'incidence croissante des maladies d'origine alimentaire dans le monde et en particulier en Tunisie, semble liée à la présence de microorganismes dans les aliments. Ces maladies constituent pourtant le problème de santé publique le plus répandu et génèrent un fardeau social et économique représentant ainsi une source de souffrances humaines.

La *Listeria spp.* est désormais, bien connue, notamment sa forme pathogène, *L. monocytogenes*. Elle est considérée comme émergente (Pagan et al., 1997) car le rôle des aliments dans sa transmission n'a été reconnu que récemment. Cette bactérie est particulièrement résistante. Elle vit et se multiplie dans des milieux salés, sucrés, acides, à faible teneur en eau ou en O₂ et à faible température, elle a la caractéristique de survivre et de résister aux conditions hostiles (Hugas et al., 1998).

Malgré une augmentation constante de la prévalence des maladies transmises par les aliments, l'importance de la salubrité des aliments n'est pas appréciée à sa juste valeur en Tunisie. On peut s'attendre à un accroissement du nombre de pathogènes réémergents ou récemment identifiés à cause des pratiques industrielles et commerciales mises en oeuvre dans notre pays. Ainsi il est important d'utiliser des moyens sûrs d'identification de l'espèce *L. monocytogenes* afin de pouvoir la détecter dans les produits alimentaires et la distinguer des autres espèces phylogénétiquement proches. De plus, il serait intéressant de réaliser une caractérisation sur le plan biochimique et moléculaire afin de mieux connaître les souches de *L. monocytogenes* impliquées dans les contaminations alimentaires et mieux situer leur degré de virulence et de pathogénicité.

1. Historique

L. monocytogenes, espèce type du genre *Listeria*, doit son nom à la mémoire du Docteur John Lister. Elle est caractérisée par une élévation anormale du taux de monocytes d'où son nom de *monocytogenes*. Décrite en 1926 par Murray et ses collaborateurs lors d'une épizootie chez des lapins et des cobayes qui présentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie. Ils lui donnèrent alors le nom de "*Bacterium monocytogenes*" puis renommée "*Listerella hepatolytica*" par Lister en 1927. En 1940, Lister a proposé la nomenclature de *L. monocytogenes* qui sera retenue par les *Approved Lists of Bacterial Names* (Euzèby et Tindall, 2004).

2. Taxonomie du genre *Listeria*

2-1. Taxonomie

Listeria est un petit bacille à Gram positif qui a longtemps été considéré comme une bactérie corynéforme; il est actuellement admis que les bactéries de ce genre appartiennent à la branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* (Avril ,2000 ; Rocourt ,1999).

Selon le Bergey's Manuel (2001): le genre *Listeria* fait partie de la famille des Listeriaceae, l'ordre des Bacillales, Classe III des Bacilli et du phylum III des Firmicutes.

Dés 1966, la recherche de plus en plus fréquente de *Listeria* dans des niches écologiques variées a conduit à l'isolement de souches atypiques dont l'étude taxonomique a montré qu'il s'agit bien de nouvelles espèces. Compte tenu des travaux de J. Rocourt (Rocourt ,1999), on admet aujourd'hui, que le genre *Listeria* se définit sur le plan de la taxonomie par : (i) un G + C % DNA compris entre 36 et 46 %, (ii) un peptidoglycane branché en variation A1 Gamma associé à un type d'acide teichoïque (polyribitol – phosphate),(iii) la présence d'acides lipoteichoïques, (iv) l'absence d'acide mycolique et MK7, comme principal isoprenoid quinone. (Catteau ,1991 ; Avril, 2000).

Actuellement 6 espèces sont reconnues dans ce genre, en plus de *Listeria monocytogenes*. *Listeria grayi* : découverte en 1966 par Larsen et Seeliger à partir d'une coproculture chez un chinchilla ; cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol (Berche, 1999; Rocourt, 1999; Rocourt et al., 2003). *Listeria murrayi* : découverte en 1971 par Welshimer et Meredith à partir d'une végétation ; une fois encore cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol et la réduction des nitrates (Rocourt, 1999; Rocourt et al., 2003). *Listeria ivanovii* : qui a été découverte en 1984 par le microbiologiste bulgare Ivanov lors d'avortements chez des brebis dans une ferme; cette souche s'est caractérisée par une forte hémolyse, montrant qu'il s'agit d'un germe pathogène (Berche, 1999). *Listeria innocua* : qui a été découverte en 1981 par Seeliger à partir de l'environnement et de l'intestin de l'homme et des animaux; cette souche est non hémolytique montrant qu'il s'agit d'un germe non pathogène (Rocourt, 1999), et *Listeria Seeligeri* et *Listeria welshimeri* qui ont été mises en évidence en 1982, lors des hybridations ADN / ADN (Rocourt, 1999).

2-2. Caractéristiques morphologiques

Les cellules de *Listeria* sont des bâtonnets Gram+ courts et réguliers, de 0,4-0,5 µm de diamètre et 0,5-2 µm de longueur, avec des extrémités arrondies. Quelques cellules peuvent

être incurvées. La longueur de la cellule n'est pas corrélée avec la cinétique de croissance (Zaika et Fanelli, 2003). Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînettes. Bien qu'une capsule a été observée dans des conditions particulières de culture, certains microbiologistes pensent que *L. monocytogenes* devrait être considérée comme une espèce bactérienne non capsulée. La bactérie ne forme pas de spores. Elle est mobile quand elle est cultivée à 20-25°C grâce à la présence des flagelles péritriches, et immobile ou faiblement mobile à 37°C.

2-3. Caractères biochimiques

La caractérisation biochimique de *L. monocytogenes* fait appel aux méthodes classiques d'identification bactérienne: catalase+, oxydase-, β-hémolyse sur gélose au sang, D-xylose-, D-mannitol-, L-rhamnose+, Citrate-, α-méthyl-D-mannoside+. Cette bactérie est privée de nitrate réductase, elle fermente le glucose sans production de gaz, elle hydrolyse l'esculine, elle ne produit pas d'indole, ni de H₂S. Elle est uréase- et non protéolytique (gélatine-), phosphatase alcaline+. L'arabinose, le lactose, le mélézitose, le saccharose et la dextrine sont tardivement fermentés ou négatifs. Le xylose, raffinose, inositol, dulcitol, mannitol, adonitol ne sont pas fermentés. *Listeria* donne des résultats positifs en présence de rouge de méthyle et au test Voges Proskauer. Le catabolisme du glucose emprunte la voie d'Embden-Meyrhopf. En anaérobiose, le produit terminal est l'acide lactique ; en aérobie, apparaissent le pyruvate, l'acétoïne, l'acide lactique. Les caractères distinctifs des espèces sont représentés dans le tableau 1

Tableau 1: Caractères bactériologiques différenciant les espèces de *Listeria* (Rocourt et Jacquet, 2000)

Espèces	Hémolyse	CAMP test*	CAMP test**	XYL	RHA	MDG	RIB	Man
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i> (<i>subsp ivanovii</i>)	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i> (<i>subsp londoniensis</i>)	+	-	+	+	-	variable	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	variable	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	variable	+	-	-
<i>L. Seeligeri</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	non défini	-	+

* *Staphylococcus aureus*; ** *Rhodococcus equi*; (+) réponse positive; (-) réponse négative
RHA: Rhamnose. XYL: D-xylose; RIB: Ribose; Man: Mannitol; MDG: α méthyl D.mannoside

(i) Sensibilité des *Listeria* aux antibiotiques

La sensibilité de *L. monocytogenes* aux agents antimicrobiens est assez stable depuis plusieurs années. In vitro, les bactéries appartenant au genre *Listeria* sont généralement sensibles à de nombreux antibiotiques nous citons: Pénicilline G, Ampicilline, Amoxicilline, Azlocilline, Imipénème, Gentamicine, Sisomicine, Nétilmicine, Amikacine, Kanamycine, Streptomycine, Erythromycine, Clarithromycine, Roxithromycine, Tyrothricine, Vancomycine, Teicoplanine, Daptomycine, Triméthoprim-sulfaméthoxazole, Rifampicine, Tétracyclines. Une résistance naturelle est notée vis-à-vis des Céphalosporines (notamment vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération à large spectre comme la Céfotaxime ou la Céfépime), Aztréonam, Acide nalidixique, Ofloxacin, Fluoroquinolones récentes, Fosfomycine. La sensibilité est intermédiaire pour la Céfalotine, Ciprofloxacine, Chloramphénicol, Clindamycine. Quelques rares souches sont capables d'acquérir une résistance à la Streptomycine, à la Kanamycine, à la Gentamicine, au Triméthoprim, aux Tétracyclines ou à la Rifampicine. L'émergence des souches résistantes résulte généralement de l'acquisition de plasmides portant les gènes de résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, l'utilisation anarchique des antibiotiques aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, serait responsable de l'émergence de nombreuses souches de *Listeria* multi résistantes.

La résistance à la Tétracycline est la résistance acquise la plus fréquemment observée chez *L. monocytogenes* aussi bien chez des souches cliniques que chez des souches isolées des aliments et de l'environnement (Euzéby, 2000).

2-4. Caractères culturels

Listeria est aérobie microaérophile. Les cultures sont plus abondantes sous une tension réduite en oxygène (O₂) (Doyle, 1988) et anaérobie facultative. Elle est mésophile mais avec un comportement souvent psychrotrophe (Djenane *et al.*, 2006). Les colonies de *Listeria* (24-48 h) sur gélose nutritive ont un diamètre de 0,5-1,5 mm ; elles sont arrondies, translucides en goutte de rosée, faiblement convexes à marge entière. Les colonies paraissent grises bleutées par illumination normale et bleu vert par illumination oblique. Les colonies, parfois gluante, s'émulsifient facilement et peuvent laisser une trace de gélose. Les cultures plus âgées (3-7 jours) sont plus larges (3-5 mm de diamètre) avec un centre plus opaque et des formes "rough" peuvent apparaître. Quelques espèces sont β-hémolytiques sur gélose au sang (Larpen, 2004).

Listeria, en gélose molle dans un tube, inoculée par piqûre centrale et incubée à 20°C, a une croissance visible sur toute la hauteur du tube, avec un trouble plus intense à quelques millimètres au-dessous de la surface du milieu ; la mobilité se traduit par une image en parapluie caractéristique.

2-5. Caractéristiques antigéniques

2-5-1. Sérotypie

Le genre *Listeria* comprend 15 antigènes somatiques (I à XV), et 5 antigènes flagellaires (A à E). Actuellement La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars (Catteau ,1991; Rocourt, 1997; Larpent, 2000; Lawrence et al., 2001; Rocourt, 2002; Larpent, 2004). Les différents caractères antigéniques des sérovars de *Listeria* sont consignés dans le tableau 2 (Catteau, 1991; Larpent, 2000; Lawrence et al., 2001; Rocourt, 2002; Larpent, 2004). *L. monocytogenes* sérovar 5, nommée depuis 1984 *L. ivanovii*, n'est jamais isolée des aliments et elle est peu retrouvée en pathologie humaine, par contre elle est surtout rencontrée chez les ruminants et plus particulièrement chez le mouton (Broadent, 1972). Le diagnostic sérologique est réalisé par la détection des anticorps anti-listériolysine O qui représente la technique la plus prometteuse.

Tableau 2 : Caractères antigéniques des sérovars de *Listeria* (Larpent, 2000; Lawrence et al., 2001; Larpent, 2004).

Espèces	Sérovars	Antigènes Somatiques	Antigènes Flagellaires
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B D
	3a	II (III) IV	A B
	3b	II (III) IV (XII XIII)	A B C
	3c	II (III) IV (XII XIII)	B D
	4a	(III) (V) VIII IX	A B C
	4ab	(III) V VI VIII IX X	A B C
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	4c	(III) V VI (VIII) IX	A B C
	7	(III) XII XIII	A B C
	<i>Listeria ivanovii</i>	5	(III) V VI (VIII) X
<i>Listeria innocua</i>	6a	(III) V (VI) (VII) (IX)	A B C
	6b	XV	A B C
	4ab	(III) (V) (VI) (VII) IX X XI (III) V VI VII IX X	A B C
<i>Listeria welshimeri</i>	1/2b	I II (III)	A B C
	4c	(III) V VII	
	6a	(III) V (VI) (VII) (IX)	
	6b	XV (III) (VII) IX X	
<i>Listeria seeligeri</i>	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B C D
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	6b	(III) (V) (VI) (VII) IX X	A B C
<i>Listeria grayi subsp. grayi</i>		(III) XII	E
		XIV (IV)	
<i>Listeria grayi subsp. grayi</i>		(V) XII	E
		XIV	

2-5-2. Lysotypie

La lysotypie est développée pour pallier les insuffisances du sérotypage. Elle permet de répertorier des bactéries selon leurs sensibilités à divers phages. Actuellement, 219 phages sont répertoriés mais seulement 55 sont spécifiques du genre *Listeria* et ils lysent toutes les espèces du genre, sauf pour *L. grayi*.

3. Physiologie de *Listeria monocytogenes*

3-1. Température et croissance

La température optimale de croissance de *L. monocytogenes* est comprise entre 30 et 37°C. La bactérie peut même se développer à des températures comprises entre -2°C et +45°C (Augustin, 1999). Si un taux de croissance positif est détecté à des températures inférieures à 0°C, celui-ci est extrêmement faible, et la croissance n'est observable que pour de longues périodes d'incubation.

3-2. pH (potentiel hydrogène) et croissance

L. monocytogenes se multiplie entre pH 4,6 et pH 9,6 avec un optimum à pH 7,1 à l'optimum thermique (Pearson et Marth, 1990).

Elle peut toutefois survivre pendant de très longues périodes à des pH proches de 4 comme c'est le cas dans les ensilages de maïs sans que l'on connaisse l'origine génétique ou adaptative du phénomène (Phan-Thanh et Montagne, 1998; Carrasco et al., 2006). Cette résistance pourrait correspondre à une adaptation croisée induite par un stress homologue (O'Driscoll et al., 1996) ou hétérologue (Lou et Youssef, 1997).

3-3. Activité de l'eau (a_w) et croissance

Listeria se développe à un optimum de a_w de 0,97, mais peut se développer à 0,943. Une a_w inférieure à 0,932 ne semble pas permettre la croissance de la bactérie (Skovgaard, 1988). Cependant la bactérie survit au moins 132 jours à 4°C en milieu "Trypticase Soy Agar" avec 25% de Chlorure de Sodium (NaCl), et une a_w de 0.83. Il a été observé que *L. monocytogenes* peut survivre pendant au moins 84 jours à 4°C dans un salami fermenté dont l' a_w est de 0.79-0.86 (Johnson, 1988).

3-4. Pression osmotique (NaCl)

L. monocytogenes ne se développe pas généralement dans les solutions contenant plus de 10% à 11% de NaCl (Vasseur et al., 1999). Toutefois, des souches peuvent survivre dans des saumures de fromagerie contenant de 13 à 14% de NaCl (Farber et al., 1992).

4. *Listeria monocytogenes* et les produits alimentaires

Dans le domaine de l'agroalimentaire, il faut savoir que la contamination des produits est souvent très aléatoire. *Listeria* est un germe ubiquitaire, ce qui explique que la contamination d'un produit puisse intervenir à tous les stades de sa fabrication, de son

conditionnement, au “stockage”, à la commercialisation et même dans l’assiette du consommateur. Par leur origine et leur composition, certains aliments sont plus susceptibles que d’autres de contenir des *Listeria* (Maciel de Souza et al., 2008). Lors des principales épidémies survenues dans plusieurs pays, rapportées dans la littérature, des produits laitiers, des produits de charcuterie ou carnés, des produits de la mer et des produits végétaux ont été mis en cause.

Les *Listeria*, comme l’immense majorité des bactéries dans la nature, ne sont pas en suspension dans des liquides, mais adhérentes à des supports où elles forment des biofilms (Perni et al., 2005 ; Chae et al., 2006). Ces structures où cohabitent généralement plusieurs genres bactériens, modifient la physiologie bactérienne, favorisent les échanges du matériel génétique, améliorent la survie des bactéries face aux stress, et augmentent les possibilités de contamination des aliments. L’altération microbienne des denrées alimentaires est synonyme d’un développement microbien croissant responsable de mise hors consommation du produit à cause des changements sensoriels (couleur, odeur et texture). La pathogénie ou virulence sont définies comme un développement d’un nombre suffisant de *L. monocytogenes*, d’une manière que l’ingestion du produit peut engendrer des effets pathologiques.

Les denrées alimentaires destinés à être consommés directement sans subir une cuisson ou une autre transformation efficace, pour éliminer ou ramener à un niveau acceptable les micro-organismes dangereux, sont les plus incriminés dans les différents cas de listériose (Rocourt et al., 2003; Gibbons et al., 2006).

4-1. Lait et produits laitiers

Les contaminations par le germe *L. monocytogenes* et les pratiques à risque concernant l’industrie laitière ont été décrites (Penteado et Leitao, 2004; Perni et al., 2005; Aygun et Pehlivanlar, 2006). Selon le type de production, l’incidence de *L. monocytogenes* est plus ou moins importante et cette industrie serait particulièrement touchée du fait des procédés et des conditions de fabrication, en particulier de l’humidité ambiante, favorables à la survie et à la croissance des *L. monocytogenes*. Il serait néanmoins nécessaire de signaler que le lait cru possède son propre pouvoir de défense (Système *lactoperoxydase* antimicrobien) contre les envahisseurs microbiens.

L. monocytogenes peut être isolée à partir des fromages à pâte molle ou semi molle, à pâte persillée, à pâte pressée ou à pâte fraîche (Copes et al., 2000; Millet et al., 2006). Le comportement des *L. monocytogenes* est très variable selon les fromages (Larpen, 1997). C’est essentiellement la technologie de fabrication fromagère qui conditionne ce

comportement, compte tenu du chauffage du lait ou du caillé d'une part, et des conditions d'affinage d'autre part (durée, évolution du pH et de la température, teneur en sel et activité de l'eau). Le pH acide atteint en fin de fabrication du yaourt grâce à la fermentation lactique maîtrisée permet d'inhiber la croissance voire détruire *L. monocytogenes*. Par ailleurs, *L. monocytogenes* se développe très bien dans les mélanges pour glaces, mais sa croissance est inhibée à -18°C (Palumbo, 1991).

4-2. Viandes et produits carnés

Une augmentation constante de contaminations par *Listeria* chez les animaux de boucherie ainsi que chez les volailles a été constatée. Les risques de contamination sont augmentés avec les ensilages peu acidifiés (Davies et Board, 1998). Ces porteurs de germes peuvent facilement contaminer les carcasses et l'environnement au cours des opérations d'abattage et de transformation des viandes, ce qui explique que des *Listeria* soient souvent retrouvées dans les viandes issues de différentes espèces (Nicolas, 1993).

Il a été démontré, que lors de la découpe primaire des carcasses appartenant à différentes espèces zootechniques, les couteaux, les tapis, les tables, et autres machines sont fréquemment à l'origine de la contamination par *L. monocytogenes*. L'examen bactériologique de la contamination des surfaces démontre clairement l'origine environnementale de ces *L. monocytogenes* (Maciel de Souza et al., 2008).

L. monocytogenes peut être utilisée comme germe indicateur des conditions d'hygiène dans l'abattage dans le cadre d'un programme HACCP (Hazard Analysis Control Critical Point) (Systèmes d'analyse des risques – points critiques pour leur maîtrise) (Gobat et Jemmi, 1990). *L. monocytogenes* a été isolée dans les usines en cours de production et après les opérations de nettoyage et de désinfection. Ceci tendrait donc à prouver la persistance de ces souches sur les surfaces entartrées ou recouvertes d'un biofilm, tout en sachant qu'un apport continu de *L. monocytogenes* est réalisé par la matière première (viande crue) et entretenu ensuite sur les produits cuits par l'intermédiaire de croisements de circuits.

Des populations adaptées de *Listeria* ont été remarquées sur les viandes et les saucisses (Dykes, 2003). Dans les salamis durs, le nombre de *Listeria* diminue pendant la fermentation et la période de séchage. Cette bactérie peut être détectée après 12 semaines.

4-3. Poissons et produits de la pêche

Certains poissons et coquillages pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes* (Ben Embarek, 1994; Parihar et al., 2008). Les traitements thermiques ainsi que les techniques de

fermentations de certains produits de la mer empêchent un éventuel déclenchement d'une listériose (Notermans et Hoornstra, 2000). La fréquence de contamination des poissons est considérable pour le poisson frais (Jemmi et al., 2002). Ce niveau de contamination varie en fonction de l'origine (sauvage ou élevage), de la saison, de la technique de pêche, de la manipulation des poissons et du mode de conservation (réfrigération, congélation). *L. monocytogenes* est capable de se développer à 4°C dans du saumon fumé, des crevettes, de la chair cuite de crabe et des homards artificiellement inoculés. Cette bactérie se développe davantage dans le homard et la chair de crabe (Farber et Peterkin, 1991; Ben Embarek, 1994).

Il est à signaler que certaines pratiques de fabrication favorisent davantage la contamination de certains produits élaborés à froid citons l'exemple de la fumaison (Miettinen et al., 2001).

4-4. Oeufs et ovoproduits

De nombreuses études, réalisées ont montré que certains œufs et ovoproduits pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes*. La présence de *Listeria* dans le blanc d'œuf liquide pasteurisé durant la conservation en réfrigération a été démontrée (Muriana, 1997). *L. monocytogenes* peut facilement survivre dans les ovoproduits déshydratés maintenus à des températures comprises entre 5°C et 20°C (Brackett et Beuchat, 1991). La bactérie pourrait résister à des températures allant jusqu'à -18°C dans l'œuf liquide.

La survie de *Listeria* à 4°C, dans l'albumine, le jaune d'œuf et l'œuf entier contenant du saccharose à 25%, est significative dans tous les produits.

4-5. Produits d'origine végétale

Les légumes peuvent être un vecteur de transmission de la listériose. En effet, des légumes pollués ont été suspectés dans plusieurs épidémies de listériose humaine. La préparation, puis la transformation des matières premières en légumes prêts à l'emploi, sont des facteurs favorisant la contamination initiale ou croisée. Le lavage et la désinfection à l'eau chlorée agissent sur les cellules de *L. monocytogenes* comme sur les autres bactéries présentes sur la surface des végétaux. L'efficacité de la chloration serait diminuée par la formation de biofilms par la flore bactérienne sur la surface des feuilles qui protégeraient les cellules de *L. monocytogenes*.

La température est un facteur important de fixation de la bactérie sur les tissus végétaux (Gorski et al., 2003). L'aptitude de *L. monocytogenes* à se développer aux températures de conservation de plusieurs légumes (asperges, brocoli et chou-fleur à 4°C,

laitue à 5°C, endive et chicorée à 6,5°C) est un facteur constituant un risque de multiplication de la bactérie dans ces produits. Le comportement de *L. monocytogenes* dans les produits, varie en fonction de ceux-ci. Les carottes crues, découpées, ont un effet létal sur les *Listeria*, cet effet disparaît après broyage ou cuisson. En revanche les choux, brocoli, choux fleures, asperges, salades peuvent constituer des substrats favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* pourrait même survivre durant quatre semaines dans les fraises congelées à $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Flessa et al., 2005)

La pratique de plus en plus courante de stockage et de conservation des végétaux fermentés destinés à l'alimentation animale a ainsi vu augmenter les cas de listérioses chez ces animaux. La qualité des ensilages est d'une importance primordiale et la non maîtrise des techniques de fabrication (aérobiose, présence de terre ou stockage en semi-enterré dans les sols, pH trop élevé, broyage trop grossier des végétaux, lessivage par des pluies, mauvaise protection par des bâches abîmées) sont à l'origine de la prolifération de la bactérie.

5. Listériose humaine

La listériose est transmise par l'intermédiaire des aliments, et sa pathogénie met en jeu le passage du micro-organisme de la lumière digestive aux cellules réticuloendothéliales du foie et de la rate. La réaction immunitaire contre *Listeria* se caractérise par un effet bactéricide précoce médié par les macrophages, suivi d'une énergique réponse cellulaire. L'immunité humorale ne semble jouer aucun rôle dans la réaction à l'infection.

L'origine alimentaire de la listériose humaine s'explique aisément par certaines caractéristiques générales de *Listeria*: il s'agit en effet de bactéries extrêmement résistantes (bien qu'elles ne soient pas sporulées) aux conditions du milieu extérieur, notamment au froid, ce qui explique qu'elles soient largement répandues dans la nature.

5-1. Épidémiologie

Chez l'homme, les premiers cas de listériose ont été décrits dans les années 1960 mais il a fallu attendre les années 1979-1980 pour observer les premières endémies et mettre en évidence le rôle des aliments. Ces endémies se traduisent par de petites bouffées de moins de 20 cas ou par d'importantes endémies pouvant regrouper plusieurs centaines de cas, évoluant sur des périodes prolongées (4 ans par exemple, dans l'endémie suisse) et responsables d'une importante mortalité. Quelques exemples d'endémies sont donnés dans le Tableau 3. Outre les endémies, la transmission alimentaire est bien documentée pour un certain nombre de cas sporadiques dont on estime qu'environ 33 % ont une origine alimentaire. Les infections

nosocomiales étant très rares, il est probable qu'il existe d'autres modes de contaminations non identifiés.

Les épidémies, d'origine alimentaire sont incontestablement les plus fréquentes (Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007) et aboutissent dans 20 à 30 % des cas à une mortalité. L'incidence des listérioses humaines dans tous les pays développés a diminué depuis quelques années. Cette baisse est due à un meilleur contrôle des denrées alimentaires et à la sensibilité des populations à risque.

Tableau 3 : Exemples d'endémies et aliments associés (Rocourt et al., 1994)

Pays, régions ou villes	Nombre de cas (cas mortels)	Aliments incriminés
USA (1979)	20 (5)	Céleris crus, tomates, salades vertes ?
Nouvelle Zélande (1980)	29 (9)	Fruits de mer
Canada (1981)	41 (17)	Salade de choux (les choux avaient été cultivés dans des champs fertilisés avec du fumier provenant d'élevages de moutons dans lesquels des cas de listériose avaient été observés).
USA (1983)	49 (14)	Lait pasteurisé ?
USA (1985)	142 (48)	Fromages de type mexicain
Canton de Vaud (1983-1987)	122 (31)	Lait cru, fromages (Vacherin du Mont d'Or)
USA (1986-1987)	36 (16)	Crèmes glacées ? Salamis ? L'origine alimentaire de ces cas est douteuse.
Royaume Uni (1987-1989)	> 300 (?)	Pâtés
USA (1989)	9 (1)	Crevettes
France (1992)	279 (85)	Langues de porcs en gelée
France (1993)	39 (?)	Rillettes
France (1995)	33 (4)	Bries de Meaux
Italie (1997)	1594 (0)	Farine de maïs
France (1997)	14 (2)	Fromages à pâte molle (Pont l'évêque, Livarot)
USA (1998)	100 (20)	Saucisses de type hot-dog
Finlande (1999)	25 (6)	Beurre pasteurisé
France (1999)	3 (?)	Fromages à pâte molle (Epoisses)
France (1999)	Au moins 6 (au moins 2)	Rillettes
France (2000)	Au moins 33 (au moins 10)	Langue de porc gelée

5-2. Physiopathologie

5-2-1. Physiopathologie

La physiopathologie de l'infection à *Listeria* a été extensivement étudiée à l'aide du modèle murin, mais elle est encore incomplètement connue (McLauchlin, 1997; Vazquez et al., 2001).

5-2-1-1. Dose minimum infectante

La dose minimum infectante (DMI) n'a pas été définitivement établie (Swaminathan et al., 1995). Chez l'animal de nombreuses études utilisant des modèles variés ont montré que

seule l'administration d'un inoculum très lourd (10^9) de *L. monocytogenes* peut conduire à une colonisation et/ou à une infection (Farber et Peterki, 1991; Lorber, 1997; McLauchlin, 1997).

Chez l'homme, le nombre de *L. monocytogenes* présentes dans des aliments responsables de listériose est très varié. La DMI varie certainement suivant la pathogénicité de la souche et les facteurs de risque de l'hôte (Farber et Peterkin, 1991; Low et Donachie, 1997; Vazquez et al., 2001) (tableau 4).

Tableau 4 : Dose minimale infectante et période d'incubation dans la listériose alimentaire (Farber et Peterkin, 1991).

Description du patient ou épidémie	Status	Aliments	Dose	Symptômes	Période d'incubation
59ans, F	Bonne santé	Fromage	$2,7.10^6$	Bénins	ND
40ans, F	Bonne santé	Lactosérum	$3,4.10^9$	Méningite	<24h
Epidémie : fromage Jalisco		Fromage	$102-10^4$	Sévères, variés	31-35jours (de 1 à 91 jours)
ND	ND	Saucisse « maison »	$2,7.10^6/g$	Méningite	16-18h
80ans, H	Bonne santé	Champignons salés	$3,8.10^6/g$	Septicémie	ND
61ans, F	Cancer	Saucisses de francfort	$>1,1.10^3/g$	ND	ND
64ans, H	ND	Glace, crème fraîche	$1,10^6/g$	ND	2jours
2femmes	Grosses	Crevettes	ND	Bénins	19-23jours
52ans, F	Stéroïdes, lupus	Nuggets au poulet	ND	Sévères	3-5jours
29ans, F	Bonne santé	Nuggets au poulet	ND	Bénins	3-5jours

Abréviations : F, femme, H, homme, ND, non déterminé

Crevettes uniquement impliquées de manière épidémique. Neuf individus ont été malades. La période d'incubation a été calculée seulement pour deux femmes.

(i) **Entrée :** La contamination humaine peut s'effectuer par voie cutanée, oculaire, ou respiratoire, mais elle se produit essentiellement par voie digestive (Figure 1) (McLauchlin, 1997; Avril, 2000).

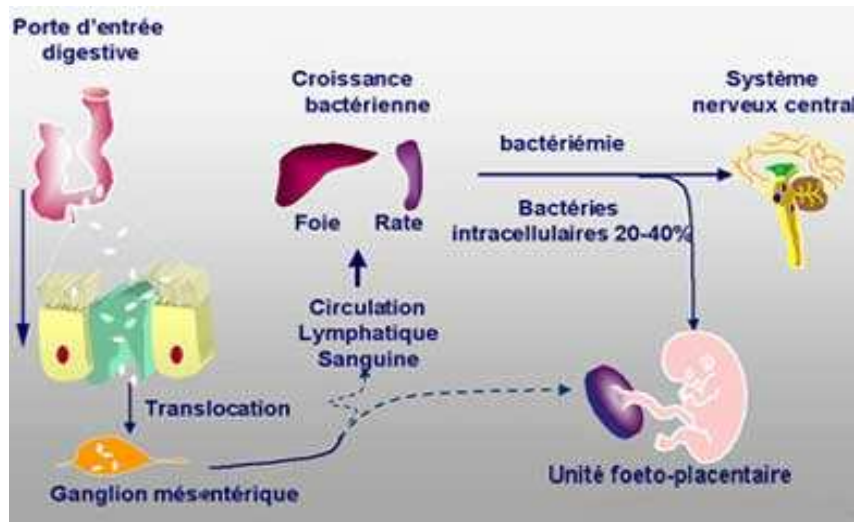


Figure 1. Représentation schématique des organes touchés au cours de l'infection à *L. monocytogenes* (Berche, 2002).

Dans un premier temps, les *Listeria spp.*, doivent résister à l'environnement hostile de l'estomac (Lorber, 1997; McLauchlin, 1997 ; Vazquez et al., 2001). Puis, *L. monocytogenes* franchit la barrière intestinale au travers des entérocytes et /ou par l'intermédiaire des cellules M qui surmontent les plaques de Peyer (McLauchlin, 1997; Rocourt et Jacquet, 2000; Vazquez et al., 2001). *L. monocytogenes* se retrouve alors dans les cellules phagocytaires de la lamina propria. Elle peut s'y multiplier et échapper à leur activité bactéricide (McLauchlin, 1997 ; Rocourt et Jacquet, 2000; Cossart, 2007). De là, par la lymphe et le sang circulant, la bactérie atteint les ganglions lymphatiques mésentériques, le foie et la rate (Vazquez et al., 2001).

(ii) Multiplication hépatique

Après un stade initial de destruction, les bactéries se multiplient très rapidement et envahissent le parenchyme hépatique, créant des foyers de nécrose (granulomes) proches des capillaires sanguins. Si l'infection n'est pas contrôlée par une réponse immunitaire adéquate, la prolifération de *L.monocytogenes* aboutit au relargage des bactéries dans la circulation, exposant le SNC et le fœtus (Audurier et Berche, 1989; McLauchlin, 1997; Rocourt et Jacquet, 2000 ; Vazquez et al., 2001; Portnoy et al., 2002).

(iii) Atteinte du SNC

La méningite est souvent associée à des lésions périvasculaires inflammatoires et des microabcès dans le parenchyme cérébral, en particulier au niveau du bulbe (rhombencéphale), puis l'infection s'étendrait par contiguïté de la substance grise vers les leptoméninges : la méningite serait donc une extension d'une encéphalite infra-clinique (Audurier et Berche ,1989; Low et Donachie, 1997).

Cependant l'atteinte élective du tronc cérébral a fait évoquer la possibilité d'une infection du SNC par l'intermédiaire des nerfs crâniens des voies aériennes supérieures. Cette voie démontrée expérimentalement chez l'animal, serait exceptionnelle chez l'homme (Audurier et Berche, 1989; Low et Donachie, 1997; McLauchlin, 1997; Vazquez et al., 2001).

(iv) Atteinte de l'utérus gravide et du fœtus

Dans l'infection néo-natale, la forme précoce résulte d'une infection in utero. La contamination du fœtus s'effectue directement par voie sanguine transplacentaire ou à partir du liquide amniotique infecté par des abcès placentaires (chorioamnionite) par voie transmembranaire (Schuchat et al., 1991; Lorber, 1997; McLauchlin, 1997; Vazquez et al., 2001)

La forme tardive serait consécutive soit à une transmission nosocomiale (Association des Professeurs de Pathologie Infectieuse et Tropicale, 2002), soit à une contamination à l'accouchement, lors du passage dans une filière génitale contaminée (Farber et Peterkin, 1991; Rocourt et Bille, 1997; Vazquez et al., 2001)

(v) Autres formes

Les formes digestives, cutanées et oculaires sont des formes primaires de l'infection, résultant d'une multiplication de la bactérie à la porte d'entrée. Les autres formes sont probablement des localisations secondaires de septicémies (McLauchlin, 1997; Schuchat et al., 1991; Vazquez et al., 2001).

5-2-2. Les facteurs de pathogénicité bactériens

5-2-2-1. Variations de la virulence

Parmi les nombreux sérovars de *L. monocytogenes*, trois seulement (1/2a, 1/2b, 4b) sont responsables de plus de 90% des listérioses humaines et animales ; le sérotype 4b est en cause dans plus de 50% des cas. Néanmoins, aucune corrélation claire entre la virulence et l'origine ou les caractéristiques de la souche n'a pu être établie (Swaminathan et al., 1995; Rocourt, 1996; Lorber, 1997 ; Low et Donachie, 1997; Avril, 2000 ; Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2001).

5-2-2-2. Cycle intracellulaire et facteurs de virulence

L. monocytogenes est une bactérie entéro-invasive, à développement intracellulaire facultatif, capable de se multiplier dans la plupart des cellules des tissus de l'hôte infecté (Schuchat et al., 1991; Low et Donachie, 1997; Avril, 2000; Nauciel, 2000).

Le cycle intra-cellulaire de *L. monocytogenes* comprend les étapes suivantes (Figure2) : (i) Internalisation de la bactérie dans la cellule-hôte. (ii) Lyse de la vacuole

d'endocytose et multiplication intracytoplasmique. (iii) Déplacement intracytoplasmique jusqu'à la membrane de la cellule-hôte. (iv) Création d'une protrusion endocytée par une cellule adjacente. (v) Lyse de la vacuole à double membrane.

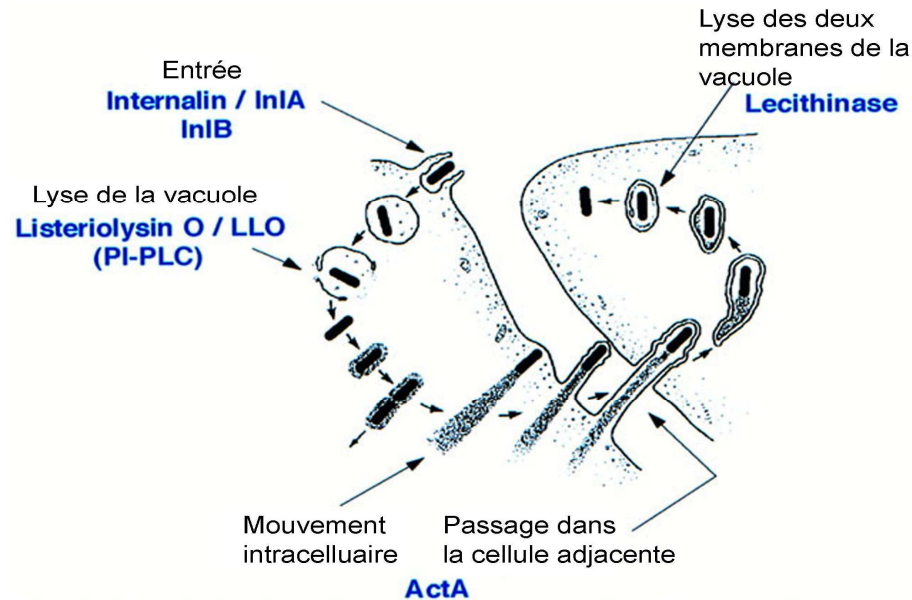


Figure2. Représentation schématique du processus d'infection intracellulaire par *L. monocytogenes*. (Cossart et al., 2003).

InlA, Internaline A ; *InlB*, Internaline B ; LLO, listériolysine; PI-PLC, Phosphatidyl-inositol Phospholipase C ; Lécithinase

Ces étapes sont conditionnées par des facteurs de virulence :

L. monocytogenes adhère aux entérocytes et provoque sa propre endocytose essentiellement grâce à des protéines de surface, les internalines, notamment les internalines A et B ; La protéine extracellulaire de 60KDa, p60, codée par le gène *iap* et impliquée lors de l'invasion des cellules non-phagocytaires (Portnoy et al., 1992; Farber, 1991; Kohler et al., 1991; Kuhn et Goebel, 1989) et de l'épithélium intestinal de l'hôte (Hess et al., 1996). Selon Bubert (Bubert et al., 1992) la protéine p60 serait présente chez toutes les espèces de *Listeria* et la protéine ActA interviendrait dans l'internalisation (Cossart, 2002; Portnoy et al., 2002; Cossart et al., 2003).

La lyse de la vacuole d'endocytose est effectuée par une hémolysine la listériolysineO (LLO) codée par le gène *hly* et régulée par le gène *prfA*, cytolysine cholestérol-dépendante formant des pores dans les membranes cellulaires. Son activité est optimum au pH acide du phagosome. La LLO agit en coopération avec la phosphatidyl-inositol phospholipase C (PI-PLC = *plcA*) et, accessoirement, avec la phospholipase C à large spectre (PC-PLC = *plcB*) (Southwich et Purich, 1996; Cossart, 2002 ; Portnoy et al., 2002).

Une fois dans le cytoplasme, la bactérie se multiplie et s'entoure de l'actine de la cellule-hôte qui se polymérise en filament à un pôle. La structure qui en résulte, « en queue de comète », propulse la bactérie dans le cytoplasme. La bactérie repousse alors les membranes cellulaires des cellules adjacentes vers l'intérieur formant des protrusions allongés qui ressemblent à des pseudopodes. La vacuole à double membrane est lysée par la LLO et les phospholipases, *plcB* jouant cette fois le rôle principal. Un nouveau cycle peut alors commencer. Les *Listeria* peuvent ainsi passer de cellule en cellule, sans les endommager, mais sans contact direct avec le milieu extracellulaire, c'est-à-dire à l'abri des défenses immunitaires (Swaminathan et al., 1995; Hof et al., 1997; Low et Donachie, 1997 ; Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2001).

(i) Organisation génétique et évolution des déterminants de la virulence

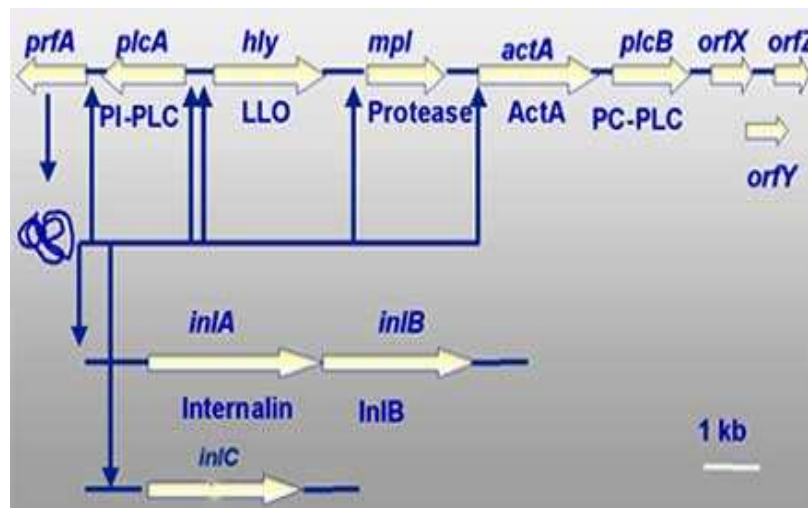


Figure 3. Emplacement des principaux gènes intervenant dans la virulence de *Listeria monocytogenes* (Berche, 2002).

Six facteurs de virulence responsables des étapes clés du parasitisme intracellulaire de *L. monocytogenes* sont physiquement liés au sein d'un îlot chromosomique de 9Kb, dénommé LIPI-1 (pour *Listeria* pathogenicity island) (Low et Donachie, 1997 ; Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2001) (Figure 3). Ce locus de virulence comprend trois unités transcriptionnelles : Au centre, le monocistron *hly*, de 1.2Kb. En aval et transcrit dans la même orientation, l'opéron lécithinase 5.7Kb, qui comprend les trois gènes *mpl*, *actA* et *plcB*. En amont et transcrit en orientation divergente, l'opéron *plcA-prfA* de 2.1Kb.

Les mutants isogéniques qui ne contiennent pas de copie fonctionnelle des gènes précédents présentent une virulence diminuée ou sont avirulents (McLauchlin, 1997; Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2001). La structure génétique et l'organisation transcriptionnelle du cluster de virulence sont identiques chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*, *L. seeligeri*,

porte aussi ce cluster mais une insertion (le locus orfE) entre *plcA* et *prfA* le rend non fonctionnelle. Dans ces trois espèces, le cluster est inséré au même niveau sur le chromosome. Il est absent des trois autres espèces de *Listeria* (McLauchlin, 1997; Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2001). L'acquisition de LIPI-1, peut être par transduction phagique, suivi de son maintien (*L. monocytogenes* et *L. ivanovii*), son inactivation (*L. seeligeri*) ou sa perte (*L. innocua*, *L. welshimeri*) seraient dues à des événements cruciaux dans l'évolution du genre *Listeria*.

Objectifs du travail

L'objectif de notre travail consiste à étudier l'espèce *L. monocytogenes* en tant que contaminant alimentaire responsable de toxi-infections alimentaires. Cette étude se base sur la détection de *L. monocytogenes* dans les aliments en Tunisie. En effet *L. monocytogenes* est une espèce qui revête une grande importance : elle est responsable de la listériose. Elle menace en premier lieu les enfants à naître, les nouveaux-nés, les femmes enceintes, les personnes âgées ainsi que les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Elle est responsable de méningites et d'une mortalité qui peut atteindre le taux élevé de 30% des personnes infectées.

Pour répondre à cet objectif, une collection de souches du genre *Listeria* et de *L. monocytogenes* a été isolée à partir de produits alimentaires et des souches d'origine clinique ont été incluses dans cette étude. Ces souches ont été par la suite caractérisées sur plusieurs plans : (i) Caractérisation biochimique par les tests classiques d'identification et galerie Api *Listeria*. (ii) La détection par PCR des gènes de virulence (*iap*, *plcA*, *plcB*, *hly*). (iii) La confirmation de l'appartenance des isolats aux espèces bactériennes du genre *Listeria* isolées en Tunisie par la technologie de biopuces.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1. Souches bactériennes :

L'étude a porté sur 22 souches de *Listeria* isolées en Tunisie : 5 isolats d'origine cliniques et 17 isolats d'origine alimentaires .Les différentes souches appartenant au genre *Listeria* incluses dans cette étude sont figurées dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Origine des souches cliniques isolées

Références	Age (sexe)	Date prélèvement	Prélèvement	Service
L11351	1 jour (male)	10-06-2005	LCR	Laboratoire de Microbiologie de HET
L17581	_ (male)	04-09-2005	LCR	Laboratoire de Microbiologie de HET
L1178	(femelle) 14 mois	17-01-2007	LCR	Laboratoire de Microbiologie de HET
L7008	87 ans (femelle)	13-04-2007	LCR	Laboratoire de Microbiologie de HET
L10388	08 mois (femelle)	27-05-07	LCR	Laboratoire de Microbiologie de HET

HET: Hôpital D'enfants De Tunis

Tableau 6 : Origine des souches alimentaires isolées

Références	Nature de l'échantillon	Origine /lieu
Cr	Crevette	Marché central
Sè	Sèche	Marché central
VH1	Viande hachée	Manouba
VH2	Viande hachée	Manouba
VH3	Viande hachée	Géant
M1	Merguez	Manouba
M2	Merguez	Manouba
M3A	Merguez	Géant
M3B	Merguez	Géant
E	Espadon	Marché central
Me	Mérou	Marché central
Ml	Merlu	Marché oued Ellil
B	Bigorneaux	Marché central
SD	Salami dinde	Monoprix
C1	Chin chard	Manouba
C2	Chin chard	Marché central
C3	Chin chard	Marché central
L.monocytogenes		EGDe
R. equi 1621		NCTC
S. aureus 2592		ATCC

ATCC: American Type Culture Collection, NCTC : National Collection of Type Culture.
R. equi: Rhodococcus equi; S. aureus: Staphylococcus aureus

2. Isolement des souches du genre *Listeria*

Nous avons analysés 100 échantillons alimentaires comprenant à la fois des aliments crus et des aliments prêts-à-manger provenant principalement de chaîne d'alimentations réparties sur tout le territoire de la Tunisie. Les aliments crus comprenaient des échantillons de viande de boeuf hachée et de poisson frais. Les aliments prêts-à-manger comprenaient des

viandes froides tranchées emballées comme du jambon cuit, du salami dinde. Les échantillons étaient prélevés et transportés au laboratoire dans une glacière contenant un nombre suffisant de sachets réfrigérants. Les unités d'échantillonnage ont été conservées au réfrigérateur (0°C et 4°C) et analysées dans les 24 heures suivant la réception. La recherche de *Listeria sp.* dans les aliments a été effectuée selon la norme ISO 11290-1. L'analyse est effectuée en utilisant 25 grammes d'aliment homogénéisé deux minutes dans 225 mL de bouillon de pré enrichissement Fraser demi (additionné de supplément Fraser demi formé par acide Nalidixique, Acriflavine, Citrate de fer ammoniacal) à l'aide d'un homogénéisateur de type Stomacher 400. Après une incubation de 24 heures à 30°C, on aensemencé des volumes de 10 ml de bouillon sélectif de Fraser (additionné de supplément Fraser constitué de acide nalidixique, acriflavine, citrate de fer ammoniacal) avec 0, 1 ml de la culture de pré enrichissement. Le bouillon sélectif a été incubé à 37°C durant 48 heures. Un aliquot de ce bouillon a été, par la suite, ensemencé sur une gélose Oxford et incubés à 37°C pendant 48 heures. Les bouillons présentant une réaction positive prennent une coloration foncée qui peut être noire ou brune foncée et les bouillons présentant une réaction négative conservent la coloration paille du bouillon fraîchement préparé. Toutefois, pour isoler les souches de *L. monocytogenes* qui n'hydrolysent pas l'esculine, 100µl de bouillon Fraser ont été étalés en stries sur la gélose Oxford si la culture est négative. De plus, l'utilisation de gélose sélective facilite l'isolement de la plupart des souches de *Listeria*. Après 48 heures d'incubation, *L. monocytogenes* forme, sur le milieu Oxford des colonies noires de 2 à 3 mm de diamètres entourés d'un halo noir et dont le centre est affaissé. D'autres espèces du genre *Listeria* ont un aspect semblable sur ce milieu. Les colonies suspectes ont été purifiées sur une gélose Trypticase Soya Yeast Extract (TSA-YE) incubée à 37°C pendant 24 heures ou jusqu'à l'obtention d'une croissance satisfaisante (Figure 4).

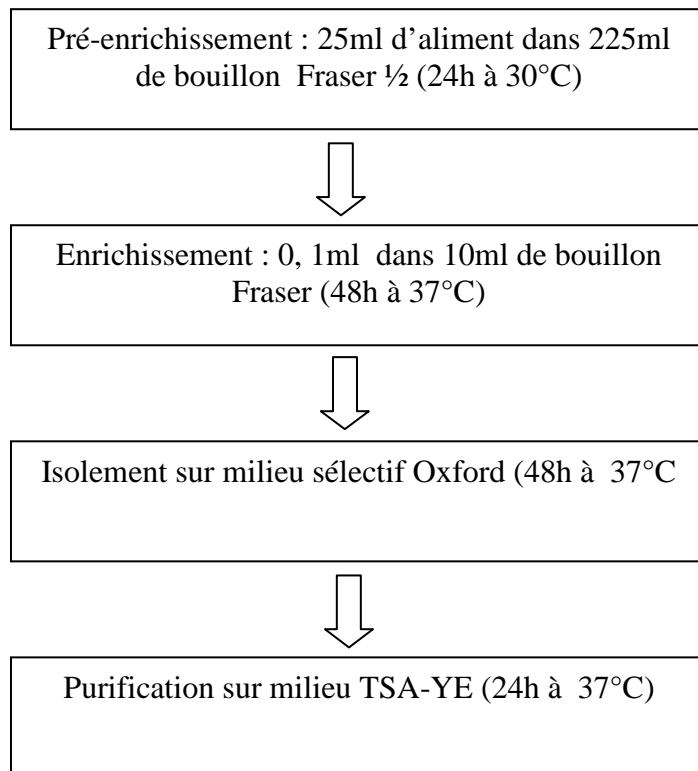


Figure 4 : Protocole d'isolement de *L. monocytogenes* à partir des aliments

3. Purification et conservation des souches du genre *Listeria*:

Après observation microscopique, les colonies retenues sont repiquées plusieurs fois, en stries sur milieu TSA-YE jusqu'à purification. Les souches pures ont été par la suite conservées sur gélose inclinée à 4°C et dans du bouillon cœur-cerveau avec 15% de glycérol à -20°C.

4. Caractérisation biochimique des souches isolées:

Plusieurs tests biochimiques ont été utilisés pour caractériser la collection des souches obtenues et afin de confirmer l'identification des isolats appartenant au genre *Listeria*.

4-1. Le test Gram

La coloration de Gram est la coloration la plus utilisée en bactériologie. C'est une coloration différentielle qui divise les bactéries en deux groupes: les Gram positif et les Gram négatif. Pour réaliser le test : on a réalisé un frottis bactérien ensuite la coloration Gram qui comprend plusieurs étapes : une coloration au violet de gentiane, ensuite une fixation au Lugol (Iode et Potassium) qui crée une laque avec le violet de gentiane dans le cytoplasme bactérien.

Par la suite, un bain d'alcool 95° pour éliminer le colorant inutile et décolorer les Gram-. Enfin une coloration à la safranine ; les Gram- seront colorés en rose et les Gram+ resteront violets.

4-2. Le test catalase

La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la libération de molécules d'eau et d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène, un produit métabolique toxique pour les bactéries.

Pour se faire, on ajoute une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% (H₂O₂) à la colonie placée sur une lame de microscope. On observe une production de bulles (libération de gaz) lorsque la réaction est dite positive.

4-3. Le test oxydase :

Ce test permet de mettre en évidence la présence d'une chaîne respiratoire ainsi que du cytochrome C oxydase qui réduit l'O₂. Pour cela, il s'agit de mettre en contact un prélèvement de biomasse avec une goutte du réactif ONPG. Si on observe une couleur violette la souche est oxydase+ ; si c'est incolore la souche est oxydase-.

4-4. Le test mobilité

La mobilité peut être observée soit à l'état frais entre lame et lamelle, dans ce cas on observe de petits bacilles mobiles grâce à une ciliature péritriche. Sur gélose mobilité en culture, il faudrait ensemer deux tubes par piqûre centrale ; le premier tube sera incubé à 25°C, pendant 24 à 48 heures, le second tube sera incubé à 37°C, pendant 24 à 48 heures. A 25°C, *L. monocytogenes* donne une image typique de sapin renversé, témoignant de son caractère micro aérophile, Cette mobilité à 22 - 25 °C permet également de différencier *Listeria* des bactéries immobiles comme *Erysipelothrix* et la plupart des *Corynébactéries*.

4-5. Test d'hémolyse

L'hémolysine est une toxine qui joue un rôle important dans la pathogénicité de *Listeria*. Le test de l'hémolyse sur gélose au sang est un critère de sélection très important en milieu clinique.

Dans le but de la recherche de l'activité hémolytique, nous avons ensemer les géloses au sang de cheval en stries et par piqûre. Après une incubation de 24 à 48 heures à 37°C, les géloses ont été examinées sous un éclairage intense. *L. monocytogenes* et *L. seeligeri* produisent une zone d'hémolyse légère autour du point de piqûre, *L. ivanovii* produit

une zone franche d'hémolyse très prononcée ou multiple, alors que les autres espèces de *Listeria* ne produisent pas de zone d'hémolyse.

4-6. Test Camp

Si l'hémolyse n'est pas bien visible sur gélose au sang, ou dans les cas litigieux, on pourrait avoir recours au Camp Test (Christie-Atkins-Munch-Peterson-Test). Ce dernier a été proposé pour une meilleure distinction entre souche hémolytique et non hémolytique, il est effectué à l'aide de deux souches de référence de la façon suivante.

- (i) un Camp-test avec une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- (ii) un Camp-test avec une souche de *Rhodococcus equi* NCTC 1621.

Le Camp-test est réalisé sur gélose TSA additionnée de 5 % de sang de cheval. On a réalisé d'abord, une première strie à l'aide de souche de *Staphylococcus aureus* sur la gélose TSA-YE, puis une seconde strie parallèle à la première à l'aide de la souche de *Rhodococcus equi*, ensuite une troisième strie à l'aide d'une souche de *L. monocytogenes* EGDe (témoin) perpendiculairement aux deux premières, enfin une quatrième à l'aide de la souche à tester, en veillant à ce que les stries ne se touchent pas entre elles et restent donc distantes d'au moins 2 millimètres, comme l'indique la figure 5.

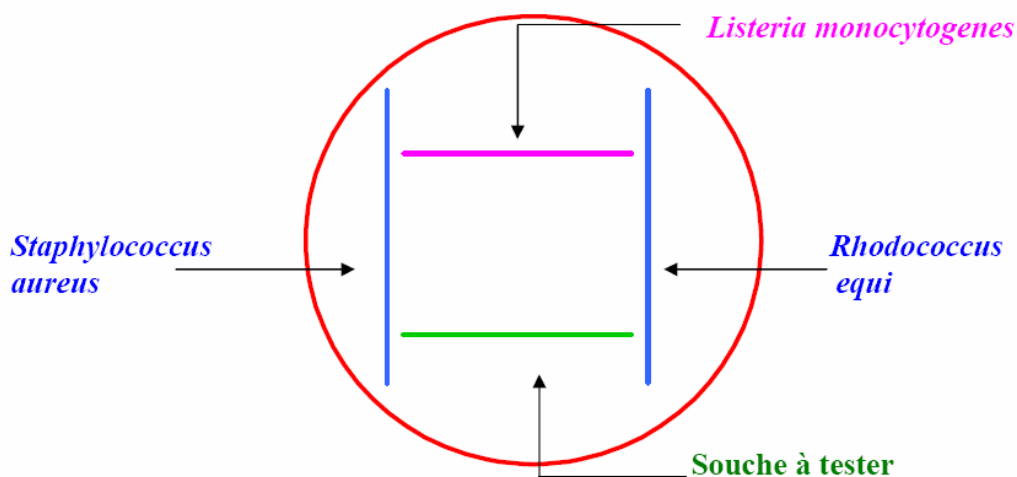


Figure 5: Camp-test avant incubation

S'il s'agit de l'identification de *L. monocytogenes*, après une période d'incubation de 36 à 48 heures à 37°C, on observe l'accentuation de l'hémolyse autour de la zone adjacente perpendiculairement à la strie de *Staphylococcus aureus*, sous forme d'une pelle ou d'une brèche, comme l'indique la figure 6.

L'identification de *L. ivanovii* peut également être confirmée par la mise en évidence de l'hémolyse accentuée autour de la zone adjacente perpendiculairement à la strie de *Rhodococcus equi*.

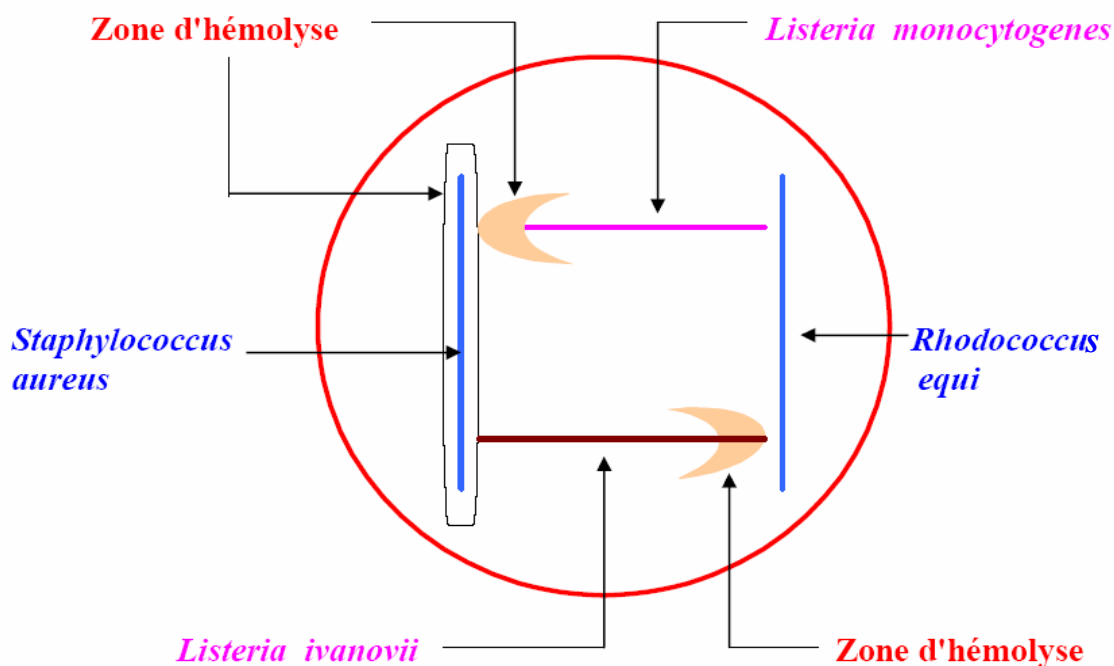


Figure 6 : Camp-test après incubation

4-7. Galerie Api *Listeria*

L'API *Listeria* est un système rapide d'identification des *Listeria* utilisant des tests standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données spécifiques. La galerie API *Listeria* comporte 10 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée qui permettent la réalisation de tests enzymatiques ou des fermentations de sucres: différenciation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes*, basée sur la présence ou l'absence de l'arylamidase (test DIM basé sur l'hydrolyse du naphthylamide), hydrolyse de l'esculine, présence de α -mannosidase, et production d'acide à partir du D-arabitol, D-xylose, L-rhamnose, α -methyl-D-glucoside, D-ribose, glucose-1-phosphate et D-tagatose. β HEM : Hémolyse, observer le type d'hémolyse et le noter sur la fiche de résultats, ce caractère constituant un test additionnel. La galerie a été inoculée par une suspension d'une opacité égale à 0,5 Mac Farland dans les tubes et les cupules de la galerie. L'incubation est réalisée à 35 - 37 °C pendant 18 à 24 heures en aérobiose. La lecture des réactions est réalisée visuellement après une incubation de 18 à 24 heures à 35°C. La révélation des réactions est effectuée après incubation de 3 min par addition d'une goutte de réactif ZYM B au test DIM, ce test est essentiel pour la différenciation entre *L. monocytogenes* pour laquelle il est négatif et *L. innocua* pour laquelle

il est au contraire positif. La lecture des réactions est effectuée sur la base du tableau de lecture fournit par le fabricant (tableau 7). L'identification est obtenue grâce un profil numérique.

Tableau 7: Lecture et Interprétation des caractères portés sur la galerie API *Listeria*.

Tests	Réactions	Résultats	
		Négatifs	Positifs
DIM	Différenciation	Orange pâle	
	<i>Listeria innocua</i> /	Rose beige	Orange
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gris bleu	
ESC	ESCULINE (hydrolyse)	Jaune pâle	Noire
α MAN	α MANnosidase	Incolore	Jaune
DARL	D-Arabitol (Acidification)		
XYL	D-Xylose (Acidification)		
RHA	RAHmnose (Acidification)		
MDG	α Méthyl-D-Glucosidase (Acidification)	Rouge, Rouge-Orangé	Jaune, Jaune-Orangé
RIB	RIBose (Acidification)		
GIP	Glucose-1-Phosphate (Acidification)		
TAG	D-TAGatose		

5. Caractérisation moléculaire

5-1. Amplification de l'ADN par PCR (polymerase chain reaction)

5-1-1. Extraction de l'ADN total par ébullition

Une colonie ou un grattage de plusieurs colonies sont prélevés sur la gélose TSA-YE, et mise en suspension dans 500 μ l d'eau distillée stérile dans un tube Eppendorf. Le tube est placé au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, puis refroidi, afin de lyser les bactéries. Après une centrifugation de 5 minutes à 12000 tr/min. Le surnageant est utilisé pour l'amplification par PCR, à raison de 2 μ l par réaction. Le lysat est conservé à - 20°C.

5-1-2. L'amplification par PCR

La PCR sur colonie est largement utilisée en recherche microbiologique afin de caractériser sur le plan phylogénétique les souches étudiées. La technique d'amplification PCR consiste à effectuer de multiples cycles de réplication de l'ADN *in vitro* par action de la taq polymérase (thermostable) issue du micro-organisme *Thermus aquaticus*, de nucléotides, et d'amorces spécifiques complémentaires ciblées qui bordent la séquence amplifiée (Saiki et al., 1988). La réaction PCR est effectuée selon les conditions décrites ci dessous : une étape de dénaturation de l'ADN de 15 min à 94°C est suivie d'une série de 35 cycles, chaque cycle présente les étapes suivantes (i) une étape de dénaturation de l'ADN d'une minute à 94°C.

(ii) une étape d'hybridation des amorces d'une minute, la température d'hybridation dépend des amorces utilisées (tableau 8, 10). (iii) une étape d'élongation de 2 min à 72°C. Enfin une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 2min.

Dans ce travail, nous avons effectué plusieurs réactions PCR qui ciblent les gènes de listériolysine (*hly*); de protéine p60 (*iap*), la phospholipase C (*plcB*) et la Phosphatidylinositol Phospholipase C (*plcA*) spécifiques au genre *Listeria*. Les PCR ont été effectuées en vue d'identifier les isolats de la collection et leurs degrés de virulence. Les séquences des couples d'amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau 8.

5-2. Analyse électrophorétique :

Les produits amplifiés ont été soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose dont la concentration a été ajustée selon la taille des fragments d'ADN : de 2% pour les produits de PCR ciblant le gène *hly* et *plcB* et 1.6% pour les produits de PCR ciblant le gène *iap* et *plcA*.

Les gels d'agarose sont préparés en utilisant le tampon TBE (0.5×) en présence de bromure d'éthidium (BET) à 0.5mg/ml. Les échantillons analysés sont mélangés avec le tampon de dépôt 6×(4V/1V) avant d'être déposés dans les puits du gel. La migration des échantillons se fait en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire 100pb (Invitrogen). Après migration, les bandes sont visualisées sous lumière UV grâce au fluorochrome intercalant BET. Les gels sont photographiés par le gel doc (BIORAD).

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées dans les réactions PCR

Code de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	Tm°C	Taille de l'amplicon pb	Référence
<i>iap</i>	F ATGAATATGAAAAAAGCAACKATC R ACATARATIGAAGAAGAAGAWARATTATTCCA	55°C	644pb ; 707pb ; 713pb ; 716pb	(1)
<i>hly</i>	F CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG R CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT	60°C	234pb	(2)
<i>plc A</i>	F AAGTTGAGTACGAAATGCTCTACTTTGTTG R AACACAAACGATGTCATTGTACCAACAACACTAG	53°C	600pb	(3)
<i>plc B</i>	F GGG AAA TTT GAC ACA GCG TT R ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT	45°C	261pb	(4)

(1)Volokhov et al., 2002 ; (2) Mengaud et al., 1989 ;Furrer et al., 1991(3); Volokhov et al., 2002; (4)Vasquez-Boland et al., 1992

Tableau 9: Conditions des amplifications PCR

Constituants de mélange réactionnel	Amplification ; gènes de virulence (<i>hlyA</i> , <i>iap</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i>)
Tampon	10×
MgCl ₂	2 mM
Taq polymérase	1U
dNTP	2 μM
Amorces F	0.5 μM
Amorces R	0.5 μM
q.s.p H ₂ O	35.5 μl
ADN	2 μl

Tableau 10: Programmes et cycles d'amplification

Réaction PCR	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale
<i>hlyA</i>	94°/15min	94°/1min	55°/1min	72°/2min	72°/2min
<i>iap</i>	94°/15min	94°/1min	55°/1min	72°/2min	72°/2min
<i>plcA</i>	94°/15min	94°/1min	53°/1min	72°/2min	72°/2min
<i>plcB</i>	94°/15min	94°/1min	45°/1min	72°/2min	72°/2min

(*) Tous les gènes ont été amplifiés durant les 35 cycles et dans les mêmes conditions.

5-3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats de l'étude biochimique sont traitées à l'aide du logiciel MVSP (version 3.131, Kovach, 1995). Ils sont désignés par le coefficient « 1 » pour une réponse positive et « 0 » pour une réponse négative. pour une réponse positive ou négative à un test en question. L'agrégation en groupes et en phénons selon l'algorithme UPGMA Unweighted Pair Group Method With Algorithmic Average (Sneath et Sokal, 1973). Les résultats des paires ainsi comparées sont visualisés sous forme de dendrogrammes montrant les différentes apparentés existantes entre les souches.

6. Identification par la technologie de biopuces

6-1. Principe

C'est un outil intégrant la biologie moléculaire, la microélectronique, la chimie, l'analyse d'image et la bioinformatique. En effet la puce à ADN permettra d'identifier de manière précise tout micro-organisme recherché dans les aliments en le reconnaissant à travers son empreinte génétique.

La puce à ADN est constituée d'un substrat solide sur lequel sont déposés des monobrins d'ADN de séquences connues qui serviront de sondes pour fixer de manière très

spécifique les fragments d'ADN amplifiés complémentaires. Les fragments d'ADN amplifiés sont marqués au moyen des traceurs fluorescents ou radioactifs ainsi la détection de l'hybridation ADN sonde-ADN amplifié s'effectue grâce à la détection du signal lumineux.

L'utilisation des biopuces nécessite de réaliser 3 étapes majeures : (i) La préparation des échantillons et leurs marquages. (ii) L'hybridation nécessite des chambres d'hybridation manuelles ou automatisées et des lavages grâce à des tampons spécifiques. (iii) L'acquisition d'image et l'analyse des données imposent l'utilisation d'un scanner de haute performance et des logiciels de traitements d'images rapide et fiable.



Figure 9 : La procédure des biopuces

6-2. Conception des sondes :

Nous avons réalisé la conception de 20 sondes spécifiques du gène *iap* pour la détection des souches *L. monocytogene* (4 sondes *iap*-Mc), *L. ivanovi* (4 sondes *Iap*-Ivan), *L. welshmeri* (2 sondes *Iap*-Wsh), *L. innocua* (4 sondes *Iap*-Innc), *L. seeligeri* (4 sondes *Iap*-See) et *L. grayi* (2 sondes *Iap*-Gry). La conception des sondes a été effectuée grâce au programme (Bioedit), l'alignement a été réalisé grâce au logiciel W1.7. La synthèse de sondes a été effectuée à la plateforme de biopuce au Genopole Toulouse, ainsi que le «spotting» : fixation des sondes sur les lames grâce à un robot «spotter» (Genetix).

Tableau 11 : Sondes pour les biopuces

Espèces	Sondes	Séquence	Nb nucléotides	Tm°C
<i>L. monocytogenes</i>	Mc1	TAGCAGAAACGAAAGAAACT	20	54
	Mc2	GCATTATTACGTCCATCAAA	20	54
	Mc3	CTACAAACACAAATGCTAATA	21	54
	Mc4	AACACAAATGCTAATAAAACG	21	54
<i>L. grayi</i>	Gry1	ATCGGTTGTTCTCAGCAAATA	20	54
	Gry2	TAAACGGAAAATACTTATCT	20	52
<i>L. welshimeri</i>	Wsh1	CAATAGTATTGTTACTTCCC	20	54
	Wsh1	TTGGTTAAATGTTTCGTTCTG	20	54
<i>L. seeligeri</i>	Seel1	CTGAAAAAGATGCAGTAGAA	21	54
	Seel2	CATTAATAAAGCTAACAAAC	21	52
	Seel3	AAGATAATGGCACAACCTGTT	20	54
	Seel4	AAATCACTTATGGTGAAGGA	20	54
<i>L. innocua</i>	Innoc1	AAGAAACGACACAACAAGTT	20	54
	Innoc2	ACAGCATTCTTACTTCCATT	20	54
	Innoc3	AAAACAACCAACTACACACAAC	20	54
	Innoc4	CTACTACACATAACGTTAAA	20	52
<i>L. ivanovii</i>	Ivan1	CTAAAGCGGAAACAAAAACA	20	54
	Ivan2	CCAGAAGTAAAGAAAGAAAC	20	54
	Ivan3	AAATGGCTGGTACAAAATTT	20	52
	Ivan4	AATATGGCACTTCTGTTCAA	20	54

6-3. Extraction d'ADN et amplification par PCR

Une colonie ou un grattage de plusieurs colonies sont prélevés sur la gélose TSA-YE, et mise en suspension dans 500 µl d'eau distillée stérile dans un tube Eppendorf. Le tube est placé au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, puis refroidi, afin de permettre la lyse des bactéries. Après une centrifugation de 5 minutes à 12000 tr/min, le surnageant est utilisé pour l'amplification par PCR, à raison de 2 µl par réaction. Le mélange réactionnel contenait du dCTP marqué à la cyanine Cy5.

6-4. Hybridation et système d'acquisition d'image ou scanner

La mise en contact des sondes avec leurs cibles s'effectue grâce au phénomène d'hybridation et peut être mis en évidence par détection de fluorescence. L'identification des cibles reconnues par les sondes est possible grâce à un système d'acquisition d'image ou scanner de biopuces et son logiciel associé d'analyse d'image. Les résultats obtenus sont ensuite validés sur le plan statistique et interprétés dans un contexte biologique.

La présence des ADN amplifiés et de Cyanine dans les différents échantillons est vérifiée par mesure de densité optique grâce au Nanodrop (version .3.1.0), les ADN ayant une absorbance maximum à 260 nm, le dye fluorescent Cy5 ayant une absorbance maximum à

635 nm. Ensuite les ADNs marqués par la Cyanine ont été purifiés et ont été dénaturés. Les ADN simples brins marqués à la Cy5 ont été reconnues par les différentes sondes déjà synthétisées et déposées sur lames en verres. Une fois l'hybridation est réalisée, chaque plot est excité par un laser, la fluorescence émise est mesurée par Gene Pix Pro software. La fluorescence signature de l'hybridation, étant détectée par le scanner GenePix 4000.

Résultats et Discussion

CHAPITRE 1
Isolement et identification biochimique des souches du genre
Listeria

CHAPITRE 1

Isolement et identification des souches du genre *Listeria*

1. Isolement

Dix sept souches du genre *Listeria* ont été isolées sur un milieu sélectif à *L. monocytogenes* (gélose Oxford) à partir de plusieurs échantillons alimentaires essentiellement de fruits de mer (9 souches), de viandes hachées (3 souches) et à partir de merguez (4 souches).

Les souches isolées ont été caractérisées sur le plan morphologique et cultural par observation microscopique et observation de l'aspect des colonies, sur le plan biochimique par des tests d'identification classiques et la galerie Api *Listeria* et enfin sur le plan moléculaire par l'amplification des gènes de virulences (*hly*, *plcA*, *plcB*, *iap*) et par les puces à ADN.

2. Identification morphologique et biochimique des souches isolées

2-1. Identification des souches isolées par des tests classiques

L'identification de 22 souches du genre *Listeria* a débuté par l'observation de l'aspect cultural des colonies sur le milieu sélectif (gélose Oxford) et l'observation microscopique des souches à l'état frais, après coloration de Gram. Ensuite un ensemble de tests biochimiques a été réalisé notamment le test catalase, le test oxydase, le test de mobilité et le test d'hémolyse.

Les résultats de cette caractérisation en comparaison avec des souches de référence de genre *Listeria* montrent que la plupart des souches isolées se présentent sous la forme de petits bacilles droits, plus ou moins longs, en chaînes courtes ou petits amas, non capsulés, non sporulés, et présentant sur milieu sélectif des petites colonies entourées par des halos bruns foncés ou noirs (indiquant l'hydrolyse de l'esculine) (figure 9). Toutes les souches sont Gram positives, catalase positives, oxydase négatives. Elles sont toutes immobiles à 37°C et hémolytiques selon l'espèce (tableau 12).

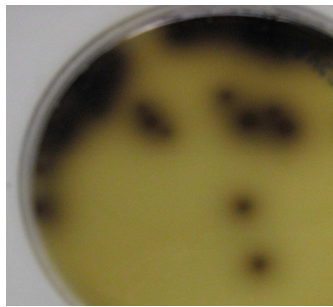


Figure 8 : Culture de *L. monocytogenes* sur milieu Sélectif OXFORD

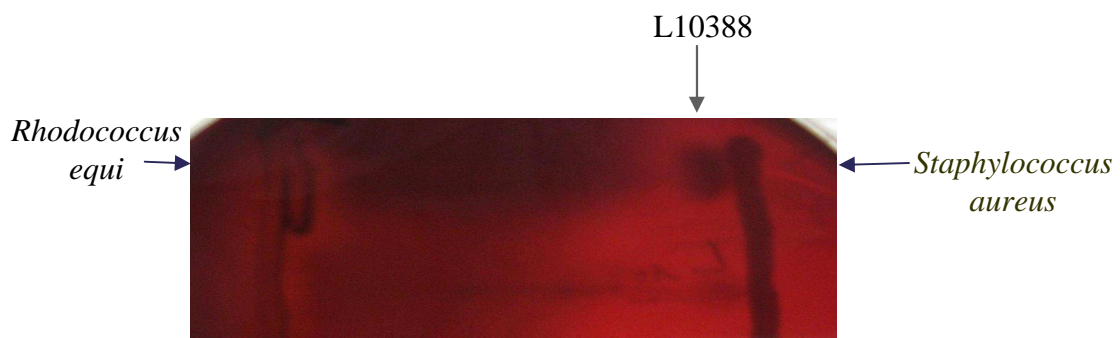


Figure 9 : Test CAMP d'une souche clinique *L. monocytogenes* L10388



Figure 10 : Api d'une souche clinique *L. monocytogenes* L17581



Figure 11 : Api d'une souche alimentaire *L. monocytogenes* C1

Tableau 12 : Les résultats des tests biochimiques utilisés pour identifier les souches appartenant au genre *Listeria*

Isolats	Gram+	Test catalase	Test d'oxydase	Test de mobilité à 37°	Test d'hémolyse	Test CAMP	
						SA	RE
Cr	+	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-	-
M1	+	+	-	-	-	-	-
M1	+	+	-	-	-	-	-
M2	+	+	-	-	-	-	-
M3A	+	+	-	-	-	-	-
M3B	+	+	-	-	-	-	-
VH1	+	+	-	-	-	-	-
VH2	+	+	-	-	-	-	-
C2	+	+	-	-	-	-	-
C3	+	+	-	-	-	-	-
Me	+	+	-	-	-	-	-
E	+	+	-	-	-	-	-
VH3	+	+	-	-	-	-	-
Sè	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 13 : Les résultats des tests biochimiques utilisés pour identifier les souches appartenant à l'espèce *Listeria monocytogenes*

Isolats	Gram+	Test catalase	Test d'oxydase	Test de mobilité à 37°	Test d'hémolyse	Test CAMP	
						SA	RE
L 11351	+	+	-	-	+	+	-
L175811	+	+	-	-	+	+	-
L1178	+	+	-	-	+	+	-
L7008	+	+	-	-	+	+	-
L10388	+	+	-	-	+	+	-
SD	+	+	-	-	+	+	-
C1	+	+	-	-	+	+	-

2-2. Identification des souches isolées par le système API

Le système Api (Bio Mérieux) est basé sur la miniaturisation et la standardisation des tests biochimiques conventionnels. La galerie Api *Listeria* est une méthode d'identification rapide des *Listeria* qui comprend 10 tests enzymatiques (figure 11 et 12) (DIM : Différentiation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes*; ESC: Esculine ; α MAN : α Mannosidase ; DARL : D-Arabitol ; XYL : D-Xylose ; RHA : Rhamnose ; MDG : α -Méthyl-D-Glucoside ; RIB : Ribose ; G1P : Glucose - 1 - Phosphate ; TAG : D-Tagatose . β HEM :

Hémolyse. L'ensemble des réactions fournit un profil biochimique de la souche et l'identification est obtenue par l'utilisation du logiciel « Apilab ». Les tests des Api ont été déterminés pour les 22 souches avec une souche de référence (*L. monocytogenes* EGDe) (tableau 14)

En analysant ces résultats, nous remarquons que toutes les souches sont capables d'hydrolyser l'esculine. Cependant elles sont toutes incapables d'utiliser le glucose et le ribose ainsi que le D-Tagatose sauf pour la souche Me est capable d'utiliser ce dernier substrat.

86, 36% des souches sont capables d'utiliser le substrat enzymatique DIM qui permet la différenciation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes* donc ce test ne permet pas de différencier les souches. Les souches utilisent l' α -Mannosidase (81, 8 %), l' α -Méthyl-D-Glucoside (91, 3 %), le Rhamnose (59 %) et sont incapables de métaboliser le D-Xylose (90, 9 %). Par ailleurs l'hémolyse est produite par 31, 81% des souches. La caractérisation biochimique identifie la totalité des souches au genre *Listeria* avec 31,81% à *L. monocytogenes*, 68,1% à *L. innocua* et 4,5% à *L. welshémiri*.

Tableau 14 : Résultat des tests sur galerie Api *Listeria*

Souche	DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG	β Hem	Résultat du logiciel Apilab	(%)
<i>L.m</i> EGDe	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>L. m</i>	99,6%
SD	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>L. m</i>	99,6%
C1	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	<i>L. m</i>	95,6%
L11351	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	<i>L. m</i>	99,6%
L17581	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>L. m</i>	98,7%
L1178	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>L. m</i>	98,6%
L7008	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>L. m</i>	99,6%
L10388	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>L. m</i>	98,7%
Cr	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99,6%
Sè	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99,6%
VH1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. i</i> <i>L. s</i>	32,6% 59,8%
VH2	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99%
VH3	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	98%
M1	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	98,7%
M2	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. i</i> <i>L. s</i>	32,6% 59,8%
M3A	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	98,7%
M3B	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	98,7%
E	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99,6%
Ml	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99,6%
B	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99%
C2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99,6%
C3	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. i</i>	99,6%
Me	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>L. w</i>	99,9%

DIM : Différentiation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes* ;ESC: Esculine ; α MAN : α Mannosidase ; DARL : D-Arabitol ; XYL : D-Xylose ; RHA : Rhamnose ; MDG : α -Méthyl-D-Glucoside ; RIB : Ribose ; G1P : Glucose - 1 - Phosphate ; TAG : D-Tagatose . β HEM : Hémolyse. (*L.w*) : *L. welshemeri* ; (*L. m*): *L. monocytogenes*;(L.i): *L. innocua*; (*L.s*): *L. seeligeri*

2-3. Analyse numérique

L'analyse numérique des résultats biochimiques (tests biochimiques classiques associés à la galerie Api *Listeria*) est réalisée sur 22 isolats (17 alimentaires et 5 cliniques) et une souche de référence *L. monocytogene* EGDe selon le coefficient de Jaccard et la méthode d'agrégation UPGMA. Les résultats des tests biochimiques sont traduits sous la forme d'une matrice binaire attribuant à chaque souche le coefficient « 1 » pour une réponse positive et « 0 » pour une réponse négative. L'analyse du dendrogramme (figure 12) montre 4 groupes :

(i) Le 1^{er} groupe (A) renferme les souches C1, L11351, L1178, SD sont des souches d'origine clinique et alimentaires qui ont la caractéristique d'être hémolytique et présentent les caractéristiques biochimiques de l'espèce *L. monocytogenes*.

(ii) Le 2^{ème} groupe (B) contient une seule souche alimentaire Me ayant la particularité d'être non hémolytique, Différenciation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes* +, Esculine+, α Mannosidase +, D-Arabitol +, D-Xylose+, Rhamnose-, α -Méthyl-D-Glucoside+, Ribose-, Glucose - 1 - Phosphate -, D-Tagatose+. Cette souche est identifiée par logiciel Apilab à 99,6% à *L. welshémiri*.

(iii) Le 3^{ème} groupe (C) inclut deux isolats M2, VH2.

(iv) Le 4^{ème} groupe (D) comprend tous les isolats qui présentent les caractéristiques biochimiques du genre *Listeria*, lui-même subdivisé en deux phénons : (D1) et (D2). Le 1^{er} phénon (D1) renferme les isolats M3A, M3B, M1, VH3 qui sont des isolats alimentaires, ils ont les mêmes caractéristiques biochimiques et sont identifiés *L. innocua* et les isolats cliniques L10388, L 17581 ont une caractéristique biochimique d'être hémolytique et sont identifiés *L. monocytogenes*. Le deuxième phénon (D2) comprend deux branches : D2a et D2b. La branche D2a est représentée par la souche VH2 non hémolytique. La branche D2b renferme les isolats C2, C3, B, Ml, E, Sè, Cr, qui sont des isolats alimentaires ainsi que l'isolat clinique L7008 et la souche de référence *L. monocytogenes* EGDe qui ont les caractéristiques suivantes Gram+, catalase+, oxydase-, différenciation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes* DIM +, Esculine+, α Mannosidase +, D-Arabitol +, D-Xylose-, Rhamnose+, α -Méthyl-D-Glucoside+, Ribose-, Glucose - 1 - Phosphate -, D-Tagatose-. Ces souches présentent les mêmes caractères et le test DIM+ : Différenciation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes*. Or les souches C2, C3, B, Ml, E, Sè, Cr sont non hémolytiques et identifiées *L. innocua* et la souche de référence *L. monocytogenes* EGDe et L7008 sont hémolytiques. Donc le test d'hémolyse permet de différencier entre ces 2 espèces.

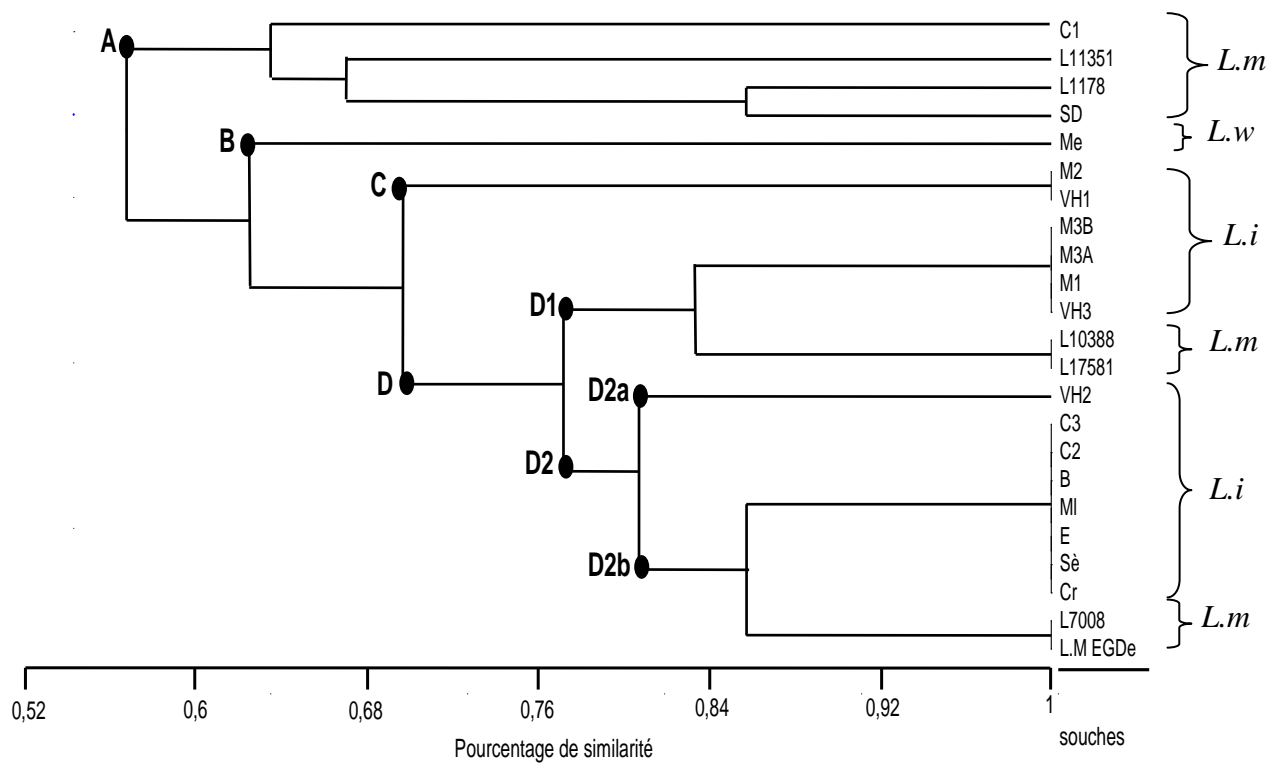


Figure 12 : Dendrogramme des relations phylogénétiques des 22 isolats et d'une souche de référence basées sur le test d'Api *Listeria*. L'analyse numérique est effectuée selon UPGMA/Coefficient Jaccard
 (*L.i*): *L. innocua*; (*L.m*): *L. monocytogenes* ;(*L.w*): *L. welshimeri*

CHAPITRE 2

Caractérisation moléculaire des souches du genre *Listeria*

CHAPITRE 2

Caractérisation moléculaire des souches du genre *Listeria*

1. Détection des gènes de virulence des isolats du genre *Listeria* par PCR

Les facteurs de virulence sont définis comme étant des substances produites par les micro-organismes qui peuvent nuire à la relation hôte bactérie. Ce terme comprend toutes les composantes du micro-organisme pouvant intervenir dans l'établissement d'une infection. On inclut dans cette définition toutes composantes servant à l'adhésion du microorganisme, à résister au complément et à la phagocytose, à détruire les tissus et à échapper au système immunitaire. Ainsi, même une substance purifiée non toxique peut être considérée comme étant un facteur de virulence si son absence en diminue le pouvoir pathogène du microorganisme. *L. monocytogenes* possède plusieurs facteurs impliqués dans sa virulence tels les internalines, l'hémolysine, la superoxyde dismutase, la catalase, la phospholipase C et la lécithinase. Ce germe possède aussi la capacité d'utiliser l'actine de la cellule hôte pour former une queue d'actine utile dans ses déplacements. L'acquisition de la virulence chez *L. monocytogenes* serait induite par un déficit en fer (Kathariou et al., 1988).

Des PCR ont été réalisées pour amplifier les gènes de la protéine p60 (*iap*), de listeriolysine O (*hly*), la Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC= *plcA*), Phosphatidylcholine Phospholipase C (*plcB*). Ces gènes spécifiques des *Listeria spp.*, ont été analysés pour l'identification au stade de l'espèce.

1-1. Détection du gène *iap* :

L. monocytogenes possède une protéine extracellulaire de 60KDa, p60, codée par le gène *iap* et impliquée lors de l'invasion des cellules non phagocytaires (Kuhn et Goebel, 1989; Farber, 1991; Kohler et al., 1991; Portnoy et al., 1992) et de l'épithélium intestinal de l'hôte (Hess et al., 1996). Selon Bubert (Bubert et al., 1992) la protéine p60 serait présente chez toutes les espèces de *Listeria*.

La protéine p60 est détectée par l'amplification du gène *iap*. Le produit PCR de ce gène, visualisé sur gel d'agarose (1.6%), génère une bande de taille variable selon l'espèce 713pb *L. monocytogenes* (figure 13) et 716pb *L. innocua* (figure 14). L'amplification du gène est observée chez 100% des souches isolées (tableau 15).

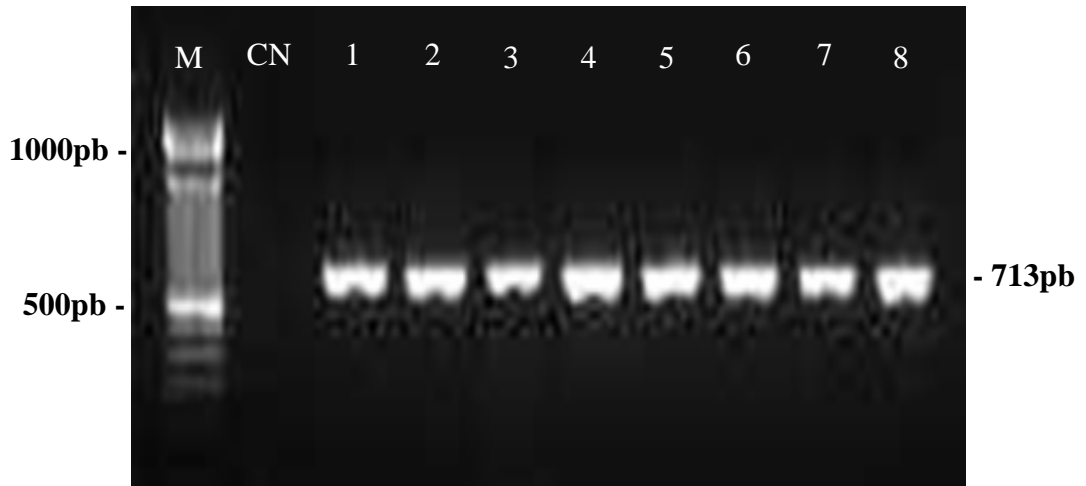


Figure 13: Profil d'amplification du gène *iap* des souches *L. monocytogenes* isolées
M : marqueur de taille; CN : contrôle négatif; 1 : *L. monocytogenes* EGDe; 2: SD; 3: C1; 4: L7008; 5: L11351; 6: L10388; 7: L1178; 8: L17581

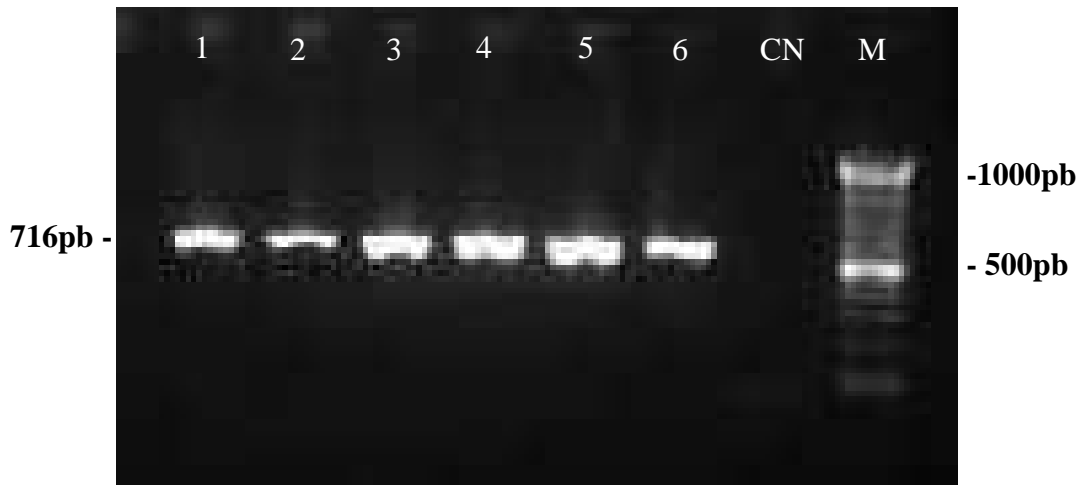


Figure 14 : Profil d'amplification du gène *iap* des souches *L. innocua* isolées
M: marqueur de taille; CN: contrôle négatif; 1: VH3; 2: VH2; 3: M3B; 4: M3A; 5: M2; 6: M1

1-2. Détection du gène *hly*

Les hémolysines sont des protéines cytolytiques extracellulaires qui agissent en formant des pores, détruisant ainsi la barrière semi-perméable de la membrane cellulaire (Farber, 1991; Portnoy et al., 1992). Le phénomène hémolytique est un marqueur fondamental de différenciation et d'identification de *Listeria* spp. (Rodriguez et al., 1986; Flenders et Donnelly, 1994). La listériolysine O est une toxine de poids moléculaire 58kDa. Elle est détectée par l'amplification du gène *hly*. La visualisation de son produit PCR sur gel d'agarose (2%) montre une bande de 234pb (figure 15) détectée chez toutes les souches cliniques et les deux souches alimentaires SD et C1 qui ont été identifiées à *L. monocytogenes* (tableau 15).

1-3. Détection du gène *plcA*

La phospholipase C est une protéine qui hydrolyse les phospholipides présents dans le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique (phosphatidyl-inositol et glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) des cellules eucaryotes (Nothermans et al., 1991; Marquis et al., 1995). Cette phospholipase C est co-exprimée avec la listériolysine chez ces pathogènes (Leimeister-Wachter et al., 1991). Selon Mengaud (Mengaud et al., 1991), la Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) permettrait à la listériolysine O d'agir ou d'augmenter son activité en hydrolysant les GPI. La protéine de 36 kDa est détectée par l'amplification du gène *plcA*. La visualisation de son produit PCR sur gel d'agarose (1,5%) montre une bande de 600pb (figure 16) détectée chez toutes les souches *L. monocytogenes* (tableau 15).



Figure 15 : Profil d'amplification du gène *hly* des souches *L. monocytogenes* isolées
M : marqueur de taille, CN : témoin négatif, *L. monocytogenes* EGDe, 2 : SD, 3 : C1,
4 :L7008, 5 :L11352, 6 :L17581, 7 :L10388, 8 :L1178

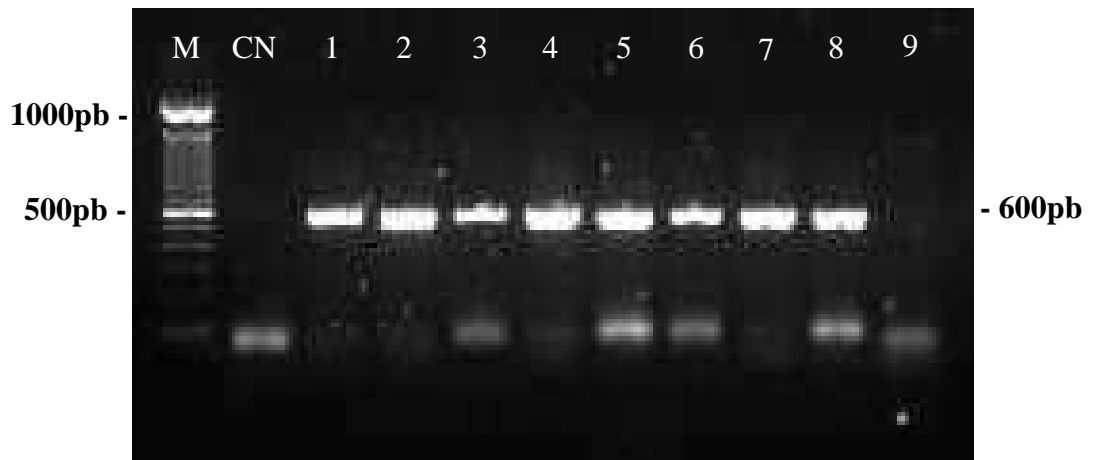


Figure 16 : Profil d'amplification du gène *plcA* des souches *L. monocytogenes* isolées
M : marqueur de taille, CN : contrôle négatif ,1: *L. monocytogenes* EGDe, 2 : C1, 3 : SD, 4 :
L1178, 5 : L7008, 6 : L11351, 7 : L10388, 8 : L17581, 9 : bigorneau

1-4. Détection du gène *plcB*

La phospholipase C (lécithinase) est une protéine de poids moléculaire 29 kDa qui hydrolyse la phosphatidyl-choline, la phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-sérine et la sphingomyéline des membranes cellulaires eucaryotiques causant ainsi la lyse cellulaire (Goeffroy et al., 1991; Smith et Portnoy, 1993; Gouin et al., 1994; Smith et al., 1995). La lécithinase est nécessaire pour lyser la double vacuole formée lors du déplacement de la bactérie de cellule en cellule durant l'infection. Elle est détectée par l'amplification du gène *plcB*. La visualisation de son produit PCR sur gel d'agarose (2%) montre une bande de 261pb (figure 17). Ce gène est détecté chez tous les isolats *L. monocytogenes*.



Figure 17 : Profil d'amplification du gène *plcB* des souches *L. monocytogenes* isolés
M : marqueur de taille, CN: contrôle négatif ,1: *L. monocytogenes* EGDe, 2: SD, 3: C1, 4: L11351, 5: L17581, 6: L7008, 7: L10388, 8: L1178

Tableau 15 : Profil moléculaire de détection des gènes de virulence des souches isolées

Souche	<i>iap</i>	<i>hly</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>
L11351	+	+	+	+
L17581	+	+	+	+
L1178	+	+	+	+
L7008	+	+	+	+
L10388	+	+	+	+
SD	+	+	+	+
C1	+	+	+	+
Cr	+	-	-	-
Sè	+	-	-	-
VH1	+	-	-	-
VH2	+	-	-	-
VH3	+	-	-	-
M1	+	-	-	-
M2	+	-	-	-
M3A	+	-	-	-
M3B	+	-	-	-
E	+	-	-	-
Ml	+	-	-	-
B	+	-	-	-
C2	+	-	-	-
C3	+	-	-	-
Me	+	-	-	-
Pourcentage d'amplification	100%	31,81%	31,81%	31,81%

2. Identification par biopuces

Pour l'identification des souches isolées, nous avons utilisé la technique de puce à ADN dénommée « microarray-based assay » qui utilise des sondes oligonucléotidiques dirigées contre les gènes de facteurs de virulence (Volokhov et al., 2002). La puce à ADN pourra être une arme puissante pour les clinicien, biologiste et épidémiologiste lors du génotypage des germes infectieux. Ces microsystèmes peuvent permettre de diagnostiquer la présence des bactéries dans des aliments ou d'avoir un suivi sur la composition des mélanges (Borucki et al., 2003; Volokhov et al., 2002). Dans notre étude on a utilisé 20 sondes spécifiques du gène *iap* pour la détection des souches *L. monocytogene* (4 sondes *iap*-Mc), *L. ivanovi* (4 sondes *Iap*-Ivan), *L. welshmeri* (2 sondes *Iap*-Wsh), *L. innocua* (4 sondes *Iap*-Innc),

L. seeligeri (4 sondes Iap-See) et *L. grayi* (2 sondes Iap-Gry). Les résultats de puce à ADN révèlent sept souches de *L. monocytogenes* (cinq d'origine clinique deux d'origine alimentaire), 14 souches de *L. innocua* (d'origine alimentaire) et 1 souche non identifiée, cette identification des isolats a été basée sur la détection de la fluorescence et la spécificité d'hybridation (figure 18 et 19). Ces résultats concordent avec les résultats d'identification par des tests biochimiques (galerie Api Listeria) sauf pour deux souches identifiées *L. seeligeri* par Api Listeria (59,8%), et dont les séquences d'ADN du gène *iap* ont été reconnues par des sondes spécifiques de l'espèce *L. innocua*. La souche non identifiée par biopuces a été identifiée *L. welshmeri* par Api Listeria. Compte tenu des résultats d'identification obtenus (isolat non identifié), une étude ultérieure serait nécessaire utilisant des sondes plus spécifiques des espèces du genre *Listeria* (tableau 16).

Tableau 16 : Résultats de l'identification des souches isolées par le logiciel Apilab et les puces ADN

Souche	Résultat du logiciel Apilab (%)	Résultat des puces hybridation des séquences
<i>L.m</i> EGDe	99,6% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
SD	99,6% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
C1	95,6% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
L11351	99,6% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
L17581	98,7% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
L1178	98,6% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
L7008	99,6% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
L10388	98,7% <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Cr	99,6% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
Sè	99,6% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
VH1	32,6% <i>L. i</i> ; 59,8% <i>L. s</i>	<i>L. innocua</i>
VH2	99% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
VH3	98% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
M1	98,7% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
M2	32,6% <i>L. i</i> ; 59,8% <i>L. s</i>	<i>L. innocua</i>
M3A	98,7% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
M3B	98,7% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
E	99,6% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
Ml	99,6% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
B	99% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
C2	99,6% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
C3	99,6% <i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
Me	99,9% <i>L. welshmeri</i>	non identifiée

(%) de similitude des souches aux espèces communes. (*L.s*): *L. seeligeri*; (*L. i*): *L. innocua*



Figure 18: Hybridation des amplifias du gène *iap* de l'isolat Cr identifié *L. innocua* avec les biopuces spécifiques de *L. monocytogenes* (1), *L. welshimeri*, *L. grayi* (2), *L. seeligeri* (3), *L. innocua* (4) et *L. ivanovi* (5).

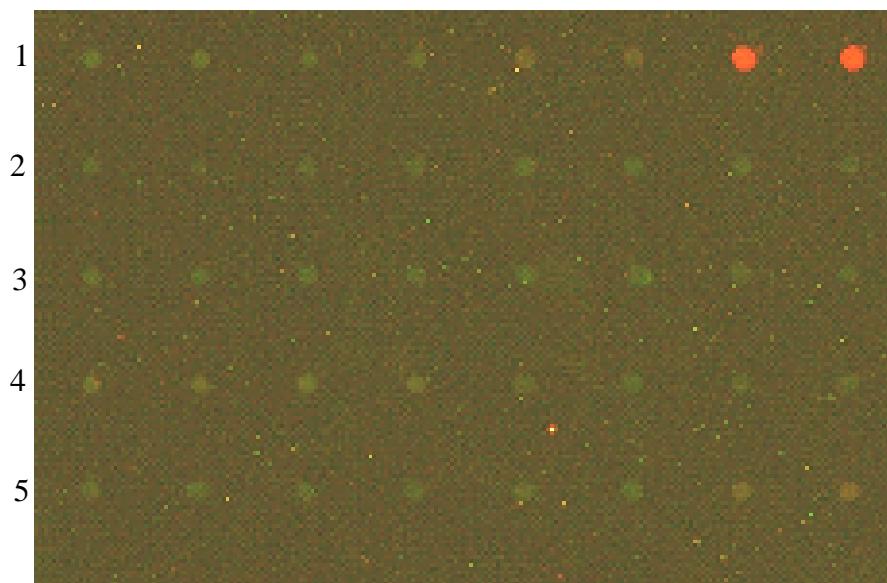


Figure 19 : Hybridation des amplifias du gène *iap* de l'isolat L10388 *L. monocytogenes* avec les biopuces spécifiques de *L. monocytogenes* (1), *L. welshimeri*, *L. grayi* (2), *L. seeligeri* (3), *L. innocua* (4) et *L. ivanovi* (5).

Discussion

1. Incidence de *Listeria sp.* et *L. monocytogenes* dans les aliments tunisiens

L. monocytogenes est reconnue comme étant un pathogène psychotrope. Les aliments incriminés dans les principales poussées de listériose sont tous des produits dans lesquels *L. monocytogenes* peut proliférer (Maciel de Souza et al., 2008). Nos résultats de l'analyse de divers produits alimentaires (fruits de mer, produits laitiers, produits carnés, charcuteries, crème glacée) nous révèlent une incidence de 22% pour *Listeria sp.* tandis que *L. monocytogenes* est retrouvé dans 2% des échantillons. Une étude canadienne (Eklund et al., 1994) a évalué l'incidence de *L. monocytogenes* à 7,4% tandis qu'une équipe taiwanaise (Xiong et al., 1994) a évalué ce pourcentage à 25,3%. Cette différence est probablement reliée au type d'aliments analysés, l'étude canadienne étant majoritairement composée de produits laitiers et l'étude de Taiwan d'aliments de composition asiatique à base de poissons et fruits de mer.

Les listérioses d'origine alimentaire répertoriées depuis quelques années impliquent principalement les légumes (Schlech et al., 1983; Gorski et al., 2003; Jay et al., 2005), le lait pasteurisé (Flemming et al., 1985) et divers types de fromage (Gouel et al., 1995. Millet et al., 2006). Toutefois, la viande rouge n'a jamais été impliquée dans des cas de listérioses même si plusieurs études démontrent une forte incidence de *Listeria sp.* et *L. monocytogenes* dans ce type d'aliment (Johnson et al., 1990; Tiwari et Aldenrath, 1990, wong et al., 1990). Selon Shelf (Schlech, 1989) *L. monocytogenes* aurait la capacité de survivre à température de réfrigération dans les viandes sans toutefois posséder la capacité de croître dans cet aliment. Certains auteurs (Johnson et al., 1990; Dykes, 2003) croient que la viande serait déficiente en substances nutritives nécessaires à la croissance de l'organisme bactérien tandis qu'une étude antérieure a suggéré un effet de compétition avec la microflore présente dans l'aliment (Buchanan, 1987). Une étude a montré que le taux de détection de *L. monocytogenes* dans des échantillons de boeuf haché est influencé par la présence de *L. innocua* (Curiale et Lewus, 1994). Par ailleurs il a été démontré que la contamination des aliments crus est plus fréquente lorsque celui-ci subit des transformations mécaniques (Lawrence et Gilmour, 1994; Christison et al., 2008).

Quant aux échantillons de poisson frais cru analysé dans notre étude, 9% des produits contenaient le genre *Listeria* ce chiffre est voisin de celui trouvé dans une étude taiwanaise

(Wong et al., 1990) qui a montré une incidence de *L. monocytogenes* de 10,5% dans des échantillons de poissons crus et de fruits de mer. Une autre étude a décelé la présence de *Listeria sp.* dans 14% d'échantillons de poisson (Wilson, 1995). La divergence entre les valeurs observées peut s'expliquer par la différence dans les produits analysés. La contamination des produits de la mer par *L. monocytogenes* est bien connue (Wong et al., 1990; Wilson, 1995 ; Parihar et al, 2008).

Notre étude a également évalué la présence de *Listeria sp.* et *L. monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger. Nous avons analysés des viandes froides de types jambon cuit, poulet, salami de dinde. Notre étude a démontré une présence *L. monocytogenes* dans les produits de charcuterie (salami de dinde) avec une incidence de 1%. Il est donc certain que des aliments contaminés par cet organisme sont quotidiennement consommés de façon journalière. Une étude comparative effectuée à Johannesburg (Christison et al., 2008) a révélé une incidence de *L. monocytogenes* de 4 %.

2. Identification biochimique des souches du genre *Listeria*

La galerie Api *Listeria* est la méthode biochimique la plus utilisée en routine pour différencier les espèces de *Listeria*. Dans notre étude, la galerie a permis une identification correcte pour 86,37% des isolats alimentaires et cliniques, a donné une discordance dans 9% des cas.

Lors de sa première évaluation (Bille et al., 1992), la galerie a identifié avec exactitude 85% des 646 souches de *Listeria spp.* testée avec une erreur pour une souche *L. ivanovii*, trois isolats non identifiés (une *L. ivanovii* et deux *L. welshimeri*), et la nécessité de tests additionnels pour caractériser définitivement 94 des 646 isolats. Dans une autre étude, la galerie a correctement identifié 39 des 44 souches de *Listeria spp.* étudiées (88,6%) ; trois *L. monocytogenes*, une *L. innocua* et *L. welshimeri* ont donné des profils d'espèces multiples, ambigus ou sans identification (Johnson et Lattuada, 1993). Pour d'autres auteurs (McLauchlin, 1997), la galerie Api a caractérisé 97% de 350 souches de *Listeria spp* issues de denrées alimentaires sans erreur, avec cependant des profils équivoques pour six souches de *L. monocytogenes* et trois souches de *L. innocua*.

L'hémolyse constitue un critère supplémentaire pour distinguer *L. monocytogenes* de *L. innocua*. En effet l'hémolyse est reconnue comme un facteur majeur de virulence chez *L. monocytogenes* (Vazquez Boland et al., 2001). Cependant, d'autres espèces de *Listeria*, telles *L. ivanovii* et *L. seeligeri* sont également hémolytiques. De plus l'expression de l'hémolyse est très variable et dépend de la souche, de la technique employée et de l'expérience du

manipulateur (Fujisawa et Mori ,1994). Toutefois, il faut tenir compte qu'en laboratoire clinique, le principal indicateur de la présence de *Listeria* pathogène est l'activité hémolytique sur une gélose au sang de cheval. Or, nous avons démontré que les isolats alimentaires de *L. monocytogenes* hémolysent les érythrocytes de cheval.

3. Identification moléculaire des souches du genre *Listeria* d'origine clinique et alimentaire

Dans la mesure où la galerie Api *Listeria* ne donnait pas des résultats satisfaisants pour 9% des souches, le deuxième objectif de cette étude a été de mettre au point une méthode d'identification des *Listeria* spp. au stade de l'espèce par amplification génique PCR. L'apparition des nouvelles technologies a permis de développer des méthodes plus rapides pour la détection de *L. monocytogenes* dans les aliments. En effet, certaines études ont envisagé l'utilisation de la technique du PCR et des sondes géniques (Deneer et Boychuk, 1991; Blais et al., 1997; Volokhov et al., 2002; Hain et al., 2006).

Nos résultats montrent une collection appartenant au genre *Listeria* sur le plan génétique. En effet l'amplification du gène *iap* de la protéine de surface p60 commun à toutes les espèces de *Listeria*, a été observée pour 100% des isolats, l'amplification des gènes *hly*, *plcA*, *plcB* spécifiques de *L. monocytogenes* a été observée pour 31,81% des isolats. Nous avons par la suite appliquée la technique biopuce qui utilise des sondes oligonucléotidiques dirigées contre le gène *iap*. La technologie des puces à ADN est une découverte récente qui incontestablement un saut technologique caractérisé par sa précision et sa rapidité. Notre étude a identifié par hybridation sur puces à ADN sept isolats *L. monocytogenes* (cinq isolats d'origine clinique et deux d'origine alimentaire), 14 *L. innocua* (d'origine alimentaire) et 1 souche non identifiée. Ces résultats concordent avec les résultats d'identification par des tests biochimiques (galerie API *Listeria*) sauf pour deux souches identifiées *L. seeligeri* par logiciel Apilab (59,8%), et dont les séquences d'ADN du gène *iap* ont été reconnues par des sondes spécifiques de l'espèce *L. innocua*. Ce qui montre l'intérêt de l'outil moléculaire dans l'identification fiable des espèces du genre *Listeria*.

Conclusion générale

Conclusion générale

L. monocytogenes est une bactérie à Gram positif, saprophyte, non sporulée. Il s'agit d'un germe extrêmement résistant aux conditions du milieu extérieur, notamment le froid car psychrotrophe, ce qui explique qu'il soit largement répandu dans l'environnement. Il est couramment retrouvé dans le sol, la végétation et le fourrage. Il peut contaminer des légumes crus, des plats cuisinés prêts à la consommation ou des aliments devant être conservés au réfrigérateur tels que le fromage ou la charcuterie.

L. monocytogenes est une bactérie à multiplication intracellulaire facultative. Elle est responsable de méningites, méningoencéphalites ou septicémies, atteignant essentiellement les personnes immunodéprimées (Berche, 1988), les enfants à naître, les nouveaux-nés (Boukadida et al., 1994), les femmes enceintes (Boukadida et al., 1996) les personnes âgées. Chez la femme enceinte, l'infection est souvent responsable d'avortements. Compte tenu de l'importance de cette espèce et l'impact sanitaire qu'elle représente, une étude de *L. monocytogenes* impliqué dans des contaminations alimentaires a été entamée. Pour ce faire, un isolement de 17 souches alimentaire appartenant au genre *Listeria* a été effectué à partir d'aliments (fruits de mer, produits carnés, charcuterie) et 5 souches d'origine clinique ont été isolées.

(i) La caractérisation biochimique par des tests d'identification classiques (coloration Gram, test catalase, test oxydase, test mobilité, test d'hémolyse) et par la galerie Api *Listeria* a permis après une analyse numérique, d'assigner 100% des isolats au genre *Listeria*.

(ii) La caractérisation moléculaire a été réalisée par l'amplification par PCR des gènes codant pour la protéine p60 (*iap*), la listériolysine O (*hly*), la Phosphatidylinositol Phospholipase C (PI-PLC= *plcA*), Phosphatidylcholine Phospholipase C (*plcB*). Le résultat a montré une amplification du gène *iap* de 100%, du gène *hly*, *plcA*, *plcB* de 31,81%. Cette caractérisation représente une identification de la collection sur le plan génétique et montre que 31,81% des isolats, sont susceptibles d'exprimer les gènes responsables des facteurs de virulence de *L. monocytogenes*, à produire la listériolysine O, La phospholipase C et la lécithinase.

(iii) L'identification moléculaire a été réalisée par la technique de biopuce et a permis d'identifier sept isolats *L. monocytogenes* (cinq isolats d'origine clinique et deux d'origine alimentaire), 14 *L. innocua* (d'origine alimentaire) et 1 souche non identifiée par puce à ADN.

Ces résultats concordent avec les résultats d'identification par des tests biochimiques (galerie Api *Listeria*) sauf pour une seule souche identifiée *L. seeligeri* par Api *Listeria*, et dont la séquence d'ADN du gène *iap* a été reconnue par une sonde spécifique de l'espèce *L. innocua*. La confirmation de ces résultats par le séquençage d'une région spécifique du chromosome bactérien (appelée ADNr-16S), qui est par la suite comparée avec les séquences connues et stockées en banques de données, serait intéressante.

Il ressort de cette étude qui a porté sur une sélection arbitraire de produits d'origine alimentaire prélevés sur le marché de consommation publique, la présence de *L. monocytogenes*, microorganisme émergent et pathogène à un taux (2 %) certes faible, mais similaire à celui rapporté par la littérature internationale, est encore une fois confirmée. Ainsi l'absence catégorique de *Listeria* dans toutes les denrées alimentaires est illusoire et une réglementation dans ce sens reste très sévère et ne pourrait jamais être observée par les industriels (comment un industriel pourra-t-il assurer que tous les produits de tous les lots sont indemnes de *Listeria* ?). Le consommateur dans ces conditions devrait avoir dans son esprit que les aliments qu'ils mangent peuvent être contaminés avec quelques cellules de *L. monocytogenes*. C'est dans ce sens que certains experts pensent que l'ingestion de *L. monocytogenes* à des niveaux inférieurs, ne semble pas liée à une listériose, et donc ne pourrait pas constituer un risque pour la santé publique. Dans certaines circonstances, le consommateur devrait porter son choix sur des produits stérilisés ou cuits à haute température et il bannit de son alimentation les crudités, charcuterie, les poissons fumés. Cette dernière attitude doit être respectée par les personnes à risques mais elle apparaît excessivement contraignante pour les gens en bonne santé qui, à condition de veiller aux bonnes règles d'hygiène lors du stockage des aliments et lors de la préparation de leur nourriture, courent un risque minime. . Par conséquent, le renforcement des capacités en matière de sécurité sanitaire des aliments est indispensable dans la plupart des pays, notamment dans les pays en développement. Enfin le message qui pourrait ressortir de cette étude serait de recommander aux autorités responsables, la promulgation de lois qui gèrent une surveillance plus systématique des denrées alimentaires susceptibles de permettre une croissance des souches bactériennes potentiellement dangereuses pour la santé humaine.

Bibliographie

- Association des Professeurs de Pathologie Infectieuse et Tropicale.** (2002). Listérioses. Maladies Infectieuses et Tropicales, 18^e ed., 2M2, Montmorency. 345-347.
- Audurier A., Berche P.** (1989). *Listeria*. Bactériologie médicale : Le Minor. Deuxième édition., 844-854.
- Augustin J.C.** (1999). Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de Doctorat, Université Lyon 1.
- Avril J.L., Daberna H., Denis F., Monteil H.** (2000). *Listeria*, Bactériologie clinique Troisième édition. Ellipse., 140-150
- Aygun O., Pehlivanlar S.** (2006). *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control. **17**, 676-679.
- Ben Embarek K.** (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. Int. J. Food Microbiol., **23**, 17-34
- Berche P.** (1999). Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections matérno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. Infections Néonatales II., **2**, 33-39.
- Berche P.** (2002). www.microbes-edu.org
- Berche P., Gaillard J.L., Simonet M.** (1988). *Listeria monocytogenes*. Précis de bactériologie. Les bactéries des infections cliniques., **3**, 312-320
- Bille J., Catimel B., Bannerman E., Jacquet C., Yercin M.N., Caniaux I., Monget D., Rocourt J.** (1992). API *Listeria*, a new and promising one day system to identify *Listeria* isolates. Appl Environ Microbiol, **58**, 1857-60
- Blais B.W., Turner G., Sooknanan R., Malek L.T.** (1997). A nucleic acid sequence-based amplification system for detection of *Listeria monocytogenes hlyA* sequences. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 310-313.
- Borucki M., Krug M.J., Muraoka W.T. and Call D.R.** (2003). Discrimination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray. Vet Microbiol, **92**, 351-362.
- Boukadida J., Monastiri K., Amri I., Boukadida N., Njeh M et al.** (1996). Portage intestinal de *Listeria monocytogenes* chez la femme enceinte en Tunisie. Rev Fr Gynécol Obstét., **91**, 266-267.
- Boukadida J., Sboui H., Monastiri K., Bibi M., Attia I., et al.** (1994). La listériose humaine en Tunisie : deux nouveaux cas chez le nouveau-né. Méd Mal Infect., **24**, 117-118.
- Brackett R.E., Beuchat L.R.** (1991). Survival of *Listeria monocytogenes* in whole egg yolk powders and in liquid whole eggs. Food Microbiol., **8**, 331-337.
- Bubert A., Kohler S., Goebel W.** (1992). The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus - and species -specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 2625-2632.
- Bubert A., Kuhn M., Goebel W., S. Kohler.** (1992). Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. J. Bacteriol., **174**, 8166-8171.
- Buchanan R.L., Stahl H.G., Archer D.L.** (1987). Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in food. Food Microbiol., **4**, 269-275.
- Carrasco E., Garcia-Gimeno R., Seselovsky R., Valero A., Perez F., Zurera G., et al.** (2006). Predictive model of growth rate under different temperature and acids. Food Science and Technology International., **12**, 47-56
- Catteau M.** (1991). Le Genre *Listeria*. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires., **3**, 315-323.
- Chae M.S., Schraft H., Hansen L.T., Mackereth R.** (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. Food Microbiol., **23**, 250-259.
- Christison C.A., Lindsay D., Von Holy A.** (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in ret D. ail delicatessens, Johannesburg, South Africa. Food Control., **19**, 727-733
- Copes J., Pellicer K., Echeverria H.G., Stanchi N.N.O., Martinez C., Leeardi.** (2000). Investigation of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses, Rev. Argent. Microbiol., **32**, 175-178.

- Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M.** (2003). Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.*, **13**, 23–31.
- Cossart P.** (2002). Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int J Med Microbiol.*, **291**, 401-9
- Cossart P.** (2007). Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes and Infection.*, **9**, 1143-1146
- Cossart P., PizarroI-Cerda J., Lecuit M.** (2003). Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.*, **13**, 23–31.
- Curiale, M.S., Lewus C.**(1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Prot.*, **57**, 1048-1051.
- Davies A., Board R.** (1998). The microbiology of meat and poultry, Blackie academic and professional, London. **15**, 4668-4674
- Deneer, H.G., Boychuk I.** (1991). Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 606-609.
- Djenane D., Martinez L., Sanchez A., Montanes L., Blanco D., Yanguela J., Beltran J.A., Roncalés P.** (2006). Effect of lactic acid bacteria on beef steak microbial flora stored under modified atmosphere and on *Listeria monocytogenes* in broth cultures. *Food Sci. Technol. Int.*, (in press).
- Doyle M.P.** (1988). Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.*, **42**, 169-171.
- Dykes G.A.** (2003). Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* population structured or homogenous habitats on subsequent growth on processed meat. *Int. J. Microbiol.*, **25**, 301-306.
- Eklund M.W., Poysky F.T., Paranjpye R.N., Lashbrook L.C., Peterson M.E., Pelroy G.A.** (1994). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J. Food Prot.*, **58**,502-508.
- Euzeby J.P.** (2000). Bactériologie vétérinaire: Les *Listeria*. www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html , pp. 1-35.
- Euzèby J.P., Tindall B.J.** (2004) Valid publications of new names or new combinations: making use of the Validation Lists. *ASM News*, **70**, 258-259.
- Farber J.M., Coates F., Daley E.** (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**, 103-105.
- Farber J.M., Peterkin P.I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, **55**, 476-511.
- Flemming D.W., Cochi S.L., MacDonald K.L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B.D. , Holmes M.B., Audurier A., Broome C.V., Reingold A.L.** (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Eng. J. Med.* ,**312**, 404-407.
- Flenders K.J., Donnelly C.W.** (1994). Injury, resuscitation and detection of *Listeria* spp. from frozen environments. *Food Microbiol.***11**:473-480.
- Flessa S., Lusk D.M., Harris L.J.** (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int. J. Food Microbiol.*, **101**, 255-262.
- Fujisawa T., Mori M.**(1994). Evaluation of media for determining hemolytic activity and that for transmission by food. *New Engl. J. Med.* , **308**,203-206.
- Furrer B., Candrian U., Hoefelein C., Luethy J.** (1991). Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragment.*J.Appl.Bacteriol.*,**70**, 372-379
- Garrity G.M., Boone D.R., Castenholz R.W.** (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition., 721
- Gibbons I., Adesiyun A., Seepersadsingh N., Rahaman S.** (2006). Investigation for possible source(s) of contamination of ready-to-eat meat products with *Listeria spp.* and other pathogens in meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiol.*, **23**, 359-366.

- Gobat P.F., Jemmi T.** (1990). Epidemiological studies on *Listeria spp.* in slaughter-house. *Fleischwirtsch.*, **70**, 1448-1450.
- Gorski L., Palumbo J.D., Mandrell R.E.** (2003). Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl. Environ.*, **69**, 258-266.
- Goulet V., Jacquet C., Vaillant V., Rebiere I., Mouret E., Lorente C., Maillot E., Stainer F., Rocourt J.** (1995). Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet.*, **345**, 1581- 1582
- Hain T., Steinweg C. and Chakraborty T.** (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria spp.* *J Biotech.* ,**126**,37-51.
- Hain T., Steinweg C., Chakraborty T.** (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria spp.* *Journal of Biotechnology.*, **126**, 37-51
- Hess J., Dreher A., Gentschev I., Goebel W., Ladel C., Miko D., Kaufman S.H.E.**(1996). Protein p60 participates in intestinal host invasion by *Listeria monocytogenes*. *Zent. Bakteri.*, **284**,263-272
- Hof H., Nichterlein T., Kretschmar M.** (1997). Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev.*, **10**, 354-57
- Hugas M., Pagés F., Garriga M., Monfort J.M.** (1998). Application of the bacteriocinigenic *Lactobacillus sakei* CTC 494 to prevent growth of *L. monocytogenes* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* **15**, 639-650.
- Jay J.M, Loessener M.J, Golden A.A.** (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Gaithersburg, Maryland, USA, Aspen Publishers Inc.
- Jemmi T., Pak S.I., Salman M.D.** (2002). Prevalence of and risk factors for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland, 1992-2000. *Prev. Vet .Med.*, **54**, 25-36.
- Johnson J.L., Doyle M.P., Cassens R.G., Schoeni J.L.** (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 497-501.
- Johnson J.L., Doyle M.P., R.G.Cassens.** (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in meat and meat products: a review. *J. Food Prot.* ,**53**, 81-91.
- Johnson J.L., Lattuada C. P.** (1993). Comparaison of nucleic acid hybridization assays and biochemical characterization tests for the confirmation of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* ,**56**, 834-840.
- Johnson, J.L., Doyle M.P., Cassens R.G.** (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.*,**6**, 243-247-170
- Kohler S., Bubert A., Vogel M., Goebel W.**(1991). Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J. Bacterial.*,
- Kuhn M., Goebel W.** (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.*, **57**, 55-6 1.
- Larpent J.P.** (2000). *Les Listeria*. Deuxième édition. Lavoisier. ISBN. 1-189
- Larpent J.P.** (2004). *Listeria*. Tec et Doc, 3^{ème} éd., Lavoisier. Paris.
- Larpent J.P.** (1997). *Mémento technique de microbiologie*. Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- Lawrence C., Fitzmorris A., Andrew O., Hirschberg, Joel M.** (2001). Is *Listeria monocytogenes* an Important Pathogen for Prosthetic Joints? *JCR: Journal of Clinical Rheumatology. USA.*, **1**, 34-37.
- Lawrence L.M., Gilmour A.** (1994). Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex
- Lorber B.** (1997). Listeriosis. *Clin Infect Dis.*, **24**, 1-9
- Lou Y., Yousef A.E.** (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser E.T., Marth E.H. (eds). Second edition, Marcel Dekker Inc., N.Y., USA. 131-224.
- Low J., Donachie W.** (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.*, **153**, 9-29.
- Maciel de Souza V., Franceschini S.A., Martinez C.R., Ratti R. P., Elaine C.P.** (2008). Survey of *Listeria spp.* in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. *Food Control* ,**19**, 1011–1013.

- Marquis H., Doshi V., Portnoy D.A.** (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.*, **63**, 453-454.
- McLaughlin J.** (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public perspective. *Rev Med Microbiol*, **8**: 1-14
- Mengaud J., Vicente M.F., Cossart P.** (1989). Transcriptional mapping and nucleotide sequence of *Listeria monocytogenes hlyA* region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect. Immun.*, **57**, 3695-3701.
- Miettinen H., Aarisalo K., Salo S., Sjöberg A.M.** (2001). Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *J. Food Prot.*, **64**, 635-639.
- Millet L., Saubusse M., Didienne R., Tessier L., Montel M.C.** (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, **108**, 105-114.
- Muriana P.M.** (1997). Effect of pH and hydrogen peroxide on heat inactivation of *Salmonella* and *Listeria* in egg white. *Food Microbiol.*, **14**, 11-19.
- Nauciel C.** (2000). *Listeria monocytogenes*. Bactériologie médicale, Masson, Paris.
- Nicolas J.A.** (1993). Rôle de la consommation d'ensilage dans la listériose ovine. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **1**, 71-76.
- Niederhauser C., Hofelein C., Luthy J., Kaufmann U., Buhler H.-P., Candrian U.** (1993). Comparison of "Gen-probe" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese. *Res. Microbiol.*, **144**, 47-54.
- Notermans S., Hoornstra E.** (2000). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: general principles, mechanism of infection and the use of performance standard to control human exposure. *Int. J. Food Microbiol.*, **65**, 223-229.
- Notermans, S.H.W., Dufrenne J., Leimeister-Wachter M., Domann E., Chakraborty T.** (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2666-2670.
- O'driscoll B., Gahanc G., Hill C.** (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1693-1698.
- Pagan, R., Condon S., Sala. F.J.** (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3225-3232.
- Palumbo S.A.** (1991). A review of methods for detection of the psychrotrophic foodborne pathogens *L. monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Saf.*, **11**, 105-122.
- Parihar V.S., Barbudde S.B., Danielsson-Tham M.L., Tham W.** (2008). Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control*, **19**, 566-569
- PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4600-4604.
- Pearson L.J., Marth E.H.** (1990). *Listeria monocytogenes*-threat to a safe supply: a review. *J. Dairy Sci.*, **73**, 912-928.
- Perni S., Jordan S.J., Andrew P.W., Shama G.** (2005). Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. *Food Control* (in press).
- Phan-Thanh L., Montagne A.** (1998). Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 183-191.
- Portnoy D.A., Auerbuch V., Glomski I.J.** (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol.*, **158**, 409-14
- Portnoy D.A., Chakraborty T., Goebel W., Cossart P.** (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.*, **60**, 1263-1267.
- Rocourt J.** (1996). Taxonomie du genre *Listeria* et typage de *Listeria monocytogenes*. *Pathologie biologique.*, **44**, 749-756.
- Rocourt J.** (1999). Rapport d'activités du centre national de référence des *Listeria*, Institut Pasteur de Paris.

- Rocourt J.** (2002). Analyse du risque *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer. Cours National d'Hygiène et de Microbiologie des Aliments. IPA., 1-62.
- Rocourt J., Bille J.** (1997). Foodborne listeriosis. Rapport trimestriel des statistiques sanitaires mondiales., **50**, 67-73.
- Rocourt J., Benembarek P.P., Toyofuku H., Schlundt J.** (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. FEMS Immunol Med. Microbiol., **35**, 263-267.
- Rocourt J., Jacquet C.** (2000). *Listeria* et listériose. In: Précis de bactériologie clinique, Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. (eds). Editions Eska 2000, 943-956.
- Rocourt J., Renaud F., Freney J.** (1994). *Listeria*. In : J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet : Manuel de Bactériologie Clinique, 2ème édition, Elsevier, collection Option Bio, 833-849.
- Rodriguez L.D., Vazquez Boland J.A., Fernandez Garayzabal J.F., Echalecu Tranchant P., Gomez-Lucia E., Rodriguez Ferri E.F., Suarez Fernandez. G.** (1986). Microplate technique to determine hemolytic activity for routine typing of *Listeria* strains. J. Clin. Microbiol., **24**,99- 103.
- Saiki R.K., Gelfond D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.** (1988). Promed directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, **239**, 487-491
- Slech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S.H., Nicholls E.S., Broome C.V.**(1983). Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. New Engl. J. Med., **308**,203-206.
- Schuchat A., Swaminathan B., Broome C.V.** (1991). Epidemiology of human listeriosis. Clin Microbiol Rev., **4**, 169-83.
- Shelf L.A.** (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef of fiver during storage at 4 and 25°C. J. Food Prot., **52**,379-383.
- Skovgaard N., Morgen C.A.** (1988). Detection of *Listeria spp.* in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol., **6**, 229-242.
- Southwich F. S., Purich D. L.** (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis. The New England J Med., **334**, 770-776
- Swaminathan B., Gerner-Smidt M.D.** (2007). The epidemiology of human listeriosis. Microb. Infect., **9**, 1236-1243.
- Swaminathan B., Rocourt J., Bille J.** (1995).*Listeria*, In P . R. Murray, E.J. Baron, M. A. Pfaller, F.C.Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology,6th ed. ASM Press, Washington, D.C,341-348.
- Tiwari N.P., Aldenrath S.G.** (1990). Occurence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., **23**, 109-1 13.
- Vasseur C., Baverel L., Hébraud M., Labadie J.** (1999). Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol., **86**, 469-476.
- Vazquez Boland J.A., Dominguez Bernal G., Gonzalez Zorn B., Kreft J., Goebel W.,** (2001). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. Microbes Infect., **3**,571-84.
- Vazquez Boland J.A., Kochs C., Dramasi S., Ohayon H., Geoffroy C., Mengaud J., Cossart P.** (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible of lecithinase in cell-to-cell spread Infect.Immun. ,**60**, 219-230.
- Vazquez Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez Bernal G., Goebel W., Gonzalez Zorn B., Wehland J., Kreft J.** (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev., **14**,584-640,CP3,CP4
- Volokhov D., Raasooly A., Chumakov K.,Chizhikov V.** (2002). Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. J Clin Microbiol., **40**,4720-4728
- Wilson I.G.** (1995). Occurence of *Listeria sp.* in ready-to-eat foods. Epidemiol Infect., **115**,519-526.
- Wong H.C., Chao W.L., Lee S.J.** (1990). Incidence and characterisation of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 3101-3104.

- Xiong H., Kawamura I., Nishibori T., Mittuyama M.** (1994). Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection various strains of *Listeria* spp. differing in virulence. *Infect. Immun.*, **62**, 3649-3654.
- Zaika L.L., Fanelli J.S.** (2003). Growth kinetics and cell morphology of *Listeria* Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. *J. Food.Prot.*, **66**, 1208-1215.

Annexes

Annexes

Milieux

Gélose au sang – Composition pour 1 litre :

Protéose peptone : 15,0 g
Digestion de foie : 2,5 g
Extrait de levure : 5,0 g
Chlorure de sodium : 5,0 g
Agar : 12,0 g
pH : 7,4

Bouillon d'enrichissement de Fraser - Composition pour 1 litre :

NaCl : 20,0 g
Na₂HPO₄ : 12,0 g
Extraits de viande de bœuf : 5,0 g
Protéose peptone : 5,0 g
Digestion pancréatique de caséine : 5,0 g
Extraits de levure : 5,0 g
Chlorure de lithium (LiCl) : 3,0 g
KH₂PO₄ : 1,35 g
Esculine : 1,0 g
Acriflavine (25 mg de chlorhydrate d'acriflavine dans 10 mL d'eau distillée) : 10 ml
Acide nalidixique (20 mg d'acide nalidixique dans 10 ml d'eau distillée) : 10 ml
Citrate de fer ammoniacal (500 mg de citrate de fer ammoniacal dans 10 ml d'eau distillée) : 10 ml
pH : 7,2 ± 0,2 à 25 °C

Bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" - Composition pour 1 litre :

Composition identique au bouillon d'enrichissement de Fraser mais la solution d'acriflavine est composée de 12,5 mg de chlorhydrate d'acriflavine dans 10 ml d'eau distillée.

(R1) : Eau oxygénée à 30% pour le test catalase

H₂O₂ : 30ml
Eau distillé : 100ml

(R2) : Réactif pour l'oxydase

Tetraméthyl p-phenylenediamine dihydrochloride : 1g/l
Eau distillée : 100ml

Solutions pour électrophorèse

Tampon TBE (10X)
Tris base : 0,9 M
Acide borique (H₃BO₃) : 0,9%
EDTA, pH 8 : 0,02 M

Gélose OXFORD - Composition pour 1 litre :

Peptone : 23,0 g
LiCl : 15,0 g
Agar : 10,0 g
Amidon de maïs : 1,0 g
Esculine : 1,0 g
Citrate de fer ammoniacal : 0,5 g
Solution d'antibiotiques : 10,0 ml
Sur gélose OXFORD, les colonies de *Listeria* apparaissent noires et entourées d'un halo noir.
Solution d'antibiotiques pour la gélose Oxford :
Cycloheximide : 0,4 g
Sulfate de colistine : 0,02 g
Fosfomycine : 0,01 g
Acriflavine : 5,0 mg
Céfotétan : 2,0 mg
Éthanol (solution à 50%) : 10,0 ml
pH : 7,0 ± 0,2 à 25 °C

Gélose TSA-YE(Trypton Soja Agar Yeast Extract) - Composition pour 1 litre :

Tryptocase soja agar (TSA): 40 g
Yeast extract : 6 g

Réactifs

Tampon de charge (5X)

Bleu de bromophénol : 25 g/l
Xylène cyanol: 25 g/l
Saccharose (dissous) : 400 g/l

Solution de coloration BET

Solution mère : 10 mg/ml
Solution de coloration : 50 µg/ml
Dans les gels : 1 µg/ml