



**HAL**  
open science

# Caractérisation de souches de portage asymptomatique de *Listeria monocytogenes* isolées chez l'Homme : Evaluation des capacités invasives et étude de leur survie en milieu acide et en présence de sels biliaries

Maiwenn Olier

## ► To cite this version:

Maiwenn Olier. Caractérisation de souches de portage asymptomatique de *Listeria monocytogenes* isolées chez l'Homme : Evaluation des capacités invasives et étude de leur survie en milieu acide et en présence de sels biliaries. Alimentation et Nutrition. UFR Sciences de la vie et de la santé. Université de Bourgogne, 2003. Français. NNT: . tel-03576407

**HAL Id: tel-03576407**

**<https://hal.science/tel-03576407>**

Submitted on 16 Feb 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université de Bourgogne**

UFR Sciences de la Vie et de la Santé

**THESE DE DOCTORAT**

**Discipline : Sciences de l'alimentation**

**Spécialité : Microbiologie**

**Maiwenn OLIER**

**CARACTERISATION DE SOUCHES DE PORTAGE**

**ASYMPTOMATIQUE**

**DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLEES CHEZ L'HOMME :  
EVALUATION DES CAPACITES INVASIVES ET ETUDE DE LEUR  
SURVIE EN MILIEU ACIDE ET EN PRESENCE DE SELS BILIAIRES**

**Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 2003 devant la commission d'examen :**

Président :	Jean GUZZO	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon
Rapporteurs :	Pascale COSSART Pierre PARDON	Professeur à l'Institut Pasteur, Paris Directeur de Recherche à l'INRA, Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort
Examineurs :	Jean LABADIE Jean-Paul LEMAITRE	Directeur de Recherche à l'INRA de Clermont-Theix Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne, Dijon
Directeur de thèse :	André ROUSSET	Professeur Universitaire et Hospitalier à l'Université de Bourgogne, Dijon

*Ces travaux de thèse ont été réalisés avec le concours du Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie.*

*Je tiens à remercier le regretté Charles Divies ainsi que le Professeur Jean Guzzo pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Microbiologie, UMR INRA/UB 1232. Je remercie également le Professeur André Rousset et le Docteur Jean-Paul Lemaître pour avoir encadré ces travaux de thèse.*

*Madame Pascale Cossart, Professeur à l'Institut Pasteur de Paris, et Monsieur Pierre Pardon, Directeur de Recherche INRA à l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort me font l'honneur de juger ce travail et je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude. De même, je remercie vivement Monsieur Jean Labadie, Directeur de Recherche à l'INRA de Theix, pour avoir accepté de participer à ce jury.*

*Je tiens également à remercier tout particulièrement les personnes qui ont apporté leur pierre à l'édifice. La première pierre est évidemment celle de Fabrice Pierre. Je le remercie bien sûr pour son soutien, à distance et à domicile, et ses conseils, sans oublier que cette première pierre n'aurait pas été ce qu'elle est sans la confiance de Jean Guzzo.*

*Les autres pierres se reconnaîtront : Je tiens à remercier toute l'équipe PG2MA et j'ai tout de même une pensée (et oui, ça m'arrive) pour mes trois acolytes de bureau, à savoir Dominique Garmyn (dit Domi le directeur d'étude) pour ses discussions légendaires d'ordre scientifique, philosophique ou encore mélodramatique, Pascal Piveteau (dit PP pour le clone 1 ou 11 ?) le leader du conseil en communication et mon conseiller en langue étrangère, et Sandrine Rousseaux, ma complémentaire (et pas seulement pour la prise de parole) ... et puis les deux derniers autres repiqueurs malchanceux de clones, Sylvain et Mélanie.*

*Merci pour vos encouragements et votre investissement.*

*Je remercie également Ellen, Claudine, Stéphanie et Alice pour leurs divertissements d'ordre dédéesque, Karima et tous ceux avec qui j'ai passé de bons moments durant ces années de thèse.*

*Enfin, un gros merci à ceux qui ont occupé la première ligne du « front », ma famille et mes proches.*

# ABBREVIATIONS

ActA	Protéine réalisant la polymérisation de l'actine
ActA-N	Région riche en acides aminés chargés de ActA
ATR	« Acid Tolerance Response »
BCC :	Bouillon Cœur Cervele
BMEC :	« Brain Microvascular Endothelial Cells »
BSH	« Bile Salt Hydrolase »
Crp	“cAMP receptor protein”
DL 50/100	Doses létales 50/ 100
DMEM	Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium
GABA	Glutamate en $\gamma$ -aminobutyrate
GAD	glutamate décarboxylases (A, B, C, X et W)
GAG	Glycosaminoglycane
GALT	« Gut Associated Lymphoid Tissue”
Gélose ACA	Gélose BCC- Acriflavine-Ceftazidime
HGF	“Hepatocyte Growth Factor”
HSP	“Heat Shock Proteins”
IgA	Immunoglobuline A
InIA, B, ... H	Famille des internalines
kDa	kilo-Dalton
LIPI-1	“ <i>Listeria</i> pathogenicity Island 1”
LIPI-2	“ <i>Listeria</i> pathogenicity Island 2”
LLO	Listériolysine O
LRR /PRR	Région riche en leucine ou en proline
LTA	Acides Lipoteichoïques
Mpl	Métalloprotéase
Orf	“Open reading frame”
PAMs	Protéines Associées à la Membrane
Pc-PLC	Phosphatidylcholine Phospholipase C
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis”
Pi-PLC	«Phosphatidylinositol Phospholipase C
PrfA	régulateur transcriptionnel des gènes de virulence
RAPD	“Random Amplification of Polymorphic DNA”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
VASP	“Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein”
WASP	« Wiskott-Aldrich Syndrom Protein »
$\sigma^B$	facteur alternatif sigma
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr	ADN Ribosomaux
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomaux
ARNt	Acide Ribonucléique de transfert
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
ATPase	Adenosine Tri-Phosphatase
h-Ecad	E-cadhérine humaine
L-CAM	Equivalent de E-cadhérine chez le poulet
MEcad	E-cadhérine murine
DDASS	Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DSV	Direction des Services Vétérinaires
DGCCRF	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
ECACC	ECACC: European Collection of Cell Cultures

## RESUME

Alors que l'intestin est le dernier réservoir qui sépare le milieu extérieur des tissus de l'hôte, il peut héberger des souches de *Listeria monocytogenes* suite à l'ingestion d'aliments contaminés. Les critères requis pour parvenir dans l'intestin sont liés aux stress rencontrés chez l'hôte. Le premier critère analysé est la capacité de la souche à activer sa glutamate décarboxylase (GAD) à pH acide car ce système protégerait la souche de l'acidité de l'estomac. Les souches de portage fécal résistent particulièrement bien à l'acidité du milieu simulant les fluides gastriques en présence de glutamate. Peu de souches d'origine alimentaire possèdent des niveaux d'activité GAD comparables à ceux observés pour les souches de portage asymptomatique et les souches responsables de cas de listériose chez l'Homme. La résistance de *L. monocytogenes* aux sels biliaries est par contre un caractère commun à l'ensemble des souches étudiées quelle que soit leur origine. L'étude des capacités invasives des 14 souches de portage asymptomatique dans la cellule hôte a montré que 10 souches de portage fécal avaient un niveau de virulence atténué sur l'œuf embryonné de poulet de 14 jours contrairement aux souches liées à des épisodes épidémiques ou sporadiques. Cinq de ces souches de portage asymptomatique ont des capacités réduites d'entrée dans la cellule épithéliale Caco-2 en culture. L'Internaline A, une protéine de virulence bactérienne impliquée dans l'entrée de la bactérie dans la cellule épithéliale, apparaît être le facteur déficient pour ces 5 souches. L'analyse de séquences partielles du gène *inlA* a permis de déceler des mutations ponctuelles responsables de l'apparition de codons stop prématurés et de la production des formes tronquées d'Internaline A observées par Western-blot. L'utilisation de la PCR-RFLP sur les régions variables du gène *inlA* de souches d'origines diverses nous a permis de détecter la présence de cette déficience chez des souches d'origine alimentaire. La fréquence de ce type de souches potentiellement non invasives dans l'aliment pourrait donc expliquer au moins en partie, l'existence du portage asymptomatique et l'incidence relativement faible de cas de listérioses en proportion de la fréquence estimée de *L. monocytogenes* ingérées.

**Mots clefs :** *Listeria monocytogenes*, portage asymptomatique, virulence, œuf embryonné de poulet, Caco-2, glutamate décarboxylase, sels biliaries.

Laboratoire de Microbiologie, UMR INRA/UB 1232, ENSBANA, 1 Esplanade Erasme, 21000 DIJON.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>1.LISTERIA MONOCYTOGENES : L'AGENT PATHOGENE DE LA LISTERIOSE</b>	<b>3</b>
<b>11. La bactérie</b>	3
111. La découverte des espèces du genre <i>Listeria</i>	3
112. Les caractéristiques du genre et de l'espèce <i>Listeria monocytogenes</i>	4
<b>12. Habitat</b>	6
121. L'environnement	6
122. Les hôtes et le portage asymptomatique	8
<b>13.Epidémiologie</b>	16
131. Données épidémiologiques sur le portage asymptomatique de <i>L. monocytogenes</i>	16
132. Données épidémiologiques concernant les listérioses animales	19
133. Données épidémiologiques concernant les listérioses humaines	20
<b>2. LE POUVOIR PATHOGENE DE LISTERIA MONOCYTOGENES : EXPLOITATION DES FONCTIONS CELLULAIRES DE L'HOTE</b>	<b>28</b>
<b>21. La listériose : pathologies animales et humaines</b>	28
211. Les pathologies animales	28
212. Les pathologies humaines	29
<b>22. Physiopathologie de l'infection</b>	30
221. L'entrée et la colonisation des tissus	30
222. La réponse immunitaire de l'hôte	36
<b>23. Le cycle infectieux au niveau cellulaire</b>	37
<b>24. Les principaux facteurs de virulence identifiés et leur relation à l'hôte</b>	39
241. Le processus dynamique menant à l'entrée dans la cellule	40
242. Les facteurs impliqués dans la lyse des vacuoles	51
243. Les facteurs impliqués dans les déplacements intra et inter-cellulaires	54
<b>25. L'organisation génétique des facteurs de virulence</b>	58
251. PrfA, le régulateur principal des deux clusters de gènes impliqués dans la virulence de <i>L. monocytogenes</i>	58
252. La comparaison avec les autres espèces du genre : vers la compréhension de l'évolution du genre <i>Listeria</i>	63

<b>3. INFLUENCE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA SURVIE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ET SUR L'EXPRESSION DU POUVOIR PATHOGENE : REGULATION DU MODE SAPROPHYTE/PARASITE</b>	<b>67</b>
1. Les paramètres rencontrés en mode saprophyte et en mode parasite	67
311. Les paramètres rencontrés dans l'environnement agroalimentaire	67
312. Les paramètres rencontrés chez l'hôte	68
32. La réponse au stress de <i>Listeria monocytogenes</i>	<b>69</b>
321. Les facteurs impliqués dans la réception et la réponse aux signaux de l'environnement	70
322. Les protéines générales de stress	71
323. La réponse à l'acidité	74
324. La tolérance aux sels <i>via</i> les osmoprotecteurs	76
325. La dégradation des sels biliaires	77
33. Stress et la virulence	81
<b>MISE EN PLACE DES TECHNIQUES D'ETUDE</b>	<b>85</b>
<b>1. LE SOUCHIER</b>	<b>85</b>
11. Les souches isolées de prélèvements humains	<b>85</b>
12. Les souches de l'environnement	87
13. La conservation des souches	88
<b>2. EVALUATION DU POTENTIEL INVASIF DES SOUCHES HUMAINES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></b>	<b>88</b>
21. Détection des activités enzymatiques impliquées dans la virulence	88
22. Détection des facteurs de virulence par Western-blot	88
23. Infection de la lignée cellulaire Caco-2	89
231. Choix de la lignée et entretien de la lignée	89
232. Infection des Caco-2 par <i>Listeria monocytogenes</i>	90
233. Validation du modèle	93
24. Infection de l'embryon de poulet de 14 jours	95
241. Choix du modèle	96
242. Mode opératoire	97
243. Validation du modèle	98

<b>RESULTATS</b>	<b>100</b>
<b>1. CARACTERISATION DU POTENTIEL INVASIF DES SOUCHES DE PORTAGE ASYMPTOMATIQUE PAR COMPARAISON AVEC UN SOUCHIER CLINIQUE : IMPLICATION DE L'INTERNALINE A DANS LE PHENOTYPE PORTAGE</b>	<b>100</b>
<b>Article 1</b> : “Assessment of the pathogenic potential of two <i>Listeria monocytogenes</i> human faecal carriage isolates”	104
<b>Article 2</b> : “Expression of truncated Internalin A is involved in impaired internalization of some <i>Listeria monocytogenes</i> isolates carried asymptotically by humans”	112
<b>2. PRODUCTION D'UNE FORME TRONQUEES DE L'INTERNALINE A : INCIDENCE DE CE PHENOTYPE DANS LES NICHES ECOLOGIQUES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></b>	<b>120</b>
<b>Article 3</b> : “Use of PCR-RFLP for the rapid detection of non invasive <i>Listeria monocytogenes</i> ”	122
<b>3. COMPORTEMENT DES SOUCHES DE PORTAGE ASYMPTOMATIQUE DANS UN ENVIRONNEMENT SIMULANT CELUI RENCONTRE DANS LE SYSTEME DIGESTIF</b>	<b>135</b>
<b>Article 4</b> : “Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage isolates, clinical isolates or environmental isolates of <i>Listeria monocytogenes</i> ”	137
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>157</b>
<b>1. EVALUATION DES CAPACITES INVASIVES DES ISOLATS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></b>	<b>157</b>
11. <i>L'incidence de InIA sur la virulence</i>	157
12. <i>L'origine des souches produisant une InIA tronquée</i>	159
13. <i>Hypothèses sur l'incidence et les conséquences de l'ingestion de souches produisant une forme tronquée de InIA chez l'Homme</i>	160
<b>2. EVALUATION DES CAPACITES DE REPONSE AU STRESS ACIDE ET AUX SELS BILIAIRES DU SOUCHIER</b>	<b>162</b>
<b>3. LA RELATION ENTRE LA REPONSE AU STRESS ET LA VIRULENCE</b>	<b>164</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>166</b>

# **Introduction générale**

*Listeria monocytogenes* est à l'origine d'infections potentiellement graves principalement chez les personnes immunodéprimées. L'infection résultant le plus souvent de l'ingestion d'aliments contaminés, cette bactérie est donc activement recherchée dans les filières agroalimentaires. Compte tenu de sa forte capacité de résistance aux diverses conditions environnementales, il n'est pas rare de détecter sa présence, ce qui implique aujourd'hui encore la non-commercialisation de nombreux produits alimentaires voire le retrait de la vente du produit incriminé et la divulgation de l'information aux consommateurs. Pourtant, les répercussions occasionnées par ces crises médiatiques pourraient parfois être plus commerciales que sanitaires. En effet, un aliment contaminé par *L. monocytogenes* n'induit pas pour autant obligatoirement la déclaration de l'infection. Par contre dans tous les cas de figure, l'industriel doit se contenter d'une mauvaise publicité.

Parmi les facteurs qui contrôlent l'apparition de cas de listériose, certes l'hygiène du produit alimentaire et la dose ingérée sont importantes, mais il est probable qu'il faut aussi prendre en considération la variabilité du pouvoir pathogène des souches de *L. monocytogenes*.

Compte tenu des connaissances actuelles, toute *L. monocytogenes* détectée est considérée comme potentiellement pathogène pour l'Homme. Afin d'éviter l'apparition d'une épidémie, un système de surveillance des cas de listériose a été mis en place. Il suppose la coordination de divers services tels que la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS), la Direction des Services Vétérinaires (DSV) ou encore la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF). Les investigations menées par la « cellule *Listeria* » sont destinées à identifier dans les plus brefs délais l'aliment responsable avant qu'il n'occasionne d'autres cas.

Pour cibler plus justement les alertes, le but est de reconnaître les souches responsables des cas de listériose. A cet effet, une meilleure connaissance des niveaux de virulence des souches de *L. monocytogenes* pourrait permettre l'identification des marqueurs de virulence pertinents. Ces outils sont utiles notamment pour l'évaluation et la gestion des risques en Santé Publique. Si la comparaison des génomes de *L. monocytogenes* et de *Listeria innocua*, une espèce non pathogène du genre *Listeria*, permet d'identifier un maximum de facteurs impliqués dans la virulence (Glaser *et al.*, 2001), les marqueurs associés aux souches épidémiques sont aussi recherchés par la comparaison entre les souches de l'environnement, les souches sporadiques et les souches responsables d'épidémies.

Lors de ce travail de thèse, nous nous proposons de caractériser un réservoir de souches non exploré jusqu'ici, à savoir des souches isolées à l'état de portage asymptomatique chez l'Homme. Cette étude vise dans un premier temps à évaluer leur potentiel pathogène et leur comportement face aux conditions qu'elles ont pu rencontrer dans le tube digestif humain. Sont-elles différentes de celles incriminées lors des cas de listériose ? Ces premières données sont en effet essentielles à la compréhension de leur existence, leur devenir, leur rôle si elles en ont un dans le tractus digestif humain, et pour savoir si elles peuvent constituer un risque sanitaire réel.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude bibliographique du sujet. Le souchier étudié ainsi que les méthodes ayant nécessité une mise en place particulière au laboratoire sont décrites dans une seconde partie. Les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques publiés ou soumis à diverses revues. Les deux premiers articles concernent l'évaluation des capacités invasives des souches de portage asymptomatique et des souches responsables de cas de listérioses. La méthode permettant de détecter des souches peu invasives parmi de nouvelles souches isolées de l'environnement est décrite dans un troisième article. L'évaluation des capacités de résistance du souchier à des stress comme l'acidité et les sels biliaires est présentée dans le quatrième article. Une synthèse critique des résultats obtenus et les perspectives proposées pour compléter ce travail clôturent ce manuscrit.

# **Introduction bibliographique**

## 1. Listeria monocytogenes : l'agent pathogène de la listériose

Alors que la plupart des pathogènes d'origine alimentaire est plus reconnue par la morbidité plutôt que par le taux de mortalité, *L. monocytogenes* se démarque par son fort taux de mortalité. *L. monocytogenes* est l'auteur de septicémies et de méningites principalement chez les personnes à risque, à savoir des personnes immunodéprimées dont les femmes enceintes.

*L. monocytogenes* est devenu l'un des plus importants pathogènes d'origine alimentaire par l'apparition répétée d'épidémies et leur médiatisation. Le développement des drogues immunosuppressives (corticostéroïdes, chimiothérapies), des dialyses rénales, des transplantations d'organes augmente considérablement la catégorie de personnes à risque. Enfin, les patients atteints du sida, 500 fois plus touchés que la population générale (Schlech, 2000), sont aussi concernés, ce qui laisse supposer que la listériose restera encore un problème de santé publique pour les années à venir. D'autant plus que l'antibiothérapie n'est efficace que lorsqu'elle est administrée suffisamment rapidement après l'apparition des symptômes.

La lutte et la prévention de la listériose passent aussi par une meilleure connaissance de la bactérie, de son habitat et de ses cibles.

### 11. La bactérie

#### 111. La découverte des espèces du genre *Listeria*

Officiellement répertoriée depuis 1926 par E. G. D. Murray et R. A. Webb (Angleterre), *L. monocytogenes*, identifiée alors comme *Bacterium monocytogenes*, fut décrite comme l'agent étiologique de septicémies infectant les lapins et les cobayes dans l'animalerie de leur laboratoire. Dans un même temps, une maladie fatale touchant les gerbilles sauvages d'Afrique du Sud avait été attribuée à un bacille Gram-positif affectant fortement la structure et les fonctions du foie et qui n'avait pas été encore identifié ; ce bacille avait alors été appelé *Listerella hepatolytica* en l'honneur de Lord Joseph Lister (Pirie, 1927). En 1940, la nomenclature de *L. monocytogenes* proposée par Pirie fut approuvée par les *Approved Lists of Bacterial names*.

Pourtant, Hülphers (Suède) avait probablement décrit la même infection chez un lapin en 1911 et la première culture de *L. monocytogenes* isolée chez l'Homme aurait été obtenue en 1921 par Dumont et Cotoni (France) à partir d'un isolement réalisé sur un patient atteint d'une méningite (Seeliger, 1988).

Au fur et à mesure des isollements, la littérature a mentionné 8 espèces du genre *Listeria* : *L. monocytogenes* en 1926, *Listeria denitrificans* en 1948, *Listeria grayi* en 1966, *Listeria murrayi* en 1971, *L. innocua* en 1981, *Listeria welshimeri* et *Listeria seeligeri* en 1983, *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* en 1985 et *Listeria ivanovii subsp. londoniensis* en 1992 (Rocourt, 1996).

Depuis, grâce au renforcement des méthodes utiles à la taxonomie, de nombreuses modifications ont été réalisées dans le découpage du genre. *L. denitrificans* a été exclue du genre et forme le nouveau genre *Jonesia* depuis 1987. *L. grayi* et *L. murrayi* ont été réunies en une seule espèce *L. grayi* en 1992 (Rocourt *et al.*, 1992).

A l'heure actuelle, 6 espèces constituent le genre *Listeria* : deux sont potentiellement pathogènes : *L. monocytogenes* pour l'Homme et l'animal et *L. ivanovii* uniquement chez l'animal. Parmi les autres espèces, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. grayi*, seuls quelques rares cas d'infection ont été reportés chez l'Homme ou l'animal (Rocourt, 1999).

## 112. Les caractéristiques du genre et de l'espèce *Listeria monocytogenes*

Le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium* avec notamment les genres *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. Ce groupe de bactéries comprend des bactéries à Gram-positif avec une composition de l'ADN en G+C inférieur à 50%. L'absence d'acides mycoliques, la présence d'acides lipoteichoïques et aussi et surtout le séquençage de l'ARN ribosomique 16S ((Collins *et al.*, 1991) (Sallen *et al.*, 1996)) constituent les bases à partir desquelles la position du genre *Listeria* a été clairement établie (Rocourt, 1996).

Depuis, la comparaison des séquences du génome des souches de *L. monocytogenes* (EGD-e), *L. innocua* (CLIP 11262), *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* a permis de montrer les fortes similitudes qui autorisaient leur regroupement (Glaser *et al.*, 2001). De même, Glaser *et al.* (2001) ont suggéré une possible origine commune entre *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *B. subtilis*. *L. monocytogenes* possède un chromosome circulaire de 2,944,528 paires de bases (pb) avec un contenu en G+C voisin de 39%

(GenBank/EMBL accession number AL591824). Le génome de *L. innocua* a une taille similaire (3,011,209 pb) avec un contenu en G+C voisin de 37% (GenBank/EMBL accession number AL592022) et la souche possède par ailleurs un plasmide de 81,905 pb (GenBank/EMBL accession number AL592102). De nombreuses souches seraient dépourvues de plasmide, et la diversité des plasmides serait faible chez *L. monocytogenes* (Kolstad *et al.*, 1991 ; Kolstad *et al.*, 1992 ; Peterkin *et al.*, 1992).

Le genre *Listeria* est caractérisé du point de vue morphologique par des petits bacilles Gram-positif aux extrémités arrondies (0,5 à 2 µm de longueur sur 0,4 à 0,5 µm de largeur) réguliers, isolés, par paire en V, en L ou en petites chaînes. Dans des cultures âgées ou carencées, des bacilles plus longs peuvent être observés.

Les *Listeria sp.* ne sont ni sporulées, ni capsulées. Elles sont mobiles par 4 à 5 flagelles péritriches à des températures comprises entre 20 et 25°C, mais immobiles à basse température comme à 37°C, leur température optimale de croissance.

Sur le plan physiologique, les données sont variables selon la souche et les milieux utilisés. Ainsi, il est admis que la croissance de *Listeria* se poursuit sur une vaste gamme de température (-2°C à 45°C) (Augustin *et al.*, 2000). C'est d'ailleurs sa capacité à se développer à 4°C qui permet sa survie dans les produits alimentaires réfrigérés et les lieux de stockage.

Elles sont capables de se développer en atmosphère aérobie ou anaérobie, en présence de sels jusqu'à 10% (jusqu'à 20% pour certaines souches) et sur une gamme de pH allant de 5,6 à 9 (voire même 9,6 pour certaines souches de *L. monocytogenes*). Certaines souches de *L. monocytogenes* sont aptes à se multiplier à des pH de l'ordre de 4,3-4,6 lorsqu'elles sont placées en bouillon trypticase soja incubé à 30°C (Parish & Higgins, 1989). En revanche, toutes les souches meurent en quelques heures à un pH inférieur à 3,3 et de nombreuses souches meurent à un pH inférieur à 5,5.

Du point de vue biochimique, *Listeria sp.* consomment le glucose en formant du lactate, de l'acétate et de l'acétoïne en fin de métabolisme en présence d'oxygène. L'acétoïne n'est pas produite en anaérobiose. Seuls les hexoses et les pentoses sont consommés en anaérobiose. *L. monocytogenes* utilise de nombreux autres glucides : le lactose, le fructose, le mannose, le maltose, le cellobiose, le tréhalose, le gentobiose, le glycérol, le D-arabitol, l'amygdaline, la saliciline ou encore l'esculine. La réponse est positive pour le test de la catalase et négative pour le test de l'oxydase. Parmi les tests nécessaires à l'identification

de l'espèce au sein du genre *Listeria*, plusieurs caractères biochimiques tels que la production d'acide à partir du mannitol, du L-rhamnose, du D-xylose et de l' $\alpha$ -méthyl-D-mannoside, et la réduction des nitrates servent à différencier les espèces du genre *Listeria*.

Les principaux caractères permettant de différencier les espèces du genre *Listeria* sont présentés dans le tableau 1. Mis à part sa virulence, *L. monocytogenes* se différencie plus particulièrement par son comportement sur gélose au sang. Son hémolysine de type  $\beta$  se visualise par la formation de zones claires résultant de la lyse des hématies et elle agit en synergie avec la  $\beta$ -hémolysine de *S. aureus* sur des érythrocytes de mouton (le facteur médiateur de cet effet est appelé le facteur CAMP pour Christie, Atkins et Munch-Petersen).

**Tableau 1 : Critères permettant la différenciation des espèces du genre *Listeria* :**

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
$\beta$ - hémolyse	+	++	-	-	+	-
CAMP test <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	-
CAMP test <i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-
Production d'acide à partir de :						
<input type="checkbox"/> L-Rhamnose	+	-	+/- (variable)	+/- (variable)	-	-
<input type="checkbox"/> D-Xylose	-	+	-	+	+	-
<input type="checkbox"/> $\alpha$ -Méthyl-D-Mannoside	+	-	+	+	+/-	+
<input type="checkbox"/> D-Mannitol	-	-	-	-	-	+
Réduction des nitrates	-	-	-	-	-	+/-
Pouvoir pathogène chez la souris	++ (variable selon la souche)	+/- selon la souche	-	-	-	-

## 12. Habitat

### 121. L'environnement

*L. monocytogenes* possède les caractères d'une bactérie tellurique. Malgré l'absence de spore, ses capacités de résistance dans le milieu extérieur sont remarquables et lui permettent d'infester les sols, les plantes, les prairies, les pâturages, les forêts, les ensilages, les eaux résiduaires et les locaux d'élevage. La matière en décomposition est un habitat, où elle se comporte en tant que saprophyte. Ainsi, la bactérie pourrait survivre 1 à 2 ans dans le sol, 200 jours dans la paille et 140 à 360 jours dans l'eau (Querrec, 1987).

La contamination des matières premières de l'alimentation humaine et animale a probablement engendré la contamination des ateliers agroalimentaires (Chasseignaux *et al.*, 2001). Des études ont montré que ce germe était en effet capable de coloniser des surfaces et

de se développer sous forme de biofilm, et de ce fait, pouvait contaminer par voies directes ou indirectes les aliments (Blackman & Frank, 1996 ; Bouttier *et al.*, 1996).

Ainsi, des surfaces de travail et le matériel de découpe d'industries agroalimentaires ont été identifiés comme sources de contamination des produits carnés qui y étaient transformés, et ceux même après une opération de nettoyage-désinfection (Salvat *et al.*, 1997 ; Chasseignaux *et al.*, 2002).

La recherche systématique de *Listeria* et plus particulièrement celle de *L. monocytogenes* a permis de montrer que de très nombreuses denrées pouvaient être contaminées en sortie des ateliers agroalimentaires (Farber & Peterkin, 1991). Pour donner un ordre d'idée, suite au plan de surveillance réalisé en 1993 et 1994, il a été montré que 10,3% des prélèvements alimentaires (sur un total de 8343 prélèvements) étaient contaminés par *L. monocytogenes* (Pierre & Veit, 1996).

Ainsi, les produits les plus contaminés sont les produits carnés dont les viandes blanches et les viandes rouges, les carcasses de volaille (poulets, dindes, canards), les viandes de porcs, de bovins, les charcuteries, et les produits de la mer (poissons et produits dérivés (saumon fumé, surimi), coquillages (huîtres, moules, coques palourdes), crustacés (crevettes, crabes, homards). Les pourcentages d'échantillons contaminés peuvent ainsi atteindre 45% pour les charcuteries crues et 12 à 16% des poissons frais ou fumés.

La contamination est plus diverse au sein du groupe des produits laitiers : les fromages à pâte molle et croûte lavée sont les plus souvent contaminés (10 et 11% respectivement), là où les pâtisseries, les poudres de lait, les yaourts et le beurre semblent l'être dans une moindre mesure (1 à 4%). Les produits végétaux seraient globalement peu contaminés (laitues, choux, champignons, pommes de terre...) mais pour certains produits comme les graines de soja réfrigérées, le pourcentage d'échantillons contaminés peut atteindre 19%.

Le groupe de T. Chakraborty (1998) estime que annuellement, nous nous exposons 19,3 fois et 3,8 fois à des quantités de  $3 \log_{10}$  et  $5 \log_{10}$  de *L. monocytogenes* respectivement via notre alimentation (tableaux 2 et 3 adaptés de Notermans *et al.*, 1998). En conséquence, les locaux d'habitation hébergent aussi le pathogène (réfrigérateurs, conduits d'évacuation...)(Cox *et al.*, 1989). Ce germe ubiquitaire multiplie donc les vecteurs de contamination qui mènent inévitablement à l'Homme.

**Tableau 2** : Estimations de la fréquence d'exposition par personne par an aux Pays-Bas (d'après Notermans *et al.*, 1998) :

Type d'aliment :	Fréquence d'exposition /personne/an :	
	à 10 <sup>5</sup>	à plus de 10 <sup>6</sup> microorganismes
Produits carnés	2,8	0,4
Produits de la mer	0,3	0,3
Produits laitiers	0,5	0,1
Produits végétaux	0,2	0,0
<b>Exposition totale</b>	<b>3,8</b>	<b>0,8</b>

**Tableau 3** : Estimations de la fréquence d'exposition par personne par an dans la population à risque en France à au moins 100 microorganismes/g d'aliment (d'après la méthode utilisée par Notermans *et al.*, 1998 : Données du rapport de la commission Listeria réalisé par l'AFSSA) :

Type d'aliment :	Fréquence d'exposition /personne/an *:
Produits carnés	2,3
Produits de la mer	0,2
Produits laitiers	5,3
<b>Exposition totale</b>	<b>7,8</b>

\* Calculs réalisés sur la base des données des plans de surveillance de la DGCCRF 1993-1996 et sur la base de la consommation des sujets à risque.

## 122. Les hôtes et le portage asymptomatique

### □ Les hôtes

*L. monocytogenes* s'est aussi adaptée aux conditions environnementales rencontrées chez l'animal et l'Homme. C'est un germe considéré comme peu pathogène chez l'hôte où elle se comporte en tant que parasite intracellulaire facultatif n'exaltant sa virulence en théorie que lorsque les défenses naturelles de l'organisme sont déficientes.

*L. monocytogenes* peut être isolée au niveau fécal, dans les sécrétions rhino-pharyngées ou beaucoup plus rarement dans les sécrétions génitales (Rousset *et al.*, 1994 ; Lwin *et al.*, 1991). Cependant, les isollements oropharyngés et génitaux paraissent marginaux et de ce fait méconnus.

La bactérie colonise donc les appareils digestifs des humains, des animaux à sang chaud et à sang froid dont les animaux sauvages (renards, oiseaux, poissons, crustacés et insectes) et les animaux domestiques, chiens ou chats, tout comme celui des bovins, ovins, et des caprins, sans épargner les porcs et les volailles (Weber *et al.*, 1995). Les animaux pourraient aussi sécréter la bactérie via les mamelles.

□ Le portage asymptomatique

Le portage fécal est le plus documenté chez *L. monocytogenes* compte tenu de l'implication de l'appareil digestif dans le mode de transmission de l'infection. Ainsi l'animal et l'Homme sont potentiellement des porteurs asymptomatiques et nous ne savons pas encore si ce portage peut être à l'origine d'une listériose chez le porteur ou chez une personne faisant éventuellement partie des personnes à risque.

Les seules études expérimentales menées opèrent par inoculation orale d'animaux de laboratoire (principalement la souris (Zachar & Savage, 1979 ; Barbour *et al.*, 2001), le rat (Czuprynski & Balish, 1981), le cobaye (Dussurget *et al.*, 2002) et le poulet (Duchet-Suchaux *et al.*, 1997) mais restent pour la plupart descriptives, sans permettre la mise en évidence des mécanismes qui régissent le portage asymptomatique.

Les données actuelles sur le portage humain de *L. monocytogenes* sont peu nombreuses et restent essentiellement des données épidémiologiques. Les facteurs qui influent sur son apparition, sa durée et les conditions qui font que ce portage restera ou non asymptomatique sont méconnues. Nous dressons donc ici un aperçu des connaissances actuelles sur le portage de *L. monocytogenes* au regard de ce qui a été montré pour cette bactérie, chez l'animal, mais aussi en s'appuyant sur les données obtenues pour d'autres bactéries ubiquistes potentiellement pathogènes retrouvées à l'état de portage chez l'Homme (oral ou fécal) : *S. aureus*, *Yersinia*, *Streptococcus pneumoniae* ou encore *Escherichia coli*.

▪ L'implantation et la persistance du portage :

La notion de portage asymptomatique n'est pas caractérisée avec certitude. Suite à l'ingestion d'un aliment contaminé, les bactéries les plus résistantes ou les plus protégées via l'aliment qu'elle contamine arriveraient à l'intestin où elles sont susceptibles de s'implanter. Chez *L. monocytogenes*, l'excrétion fécale est décrite régulièrement, mais est-ce une colonisation de *Listeria* dans les intestins sur le long terme ou est-ce lié à l'ingestion quotidienne d'aliments contaminés donnant lieu à un passage transitoire par le statut de portage ?

Les principales études se sont donc attachées à montrer dans un premier temps que la colonisation intestinale du pathogène est possible au moins sur le modèle murin (Zachar and Savage, 1979). Ensuite l'analyse des fèces de personnes en bonne santé a permis de montrer qu'une même souche pouvait être isolée des fèces sur une période de quelques jours à plusieurs mois (Bojsen-Moller, 1972 ; Kampelmacher *et al.*, 1972 ; Kampelmacher *et al.*, 1976 ; MacGowan *et al.*, 1991) mais un portage de deux ans et demi a pu être observé chez 2 personnes (Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972).

En ce qui concerne *S. aureus*, la traçabilité des souches a permis d'identifier clairement 2 catégories de porteurs au niveau nasal. Les porteurs persistants (20%) sont toujours colonisés par un même type de souche alors que les porteurs intermittents (60%) sont souvent porteurs mais pas systématiquement par la même souche. Une troisième catégorie comprend des personnes qui a priori ne seront jamais porteuses (20%) (Hu *et al.*, 1995 ; Kluytmans *et al.*, 1997). Cette classification n'est pas encore expliquée chez *S. aureus* et n'a pas été établie pour *L. monocytogenes* au niveau fécal du fait de la difficulté de réaliser des prélèvements à grande échelle et sur le long terme.

Les conditions réglementant le statut de portage de *L. monocytogenes* sont donc floues aujourd'hui car elles sont très certainement multifactorielles. Les facteurs qui peuvent influencer la mise en place et/ou la durée du portage sont classés et décrits dans les paragraphes suivants.

- Les facteurs impliqués dans la colonisation bactérienne

Cette implantation bactérienne pourrait être expliquée par des caractéristiques inhérentes à l'hôte (facteurs génétiques, récepteurs cellulaires au contact de la lumière intestinale facilitant l'adhérence de *L. monocytogenes*, système immunitaire local affaibli, déséquilibre alimentaire, antibiothérapie récente), à l'interférence bactérienne (la flore endogène intestinale selon sa composition pourrait ou non faciliter la présence de *L. monocytogenes*), ou encore à la souche (capacités d'adhérence et de survie en milieu gastrique et intestinal).

Ainsi, un des aspects les plus importants de cette implantation pourrait être une forte adhérence à l'épithélium intestinal. L'interaction entre les composants de l'hôte et de la bactérie pourrait donc être un des points clés du portage :

*Les facteurs de l'hôte impliqués dans la colonisation bactérienne*

Ces facteurs définissent probablement l'existence ou non du portage asymptomatique chez l'hôte dans un premier temps et lorsqu'il y a portage, ils pourraient aussi définir si le portage est persistant ou intermittent. Premièrement, l'existence même des catégories de porteurs de *S. aureus* peut laisser penser que des personnes sont prédisposées ou non génétiquement au portage (Kluytmans, et al., 1997). Cependant, les études réalisées chez des jumeaux monozygotes donnent des résultats divergents sur la question (Peacock *et al.*, 2001).

Chez l'animal, des études réalisées sur le portage de *Salmonella* Enteritidis par plusieurs lignées de poulets ont pu mettre en évidence que certaines lignées étaient plus résistantes que d'autres à la colonisation (Duchet-Suchaux *et al.*, 1997). Des facteurs génétiques de l'animal seraient responsables de l'expression de ces résistances naturelles à la colonisation chez ces lignées de poulets (Berthelot *et al.*, 1998).

De même, les variations et des altérations phénotypiques de l'hôte (dictées par le génotype) comme la nature ou la combinaison des récepteurs présents sur l'épithélium intestinal (ou nasal) pourraient favoriser ou non la colonisation par un pathogène opportuniste. Ainsi, il a été montré que la variabilité d'expression des glycoprotéines, glycolipides et protéoglycanes à la surface des cellules eucaryotes pouvaient influencer les capacités d'adhérence de *S. aureus* à leur surface (Kluytmans *et al.*, 1997). De même, *S. aureus* adhère préférentiellement sur les cellules enveloppées par des mucines (Shuter *et al.*, 1996). Parmi ces récepteurs eucaryotes, les antigènes de groupe sanguin semblent aussi être de bons candidats : ces molécules seraient des récepteurs importants pour l'adhérence aux cellules épithéliales pour *Helicobacter pylori* (Iiver *et al.*, 1998), pour *E. coli* (Lomberg, 1986) et *Candida albicans* (Cameron & Douglas, 1996).

Chez *L. monocytogenes*, les fibronectines (Gilot *et al.*, 1999) et les lectines des cellules épithéliales intestinales (Facinelli *et al.*, 1998) sont des récepteurs impliqués dans l'adhérence de la bactérie. Par ailleurs, une glycoprotéine comme la E-cadhérine s'est révélée être un récepteur eucaryote important pour l'interaction de *L. monocytogenes* avec la cellule épithéliale intestinale via l'Internaline (InIA), un des facteurs pathogènes requis pour l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte (Mengaud *et al.*, 1996b). De même, deux récepteurs cellulaires, gC1q-R/p32 et Met (tyrosine kinase) sont répertoriés comme les récepteurs eucaryotes de InIB, une protéine bactérienne impliquée elle aussi dans l'internalisation de *L. monocytogenes* (Braun *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2000).

Cependant, ces interactions via InlA et InlB sont impliquées a priori dans la virulence et non dans une relation de tolérance vis à vis du tractus digestif.

Parmi les défenses de l'hôte, des peptides antimicrobiens sont produits par les cellules épithéliales notamment chez les mammifères comme les souris, les vaches et les humains. Ils sont contenus dans les sécrétions des voies respiratoires supérieures, du tractus intestinal ou du système génito-urinaire. Ces peptides antimicrobiens comprennent des défensines alpha et bêta, des cecropines, la lactoferrine ou encore le lysozyme. Ces agents antimicrobiens produits par les cellules épithéliales seraient surexprimés face à l'agression bactérienne dans la lumière intestinale (Schonwetter *et al.*, 1995). Le groupe de T. Ganz (Cole *et al.*, 1999) ont pu montrer que les activités antibactériennes des sécrétions nasales étaient variables selon l'individu, ce qui pourrait en partie expliquer que certains individus ne sont jamais porteurs de *S. aureus*.

Les sécrétions contiennent aussi des médiateurs de l'immunité comme les immunoglobulines (IgA). Il est reconnu que les immunoglobulines sécrétoires (sIgA) par exemple s'attachent aux bactéries, parasites et virus pour éviter que ces microorganismes n'adhèrent à l'épithélium et que ces IgA empêchent leur translocation à travers le mucus. Une proportion non négligeable de la population (1 personne sur 600) ne produit pas d'IgA dans les sécrétions et ces personnes sont souvent sujettes à des inflammations de l'intestin pouvant évoluer vers le cancer colique. L'absence d'IgA entraînerait une augmentation des proportions d'une flore plus « agressive » donnant lieu à une activité inflammatoire plus élevée comme c'est le cas de certaines souches d'*E. coli* (Friman *et al.*, 2002). L'absence d'IgA sécrétoires pourraient aussi influencer le portage asymptomatique.

D'autres facteurs produits par les cellules épithéliales sont impliqués dans le système immunitaire local et sont susceptibles d'influencer l'implantation d'un pathogène. C'est en effet en partie le système immunitaire qui détermine qu'elle est la flore tolérée de celle qui doit être éliminée (Didierlaurent *et al.*, 2002). Ainsi, le portage de *S. aureus* serait plus fréquent chez des personnes immunodéprimées ou insulinodépendantes (Peacock *et al.*, 2001). De même, un dysfonctionnement ou une déficience du système immunitaire localisé au niveau des muqueuses intestinales pourraient donc permettre la colonisation de *L. monocytogenes* (l'infection chez les personnes immunodéprimées nécessiterait une déficience générale du système immunitaire).

Des modifications des performances du système immunitaire peuvent être induites par des traitements responsables de l'absence de neutrophiles (Czuprynski & Faith, 2002), par

une modification radicale du régime alimentaire (McCracken & Lorenz, 2001), par des modifications hormonales, par le microenvironnement (présence de cations bivalents). Enfin, tous les facteurs qui perturbent l'équilibre entre la flore intestinale et le système immunitaire local seraient susceptibles d'occasionner la présence et l'implantation d'une flore non-résidente comme les pathogènes tels que *L. monocytogenes* (Cebra, 1999 ; McCracken & Lorenz, 2001).

### L'interférence bactérienne

La microflore normale de l'hôte colonise les membranes de la muqueuse (nasale ou digestive) et constituerait de ce fait par une occupation du terrain, une barrière supplémentaire contre la prolifération non-contrôlée de microorganismes indésirables. Cet effet barrière a été observé lors d'études réalisées sur le modèle murin gnotobiotique : une colonisation préalable du tractus intestinal par *Bacteroides* et *Clostridium* augmenterait les capacités de résistance de la souris contre l'infection occasionnée par *L. monocytogenes* inoculée par voie orale (les doses létales sont d'ailleurs plus élevées sur une souris conventionnelle par rapport à une souris gnotobiotique) (Zachar & Savage, 1979). De plus, une alimentation supplémentée en probiotique et/ou prébiotique pourrait diminuer les infections gastro-intestinales (Collins & Gibson, 1999). Par exemple, pour la souris, l'addition d'inuline ou d'oligofructose dans la ration alimentaire diminue les taux de mortalités suite à l'inoculation de *L. monocytogenes* par le biais de l'interférence avec la flore intestinale (Buddington *et al.*, 2002). A l'inverse, la survie de *L. monocytogenes* est améliorée lorsqu'une souris conventionnelle est traitée au préalable par un antibiotique à spectre large entraînant une diminution drastique de la flore endogène (Zachar & Savage, 1979).

De plus, la production de bactériocines et d'acides volatiles par la flore endogène est l'un des moyens mis en œuvre pour inhiber la colonisation par des pathogènes. Plusieurs bactériocines ont été identifiées comme des peptides antimicrobiens dirigés notamment contre *L. monocytogenes* (bactériocines de classe I comme la nisine et bactériocines de la classe II comme la pédiocine ou la mundticine (Hof *et al.*, 1997 ; Kawamoto *et al.*, 2002). Il a été montré par ailleurs que des bactéries apportées par l'alimentation (probiotiques) telles que certaines souches de *Bifidobacterium*, sont dans un premier temps capable de coloniser l'intestin et ont par ailleurs une activité antimicrobienne susceptible de participer à l'effet barrière contre *Salmonella* Thyphimurium (Lievin *et al.*, 2000).

Un autre mécanisme consiste à interférer dans les fonctions biologiques du microorganisme voisin par inhibition de sa synthèse protéique. Ainsi, un peptide autoinduit

codé par le locus *agr* chez *S. aureus* inhiberait l'expression de ce locus (codant pour un système de signalisation à deux composants, lui même destiné à réguler l'expression de gènes de virulence et de protéines extracellulaires) chez d'autres souches, ce qui constitue un désavantage pour la souche susceptible de vouloir coloniser le site (Ji *et al.*, 1997 ; Lina *et al.*, 2003). Par ce phénomène, il a été démontré qu'une souche particulière de *S. aureus* (502A) n'entraînant aucune infection pouvait coloniser l'épithélium nasal tout en empêchant la colonisation par des souches pathogènes de la même espèce (Peacock *et al.*, 2001). Compte tenu de la présence des systèmes de signalisation à deux composants chez beaucoup de bactéries, il est envisageable qu'un tel système soit effectif chez *L. monocytogenes*.

La compétition pour les éléments nutritifs est aussi un facteur supplémentaire qui n'avantage pas les nouveaux arrivants.

Ainsi, tous les changements qui modifient la composition et/ou les flux métaboliques de la flore résidente pourraient perturber cette première barrière biologique dans un premier temps et par voie de conséquence, perturber le système immunitaire local pour laisser au final le pathogène s'installer (Cebra, 1999). L'âge, la maladie, le stress, un traitement modifiant le pH intragastrique, l'antibiothérapie ou un changement radical d'alimentation sont des facteurs importants dans la modulation de la composition de cette flore endogène (McCracken & Lorenz, 2001). Le portage de *Yersinia* chez l'enfant est plus fréquent que chez l'adulte (Greenwood & Hooper, 1987) : ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que la flore résidente chez l'enfant en bas âge (jusqu'à 2 ans) serait moins variée et moins efficace que la flore établie à l'âge adulte, plus équilibrée et plus stable.

#### Les facteurs de la bactérie favorisant son implantation

Des facteurs bactériens définissent probablement le type de souche qui est porté. L'existence de catégories de porteurs de *S. aureus* (porteur persistant, intermittent ou non porteur) peut aussi laisser présager qu'une classification des souches est possible. Plusieurs études visent donc à évaluer le polymorphisme des souches en essayant de différencier les souches prédestinées au portage par lysotypage, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou encore par l'analyse du polymorphisme de facteurs éventuellement impliqués dans la virulence ou la défense (coagulase, protéine A) (Hu *et al.*, 1995 ; Van Belkum *et al.*, 1997). Ces études ont permis de confirmer que les porteurs persistants portent la même souche sur de longues périodes, mais l'identification de marqueurs caractéristiques n'a jamais été effective.

Chez *L. monocytogenes*, cette classification n'ayant jamais été établie, aucun marqueur n'a été recherché. Par contre, à l'inverse, les marqueurs des souches épidémiques sont activement recherchés mais pas encore identifiés (Herd & Kocks, 2001).

La présence ou l'absence de phénotype adhésif (expression d'adhésines, de capsule ou capacité à former des biofilms) est aussi un critère important pour la colonisation. De nombreuses études se focalisent donc sur la recherche des facteurs d'adhérences. Le groupe de A. Barzilai (Sela *et al.*, 2000) a observé que les capacités d'adhérence et d'internalisation dans la cellule épithéliale *in vitro* étaient significativement plus importantes chez des souches de *Streptococcus pyogenes* isolées à l'état de portage que chez des souches cliniques. L'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte serait selon eux le facteur qui permet leur persistance dans le système digestif même après un traitement par antibiothérapie.

Chez *Salmonella* Thyphimurium, un contaminant fécal récurrent notamment véhiculé par le bétail et la volaille, plusieurs déterminants de la colonisation et de la persistance au niveau intestinal ont été identifiés (Kingsley *et al.*, 2003). La protéine ShdA est une protéine associée à la membrane externe destinée à se lier à la fibronectine et son gène (*shdA*) est localisé au sein d'un îlot génétique comportant plusieurs autres gènes impliqués dans la colonisation intestinale (*ratB*, *sivH*). D'autres auteurs ont identifié chez *Streptococcus pneumoniae* une protéine bactérienne, PspC, impliquée à la fois dans la colonisation de l'épithélium et dans la virulence (Balachandran *et al.*, 2002). Par contre, la délétion de 2 gènes impliqués dans le phénotype invasif de la bactérie (*pspA* et *ply*) leur permettait d'obtenir une souche effectivement moins invasive mais qui induisait un portage plus fréquent. A l'inverse de Sela *et al.*, Balachandran et ses collaborateurs suggèrent donc qu'une bactérie trop invasive stimulerait davantage l'inflammation menant ainsi à l'éradication du pathogène, alors qu'une souche peu invasive serait tolérée dans le tractus digestif.

Chez *L. monocytogenes*, de nombreux composants bactériens sont impliqués dans l'interaction avec la cellule eucaryote. Les mieux connus sont ceux appartenant à la famille des internalines (InlA, InlB, InlC...). Ils sont cependant répertoriés comme des facteurs de virulence nécessaires à l'adhérence et l'internalisation de la bactérie dans de nombreux types de cellules dont les cellules épithéliales (Mengaud *et al.*, 1996b ; Braun *et al.*, 1998). L' $\alpha$ -D-galactose présent à la surface bactérienne participerait à l'interaction avec des cellules de la lignée HepG2, et des adhésines permettraient l'interaction avec des fibronectines humaines (Gilot *et al.*, 1999).

Enfin, tous les facteurs qui favorisent l'adaptation de *L. monocytogenes* à son environnement et plus particulièrement l'environnement rencontré dans le tractus digestif, sont susceptibles d'augmenter les chances de la bactérie d'y survivre et de s'y implanter. Ainsi, des facteurs comme la glutamate décarboxylase (Cotter *et al.*, 2001a) ou la bile salt hydrolase (BSH) seraient a priori utiles à la bactérie pour sa persistance dans l'intestin. En effet, il a été montré que la délétion du gène *bsh* chez *L. monocytogenes* entraînait une baisse du portage fécal de la bactérie chez le cobaye (Dussurget *et al.*, 2002). De même, il a été montré que la listériolysine O (LLO), connue habituellement pour son rôle dans la virulence de *L. monocytogenes* une fois internalisée, est aussi impliquée dans la colonisation du tractus intestinal : en effet, il a été montré que LLO pouvait stimuler la production de mucus par les cellules spécialisées de l'épithélium intestinal sans nécessairement que la bactérie soit internalisée dans la cellule. Ce mucus servirait à la fois de refuge et de réserve de nutriments pour la bactérie (Coconnier *et al.*, 1998). Il est possible d'envisager qu'une souche produisant des quantités importantes de LLO pourrait ainsi s'implanter plus facilement. Cependant, la relation dose-réponse n'a pas été étudiée.

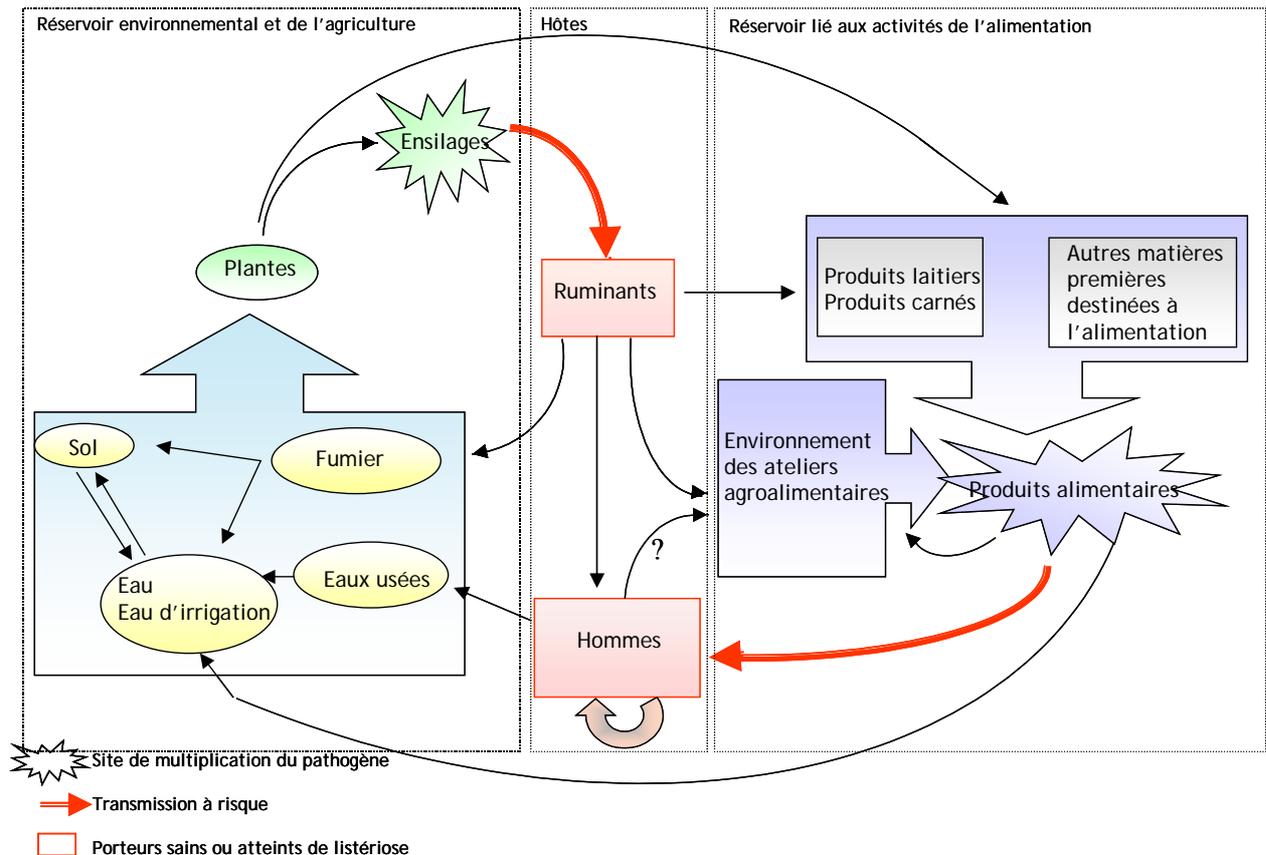
### 13. Epidémiologie

#### 131. Données épidémiologiques sur le portage asymptomatique de *L. monocytogenes*

Dix à 30% des bovins, ovins, porcins et poulets hébergeraient naturellement la bactérie selon les pays et les études réalisées. Chez les femelles laitières, le portage de *L. monocytogenes* au niveau des fèces et au niveau des mamelles serait particulièrement fréquent vers la fin de la gestation, période au cours de laquelle des modifications hormonales réduiraient le niveau global de l'immunité des animaux.

L'absence de tout symptôme rend l'identification des animaux excréteurs difficile. Ce phénomène des porteurs sains revêt donc une importance particulière dans la mesure où ces animaux et leur lait sont destinés à l'alimentation humaine. L'aliment est donc un vecteur de transmission très important (figure 1) :

Figure 1 : Rôle de la chaîne alimentaire dans la dispersion du pathogène



Les études relatant l'existence du portage asymptomatique chez l'Homme sont nombreuses sur le portage fécal mais beaucoup plus rares sur le portage oral et génital. Le tableau 4 synthétise les résultats obtenus :

Ainsi, 1 à 6% de la population générale hébergeraient *L. monocytogenes* au niveau fécal ou oral. Quarante pour cents des porteurs seraient colonisés par plusieurs types de souches simultanément (Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972). Majoritairement, les sérotypes 4b seraient isolés (50%) d'après le groupe de D. S. Reeves (MacGowan *et al.*, 1991), alors que Kampelmacher et Lamont (Lamont & Postlethwaite, 1986) suggèrent une prédominance des sérotypes 1/2 et 3. Parmi les autres espèces du genre, l'isolement de *L. innocua* serait fréquent alors que celui de *L. welshimeri* serait plus rare (MacGowan *et al.*, 1991).

**Tableau 4 : Isolement de *L. monocytogenes* dans les matières fécales chez l'homme**

Catégories de Populations observées :	Portage (%)	Particularités	Auteurs
Population générale	0,8% 5%	1 prélèvement/personne. 505 volontaires autrichiens 1 prélèvement /personne	(Grif <i>et al.</i> , 2001) (Schlech <i>et al.</i> , 1983)
<b>Population</b>			
<input type="checkbox"/> urbaine	1%	Pas de différence significative selon le mode de vie ou la géographie ( 1prélèvement, 1147 personnes)	(Bojsen-Moller, 1972)
<input type="checkbox"/> rurale	1%		
<input type="checkbox"/> <b>Personnes travaillant en milieu hospitalier</b>	5%	Isolement en période non épidémique sur 177 personnes	(Durst & Zimanyi, 1976)
<input type="checkbox"/> <b>en abattoir</b>	4,8%	1 prélèvement, 1147 personnes	(Bojsen-Moller, 1972)
<input type="checkbox"/> <b>en contact régulier avec la bactérie (laboratoire)</b>	77%	Prélèvements sur 8 semaines pour 26 personnes de chaque catégorie: Les personnes en contact régulier sont des porteurs plus réguliers (2 personnes porteuses pendant 30 mois)	(Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972)
<input type="checkbox"/> <b>en milieu administratif</b>	61,5%		
<b>Personnes proches d'un patient atteint de listériose</b>	26%	341 personnes examinées, souches isolées souvent différentes du malade (8 prélèvements par personne)	(Bojsen-Moller, 1972)
	21%	82 personnes examinées. Les souches sont souvent les mêmes que celles du malade (1 prélèvement par personne)	(Schuchat <i>et al.</i> , 1993)
<b>Patients hospitalisés</b>		700 personnes. Pas de différence significative selon le groupe.	
<input type="checkbox"/> <b>transplantées hémodialysés</b>	2,5%	40% sont colonisés par au moins 2 souches <i>Listeria spp.</i> (le pourcentage de patients avec diarrhées n'est pas significativement différent (1,8%))	(MacGowan <i>et al.</i> , 1991)
<input type="checkbox"/> <b>médecine générale</b>	1,8%		
	1,2%	1034 personnes examinées (le pourcentage de patients avec diarrhées n'est pas significativement différent (1%))	(Bojsen-Moller, 1972)
	0,5%	1 prélèvement chez 932 patients	(Rousset <i>et al.</i> , 1994)
<b>Personnes</b>			
<input type="checkbox"/> <b>en bonne santé</b>	0,8%	Les diarrhées ne sont pas plus fréquentes chez les porteurs et pas plus liées au portage de <i>L. innocua</i>	(Muller, 1990)
<input type="checkbox"/> <b>avec diarrhées</b>	0,6%		
		Confirmé par :	(Bojsen-Moller, 1972) (Schuchat, <i>et al.</i> , 1993)
<b>Femmes</b>			
<input type="checkbox"/> <b>non-enceintes</b>	3,4%	La différence n'est pas significative, 1 prélèvement par femme (60 et 54 femmes examinées respectivement)	(Lamont & Postlethwaite, 1986)
<input type="checkbox"/> <b>enceintes</b>	2%		
	44%	Le nombre de prélèvement est supérieur : 9 (12% des prélèvements sont positifs sur 137 femmes) 2 à 3 femmes sont porteuses tout le long de la grossesse. Pas de cas de listériose	(Kampelmacher <i>et al.</i> , 1972)
<b>Femmes enceintes</b>			
<input type="checkbox"/> <b>portage faecal vaginal</b>	1,6% 0%	Les sites colonisés ne seraient pas liés 1 prélèvement par femme	(Lwin <i>et al.</i> , 1991)
<input type="checkbox"/> <b>au contact d'animaux de compagnie</b>	39%	Plusieurs prélèvements sont réalisés : 5 à 7 au cours de la grossesse 8,8% des échantillons sont positifs.	(Kampelmacher <i>et al.</i> , 1976)
<input type="checkbox"/> <b>au contact d'animaux domestiques (élevage)</b>	32%		
<input type="checkbox"/> <b>sans animaux</b>	34%		

Ces pourcentages seraient plus élevés en période épidémique (MacGowan *et al.*, 1991). Selon la catégorie de personnes considérées, les proportions de portage sont très différentes (âge, sexe, lieu d'activité professionnelle, personnes au contact d'animaux ou de

malades atteints de listériose, femmes enceintes), mais ils sont tout aussi variables selon les études réalisées pour une même catégorie de personne. Ces différences peuvent s'expliquer dans un premier temps par la diversité des techniques d'isolement utilisées pour la recherche de *L. monocytogenes* dans les fèces. Certaines études privilégient en effet l'enrichissement à froid (+4°C) sur des périodes variables, alors que d'autres utilisent préférentiellement des milieux d'enrichissement sélectifs à 37°C pendant quelques jours. Les différences constatées proviennent aussi pour une large part du nombre de prélèvements effectués chez une même personne et de la durée sur laquelle l'étude est réalisée : généralement l'augmentation du nombre de prélèvements sur une période donnée augmente considérablement les chances de constater la présence du pathogène (Fabiani *et al.*, 1976 ; Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972 ; Ortel, 1975). En effet, les plus forts taux (jusqu'à 77%) seraient liés à la fréquence des prélèvements réalisée sur les mêmes personnes. Ce pourcentage correspondait en fait au nombre de personnes positives au moins 1 fois au cours des 8 semaines (Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972). C'est sur la base de ces constatations que la durée de portage a été établie (quelques jours à quelques semaines en général).

Les porteurs les plus réguliers seraient les personnels des abattoirs et des laboratoires où sont manipulés les aliments. Cependant les taux de porteurs ne seraient pas significativement plus élevés (Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972). Par contre, 21% des proches d'un patient atteint de listériose seraient porteurs et parfois même de la même souche que celle du malade, ce qui suggère que la transmission manu-portée via l'alimentation est possible (Schuchat *et al.*, 1993). Cependant la survenue d'un deuxième cas de listériose n'a jamais été observée parmi les proches d'un malade (Bojsen-Moller, 1972 ; Schuchat *et al.*, 1993).

### 132. Données épidémiologiques concernant les listérioses animales

La transmission alimentaire n'est reconnue que depuis 1970. Ainsi, la contamination se fait par voie digestive et les ensilages de mauvaise qualité sont une source majeure de germes (Fenlon, 1985). En effet, les ruminants domestiqués se contaminent souvent en consommant du maïs ensilé propice au développement de *L. monocytogenes*. Ils jouent de ce fait très certainement un rôle dans la maintenance de la présence de *Listeria sp.* dans l'environnement rural selon un cycle continu fécal-oral (Fenlon, 1999) (figure 1).

133. Données épidémiologiques concernant les listérioses humaines :

Le suivi, depuis de nombreuses années, des cas de listériose fait apparaître plusieurs caractéristiques épidémiologiques liées à cette bactérie :

□ Quelques définitions

Deux catégories principales de malades atteints de listériose ont été définies selon la souche de *L. monocytogenes* mise en cause : une listériose est dite épidémique lorsqu'une seule et même souche est responsable d'un nombre inhabituel de cas de listériose dans une période de temps donnée. La souche est alors qualifiée de souche épidémique. Lors de ces bouffées épidémiques, il est suggéré que la source de contamination est elle aussi commune (l'aliment le plus souvent). La listériose est sporadique lorsque la souche n'est pas reliée à une épidémie. Ainsi, des cas épisodiques et des cas épidémiques se succèdent au cours du temps sans fluctuation saisonnière particulière. Les épidémies peuvent regrouper moins d'une vingtaine de personnes comme plusieurs centaines de personnes et ces épidémies peuvent évoluer sur des périodes prolongées (4 ans en Suisse (Bula *et al.*, 1995)) (tableau 5).

**Tableau 5 : Les principales épidémies de listériose d'origine alimentaire depuis 1980 et les épidémies françaises.**

Année(s)	Localisation (Référence)	Nombre de cas	Cas périnataux, %	Taux de mortalité, %	Sources de contamination
1980-1981	<b>Canada</b> , Provinces maritimes (Schlech <i>et al.</i> , 1983)	41	83	34	Salade de chou cru
1983	<b>USA</b> , Massachusetts (Fleming <i>et al.</i> , 1985)	49	14	29	Lait pasteurisé
1983-1987	<b>Suisse</b> , Vaud (Bula <i>et al.</i> , 1995)	57	9	32	Fromage à pâte molle
1985	<b>USA</b> , Californie (1985) (Linnan <i>et al.</i> , 1988)	142	65	34	Fromage mexicain
1986-1987	<b>Pennsylvanie</b> (Schwartz <i>et al.</i> , 1989)	36	11	44	Non décrit
1987-1989	<b>Irlande</b> (McLauchlin <i>et al.</i> , 1991)	> 350			Pâté
1989	<b>Connecticut</b> <sup>a</sup> (Riedo <i>et al.</i> , 1994)	10	20	10	Crevettes
1992	<b>France</b> (1993) (Jacquet <i>et al.</i> , 1995)	276	33		Langue de porc en gelée
1993	<b>France</b> (Goulet <i>et al.</i> , 1998)	38	82	32	Rillettes
1993	<b>Italie</b> <sup>a</sup> (Salamina <i>et al.</i> , 1996)	39			Salade de riz
1994	<b>Illinois</b> <sup>a</sup> (Dalton <i>et al.</i> , 1997)	45			Lait chocolaté
1995	<b>France</b> (Goulet <i>et al.</i> , 1995)	37			Fromage à pâte molle
1997	<b>France</b> (Jacquet <i>et al.</i> , 1998)	14			Fromage à pâte molle
1997	<b>Italie</b> <sup>a</sup> (Aureli <i>et al.</i> , 2000)	1566			Salade de maïs
1998-1999	<b>USA</b> (1999)	101	12	21	Hot Dogs, plats cuisinés
1999	<b>France</b> (Goulet <i>et al.</i> , 2001)	3			Fromage de type époisses
1999	<b>France</b> (De Valk <i>et al.</i> , 2000)	6			Rillettes
1999-2000	<b>France</b> (De Valk <i>et al.</i> , 2001)	32	28	31	Langue de porc en gelée
2002	<b>France</b> (non publié)	9		11	Charcuteries
2002-2003	<b>France</b> (non publié)	7	28	14	?

<sup>a</sup> Epidémie de gastro-entérites fébriles avec une durée d'incubation courte.

□ La transmission de la listériose

Chez l'Homme, le mode de contamination alimentaire n'a été démontré que dans le début des années 80 alors que les incidents épidémiques commençaient à se multiplier.

Ainsi, un lien direct entre la contamination du chou, la listériose des moutons et les listérioses chez l'Homme a pu être établi lors d'une épidémie survenue au Canada en 1981 (Schlech *et al.*, 1983).

La prise en compte de la transmission alimentaire par le monde de l'industrie agroalimentaire n'est réelle que depuis 1985, une année au cours de laquelle une épidémie survenue en Californie avait engendré 142 cas de listériose par ingestion de fromage de type mexicain. Le tableau 5 rassemble les principales épidémies d'origine alimentaire survenues en France et à l'étranger depuis 1985. Par ailleurs, des produits alimentaires ont aussi été incriminés pour un certain nombre de cas de listérioses sporadiques.

D'autres cas sporadiques mais qui restent rares seraient liés à une infection nosocomiale. Enfin, la transmission directe n'a été observée que dans des situations particulières : la transmission de la mère au fœtus peut se faire par voie digestive ou respiratoire (infection amniotique, aspiration de germes situés dans le col ou le vagin). Une transmission par contact est possible (cas de listériose chez des hospitaliers au cours d'un accouchement, contamination d'un fermier au cours d'un vêlage, manipulation d'un animal atteint de listériose par un vétérinaire). D'autres types de transmission ne sont pas à exclure.

- Une fréquence faible mais un taux de mortalité important (tableau 6)

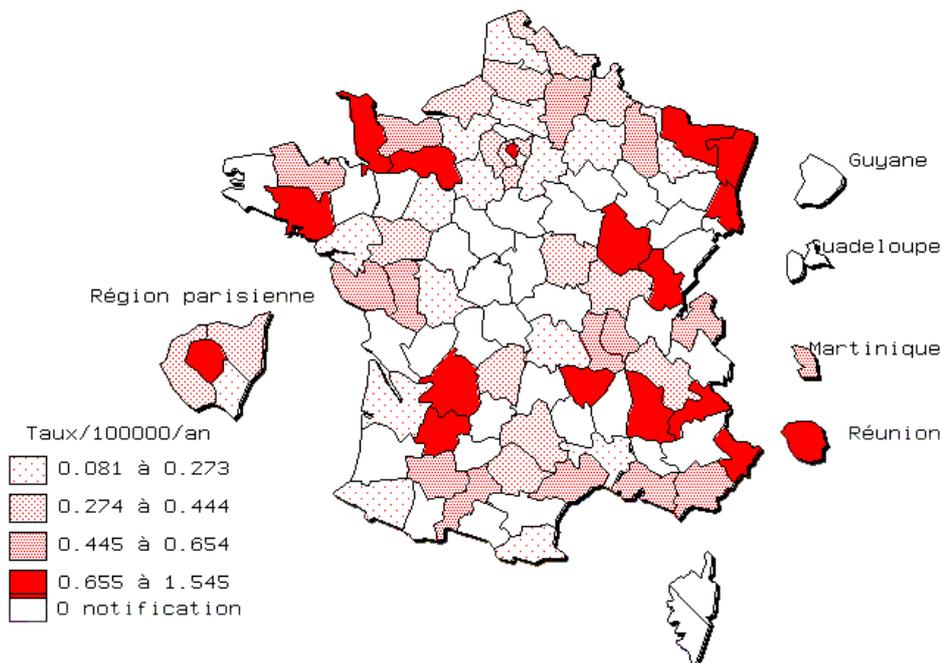
En comparaison des quantités de *L. monocytogenes* ingérés quotidiennement (cf. tableau 2), le nombre de cas de listériose est considéré comme faible. Cependant la listériose est fatale dans environ 20 à 30% des cas, ce qui reste élevé en comparaison avec d'autres pathogènes alimentaires :

**Tableau 6 : Incidence de la listériose en France**

\* Données issues du CNR de Nantes, \*\* Données issues du CNR des *Listeria*, Institut Pasteur de Paris

Année	Nombre de cas sporadiques	Nombre de cas épidémiques	Incidence (par million d'habitants)	% de formes périnatales
1987	366*		6,3	51
1988	397*		7,1	43
1989	409*		7,3	47
1990	305*		5,4	36
1991	387*		6,8	44
1992	181**	276	7,9	34
1993	413**	38	7,9	32
1994	336**		5,9	22
1995	264**	37	5,2	20
1996	220**		3,8	27
1997	214**	14	3,9	23
1998	230**		3,8	20
1999	270**	41	4,4	24
2000	216**			22

En France, le profil général des cas de listériose a évolué comme dans la plupart des autres pays industrialisés où la listériose est observée (cf. tableau 5) : le nombre total de cas se stabilise : après un pic en 1992 (457 cas) et en 1993 (451 cas), il a diminué de moitié (228 et 230 cas respectivement en 1997 et 1998) ; l'incidence par million d'habitant est passée de plus de 10 cas entre 1984 et 1988 à 3,8 cas en 1998. Chaque semaine, les cas sont répertoriés par l'Institut de Veille Sanitaire et analysés afin de signaler les cas groupés (figure 2).



**Figure 2 : Taux de notification des cas de listériose par départements sur 52 semaines (12/2002 à 11/2003)**

Les taux pour 100000 habitants sont calculés sur les populations totales du recensement de l'INSEE de 1999. Institut de Veille Sanitaire.

Les épidémies sont aujourd'hui rapidement contenues : après celles de 1992 (279 cas), les cas épidémiques ont été moins fréquents (absence en 1994, 1996, 1998) et moins nombreux (38 en 1993, 36 en 1995, 14 en 1997, 41 en cumulé sur les années 1999 et 2000 et 16 sur les années 2002 et 2003). Par contre, le nombre de cas sporadiques évolue moins. En effet, l'augmentation des populations à risque (généralisation des traitements immunosuppresseurs, vieillissement de la population) compense difficilement les résultats obtenus en matière de prévention.

Enfin, le nombre de cas survenant chez les femmes enceintes (formes périnatales) diminuerait en nombre et en pourcentage depuis 1994. Il est voisin de 10 à 20% depuis 1998 (22% en 2000) alors qu'il pouvait avoisiner les 50% en 1987.

□ Dose infectieuse

La longue période d'incubation précédant l'apparition des symptômes ainsi que la capacité de *Listeria* à se multiplier dans l'aliment même conservé à +4°C rendent l'estimation de la densité bactérienne dans l'aliment difficile à établir. En conséquence, la relation dose-réponse est inconnue. La seule étude réalisée chez des volontaires humains sains s'est faite avec une souche à virulence atténuée mais le but était d'observer la réponse immunitaire de l'hôte (Angelakopoulos *et al.*, 2002). D'après l'analyse d'une épidémie liée à la consommation de beurre, la dose infectieuse serait de 10 à 10<sup>4</sup> Colonies Formant Unités/ml pour la population dite à risque et de 10<sup>5</sup> à 10<sup>7</sup> pour le reste de la population (Maijala *et al.*, 2001).

Les résultats des dénombrements dans les aliments montrent que les cas de listérioses sont généralement dus à un aliment contaminé avec au moins 100 *L. monocytogenes* par gramme ou par millilitre (Rapport de la commission *Listeria* réalisé par l'AFSSA). Ce qui suggère que seuls les aliments fortement contaminés présentent un risque réel. Cependant, cette règle n'est pas fiable car des cas de listérioses dus à des aliments faiblement contaminés ont été répertoriés, et à l'inverse, même l'exposition à de fortes doses de *L. monocytogenes* chez des groupes de personnes considérées comme vulnérables, ne conduit pas obligatoirement à une listériose déclarée. L'absence de *Listeria* dans les produits alimentaires serait souhaitable mais paraît peu réalisable pour certaines denrées. Ainsi, il est précisé dans l'arrêté du 30 mars 1994 les critères applicables selon la nature des produits en production et en distribution. En production, l'absence de bactéries dans 25g (ou exceptionnellement dans un gramme) est obligatoire. En distribution, le seuil est, selon les types d'aliments et leur utilisation (à manger cru ou cuit), soit de zéro bactérie dans 25g, soit égal au maximum à 100 bactéries par gramme. De plus en plus de producteurs réalisent des études de vieillissement qui permettent de vérifier que *L. monocytogenes* se maintient à ce taux jusqu'à la date limite de consommation..

Sur le modèle animal, les doses infectieuses données par la DL50 (Dose entraînant la mort de 50% des animaux) sont variables selon le modèle et selon la voie d'inoculation : chez la souris l'inoculation orale de la souche EGD-e, à savoir la méthode la plus pertinente,

donne des DL50 supérieures à  $10^{10}$  (Lecuit *et al.*, 2001). L'inoculation par voie intraveineuse donne une DL50 voisine de  $5 \times 10^5$  bactéries (souche 10403S) alors que l'inoculation par voie nasale donne une DL50 de  $2 \times 10^8$  bactéries (Mizuki *et al.*, 2002).

□ L'intérêt du typage de *L. monocytogenes* pour sa surveillance

Depuis que la déclaration des listérioses est obligatoire, les biologistes transmettent au centre national de référence des *Listeria* (Paul Martin, Institut Pasteur, Paris) les souches de *L. monocytogenes* isolées des patients. Ainsi, chaque année, un bilan épidémiologique peut être fourni sur la base de l'analyse du typage de ces souches ainsi que celles obtenues lors des autocontrôles effectués par les industriels de l'agroalimentaire, par les services vétérinaires ou par les laboratoires de la Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes. La reconnaissance des souches typées permet d'établir des liens entre des souches pour diagnostiquer les prémices d'une épidémie et des liens entre la souche isolée chez le patient et la souche éventuellement retrouvée dans les produits alimentaires.

Un groupe de travail a été constitué (World Health Organization (WHO) Multicentre *L. monocytogenes* subtyping study) et a été chargé de faire le bilan sur les techniques de typage utilisées et utilisables par une majorité de laboratoires pour constituer une base de donnée représentative et comparable des souches de *Listeria* isolées. La meilleure technique sera celle qui combinera la meilleure reproductibilité et un pouvoir discriminant le plus élevé possible.

Classiquement le sérotype (profil des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) exprimés sur la surface cellulaire), la lysotypie (profil de sensibilité à divers bactériophages) et éventuellement l'antibiogramme (profil de résistance aux antibiotiques) de la souche à analyser sont réalisés dans un premier temps. L'analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes (Multilocus Enzyme Electrophoresis) a aussi parfois été utilisé pour caractériser les estérases bactériennes par exemple. Cependant, ces méthodes phénotypiques ne sont pas disponibles dans la majeure partie des laboratoires. Ensuite, une proportion importante de souches ne sont pas typables par ces techniques (seulement 34 à 80% des souches pour le sérotype (Brosch *et al.*, 1991) et 20 à 51% pour le typage de phage selon les résultats du WHO Multicentre *L. monocytogenes* Subtyping study). Le sérotypage reste cependant une méthode de référence car il est observé que sur les 13 sérotypes recensés, 95% des cas de listérioses sont liés à des souches de sérotype 1/2a, 1/2b et 4b. Curieusement, ces analyses

révèlent que 70 à 90% des souches isolées d'aliment appartiennent au sérotype 1/2 alors que la majorité des souches ayant occasionné une listériose appartiennent au sérotype 4 (Gilot *et al.*, 1996). Cependant, retrouver une souche de sérotype 4 dans un aliment ne suffit pas pour la considérer comme potentiellement dangereuse. Ensuite, ces méthodes ne sont pas assez discriminantes pour identifier une souche comme vecteur de contamination par exemple (Kerouanton *et al.*, 1998).

Des méthodes génotypiques ont été mises au point pour affiner les résultats. Elles sont basées sur le polymorphisme de l'ADN total des souches. Premièrement, l'ADN chromosomique peut être clivé par des enzymes de restriction et les produits de la digestion sont visualisés directement après migration électrophorétique (REA : Chromosomal DNA restriction endonuclease analysis et PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis). La technique similaire couplée à la migration en champs pulsé (PFGE) améliore la résolution et s'est révélée reproductible (Brosch *et al.*, 1991). Ainsi la PFGE a été utilisée avec succès pour identifier la localisation géographique et temporelle de souches au sein d'aliments et d'usines agroalimentaires (Autio *et al.*, 2002) et leur éventuelle implication dans l'apparition de cas de listériose (Boerlin *et al.*, 1997). Par ailleurs, la PFGE a permis de mettre en évidence deux divisions génomiques au sein de l'espèce *L. monocytogenes* dans lesquelles les souches sont séparées en fonction de leur sérovar (division I : 1/2a, 1/2c, 3a, 3c et division II : 1/2b, 3b, 4b, 4d et 4e) (Brosch *et al.*, 1994).

La RFLP est applicable pour observer le polymorphisme des ARN ou ADN ribosomiaux pour lequel elle a été rebaptisée ribotypage dans ce cas particulier. La méthode RFLP est réputée reproductible et facile à réaliser mais la discrimination apportée par cette technique serait plus intéressante pour le sérotype 1 que pour le sérotype 4. Le ribotypage a été automatisé et devient une méthode permettant l'analyse à grande échelle pour peu que le laboratoire qui s'équipe arrive à surmonter les coûts de revient. La reproductibilité de l'automate autorise la constitution d'une base de donnée. De même, 3 lignées incluant des sérovares différents ont été mises en évidence (lignée 1 : 1/2b, 3b, 3c, 4b ; lignée 2 : 1/2a, 1/2c, 3a ; lignée 3 : 4a et 4c) (Nadon *et al.*, 2001).

D'autres techniques génotypiques sont basées sur l'amplification de régions spécifiques de l'ADN par PCR. La technique RAPD est fondée sur l'utilisation d'amorces choisies au hasard. La méthode est simple et peu coûteuse mais manquerait de reproductibilité (Wernars *et al.*, 1996). D'autres techniques dérivant de l'utilisation de la PCR avec des amorces spécifiques se sont développées. Ainsi, la PCR-RFLP ainsi que le séquençage des produits amplifiés permettent d'observer le polymorphisme de gènes sélectionnés (*hly*, *inlA*,

*inlB*, *flaA*, *iap*...) et de retrouver dans la plupart des cas une structure clonale des souches de *L. monocytogenes* (Ericsson, et al., 1995 ; Vines & Swaminathan, 1998 ; Unnerstad *et al.*, 1999 ; Ericsson *et al.*, 2000 ; Unnerstad *et al.*, 2001 ; Cai *et al.*, 2002). La PCR-RFLP a aussi été utilisée pour étudier les régions des espaces intergéniques (IGS) entre l'ARNr 16S/23S des espèces du genre *Listeria* (Graham *et al.*, 1996). Les techniques basées sur l'amplification des éléments répétés en palindrome extragéniques (REP-PCR pour Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) ou des séquences consensus répétées intergéniques des entérobactéries (ERIC-PCR pour « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR ») ont permis la division des souches de *L. monocytogenes* en deux groupes différenciant ainsi les souches d'origine humaine ou animale, des souches isolées des aliments. A l'intérieur de ces deux clusters, les souches pourraient même être classées selon leur sérotype (Jersek *et al.*, 1999). Enfin la IRS-PCR (infrequent restriction site-PCR) serait une des méthodes les plus discriminante pour différencier les souches responsables de listérioses non invasives (Franciosa *et al.*, 2001).

Enfin d'autres auteurs combinent les méthodes de typage décrites précédemment (Kerouanton *et al.*, 1998 ; Louie *et al.*, 1996). Wiedmann *et al.* (Wiedmann *et al.*, 1997), par une combinaison de la PCR-RFLP sur 3 gènes de virulence (*hly*, *actA* et *inlA*) et du ribotypage, ont décrit l'obtention de 3 grands lignages génétiques distincts au sein des souches de *L. monocytogenes* typées. Le lignage 1 regrouperait principalement des souches d'origine humaine avec toutes les souches épidémiques alors que le lignage 3 ne contiendrait aucune souche d'origine humaine. Le lignage 2 rassemblerait des isollements d'animaux et des souches sporadiques pour lesquelles la dissémination de la souche dans un tapis cellulaire *in vitro* est plus restreinte. Les souches d'origine animale seraient retrouvées dans les 3 lignages. Les auteurs suggèrent que les souches peuvent être caractérisées par des spécificités d'hôte et des potentiels pathogéniques variables en fonction des lignages. D'après le séquençage de l'ARN 16S, le 3<sup>ème</sup> lignage pourrait correspondre à une sous-espèce de *L. monocytogenes*. Jeffers *et al.* (2001) retrouvent ces 3 lignages avec des caractéristiques similaires par l'utilisation de l'analyse RFLP de l'ADNr et de la RAPD.

Le groupe de R. Quentin (Mereghetti *et al.*, 2002), par l'utilisation de l'analyse RFLP de l'ADNr et la RAPD confirme l'existence de 3 divisions dans la structure de la population de *L. monocytogenes* et suggèrent que l'une d'entre elles est une sous population de la première division. La division I, la plus homogène, rassemblerait des souches de sérotype 1/2b, 4b, 3b et 4a. La division II contiendrait majoritairement des souches de sérotype 1/2a,

1/2c et 3a. Cette 2<sup>ème</sup> division, du fait de son hétérogénéité, aurait évolué plus rapidement que la division I.

Les typages des souches de séro groupe 4 montrent que ces souches sont relativement proches tant du point de vue phénotypique que du point de vue génotypique, mais aucun élément ne permet à ce jour de comprendre pourquoi ces souches ont effectivement un pouvoir pathogène particulier (Ericsson *et al.*, 1995 ; Herd & Kocks, 2001).

Les méthodes de typage en combinaison avec le système de surveillance mis en place en France ont déjà fait leurs preuves puisque les délais entre l'identification des premiers cas de listériose et l'identification de la souche responsable et du produit alimentaire incriminé ont considérablement diminués : ce gain de temps est important pour contenir une épidémie et il est probablement à l'origine de la diminution de la fréquence et de l'importance des bouffées épidémiques en France. De même les efforts consentis pour améliorer l'information des personnes à risque et des aliments à risque et la transparence des campagnes de prélèvement menées dans les entreprises agroalimentaires contribue à améliorer la lutte contre la listériose.

## **2. Le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* : exploitation des fonctions cellulaires de l'hôte**

### **21. La listériose : pathologies animales et humaines**

Des infections ont été décrites, dans pratiquement tous les pays, chez plus de 40 espèces d'animaux domestiques et sauvages, mais la bactérie n'a été reconnue comme source d'infection humaine qu'en 1960, soit une trentaine d'année après la découverte des premiers cas de listériose humaine. Son pouvoir pathogène est à peu près le même chez l'Homme et l'animal avec un double tropisme : le système nerveux et l'unité fœtoplacentaire.

#### **211. Les pathologies animales (Slutsker & Schuchat, 1999)**

Chez les ruminants domestiques, pour qui les infections à *Listeria sp.* sont particulièrement importantes, les deux espèces les plus fréquentes sont *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* est responsable de méningo-encéphalites, de septicémies, d'avortements et de mammites. L'évolution de la maladie varie selon la forme clinique mais dans la forme nerveuse, le pourcentage de mortalité est proche de 100%.

Les méningo-encéphalites sont courantes chez les adultes et chez les jeunes animaux. Elles se traduisent par une prostration, un port de la tête (l'animal regarde ses flancs), une marche en cercle (d'où le nom de circling disease donné par Gill en 1933), une perte d'équilibre, une paralysie faciale et souvent unilatérale. La période d'incubation est de l'ordre de 2 à 6 semaines. Chez les ovins et les caprins, la mort intervient en 2 à 3 jours mais chez les bovins, la durée d'évolution est plus longue (4 à 14 jours) (Vazquez-Boland *et al.*, 2001b).

Les septicémies sont observées chez les animaux nouveau-nés, chez les jeunes et chez les brebis gravides.

Les avortements sont tardifs et résultent de la contamination de l'utérus par voie hématogène. La durée d'incubation est de l'ordre de 5 à 12 jours, les animaux sont affaiblis, anorexiques, ils peuvent présenter de la fièvre, une diarrhée profuse. Parfois, aucun signe clinique ne se manifeste.

Chez les monogastriques, les listérioses sont rares mais des septicémies et des méningo-encéphalites ont été décrites chez plusieurs espèces (chiens, chats, porcelets, poulains).

Chez les oiseaux, les infections provoquent une septicémie, des nécroses du foie, des nécroses du myocarde et des péricardites (Basher *et al.*, 1983). L'infection peut se traduire par des encéphalites (abattement, chute sur le côté, mouvements désordonnés des membres, paralysies unilatérales et bilatérales) notamment chez les poulets nouveau-nés qu'ils aient été naturellement infectés ou inoculés expérimentalement dans la cavité chorioallantoïdienne de l'œuf embryonné (Basher *et al.*, 1984).

Chez les lapins et les rongeurs de laboratoire, la forme la plus fréquente est une septicémie et chez le lapin on observe une monocytose marquée qui est à l'origine de l'appellation *monocytogenes*. Chez le cobaye, les infections spontanées sont rares mais quelques cas de septicémies et de conjonctivites ont été décrits.

212. Les pathologies humaines (Slutsker & Schuchat, 1999) (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001b)

L'infection par *L. monocytogenes* se manifeste essentiellement chez des individus présentant un terrain d'immunodéficience. En dehors des périodes épidémiques, l'infection s'accompagne de syndromes de type grippal, et se résorbe en général spontanément chez des personnes immunocompétentes. Par contre chez les sujets immunodéprimés (maladies hépatiques, alcoolisme, cancers, traitement immunodépresseurs pour les receveurs de greffes ou les personnes sous chimiothérapie), *L. monocytogenes* peut engendrer des infections graves : atteintes du système nerveux central ou septicémies principalement. Pourtant, il arrive aussi que la listériose frappe des individus chez lesquels aucune déficience immunitaire ne soit mise en évidence.

□ La listériose fœto-maternelle

La maladie maternelle est bénigne mais les conséquences sont très graves pour l'enfant : la mère porteuse de la bactérie au niveau intestinal, peut développer une septicémie occulte qui entraîne la contamination de l'amnios. L'infection peut entraîner par la suite un avortement, la naissance d'un enfant mort-né ou la naissance d'un enfant contaminé.

Les mères porteuses de *L. monocytogenes* au niveau intestinal ou au niveau péri-anal peuvent contaminer la peau et les voies respiratoires du nouveau-né durant l'accouchement.

Chez le nouveau-né contaminé, la listériose se traduit par une forme septicémique avec formation de granulomes disséminés sur de nombreux organes et sur la surface du corps

(granulomatose septique infantile) ou par des formes méningées plus tardives mais plus rares (listériose néonatale tardive).

□ La listériose invasive de l'enfant et de l'adulte :

Les formes affectant le système nerveux central, sont les plus fréquentes (55 à 70% des cas répertoriés). Les méningites sont brutales et souvent précédées d'une hyperthermie sévère. Les méningo-encéphalites sont caractérisées par une paralysie des nerfs crâniens (paralysies faciales). L'évolution est continue sur plusieurs jours jusqu'à l'apparition des détresses respiratoires. Les formes encéphaliques et les abcès au cerveau sont les plus rares. Les formes septicémiques (15 à 50 % des cas) sont très souvent rencontrées chez les sujets immunodéprimés, et peuvent entraîner des complications telles que les endocardites.

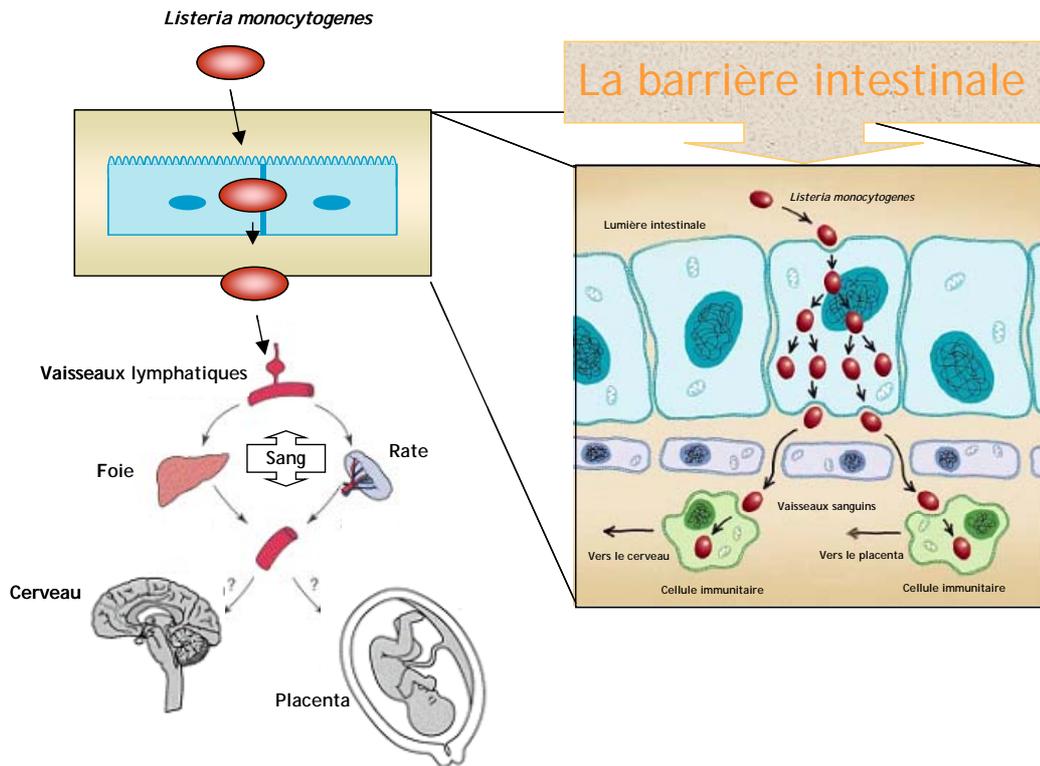
□ La listériose non invasive (5 à 10 % des cas) :

Des formes non invasives ont été décrites mais restent marginales : les gastro-entérites (Salamina *et al.*, 1996 ; Dalton *et al.*, 1997 ; Aureli *et al.*, 2000 ; Hof *et al.*, 2000), et les infections cutanées. Les listérioses cutanées sont rencontrées occasionnellement chez des fermiers et des vétérinaires praticiens ayant manipulé des animaux ou des carcasses.

## 22. Physiopathologie de l'infection

### 221. L'entrée et colonisation des tissus (figure 3)

Les étapes qui mènent à la listériose humaine sont mal connues car les données actuelles proviennent des événements observés chez la souris ou le rat. Ces modèles, au départ, ont été choisis principalement pour étudier la réponse immunitaire médiée par les cellules T. Cependant, ils ne sont a priori pas adaptés pour mimer l'infection orale humaine car l'inoculation orale de la souris ou du rat nécessite des doses anormalement élevées qui ne garantissent pas une infection systématique.



**Figure 3 : Physiopathologie de l'infection par voie intestinale**

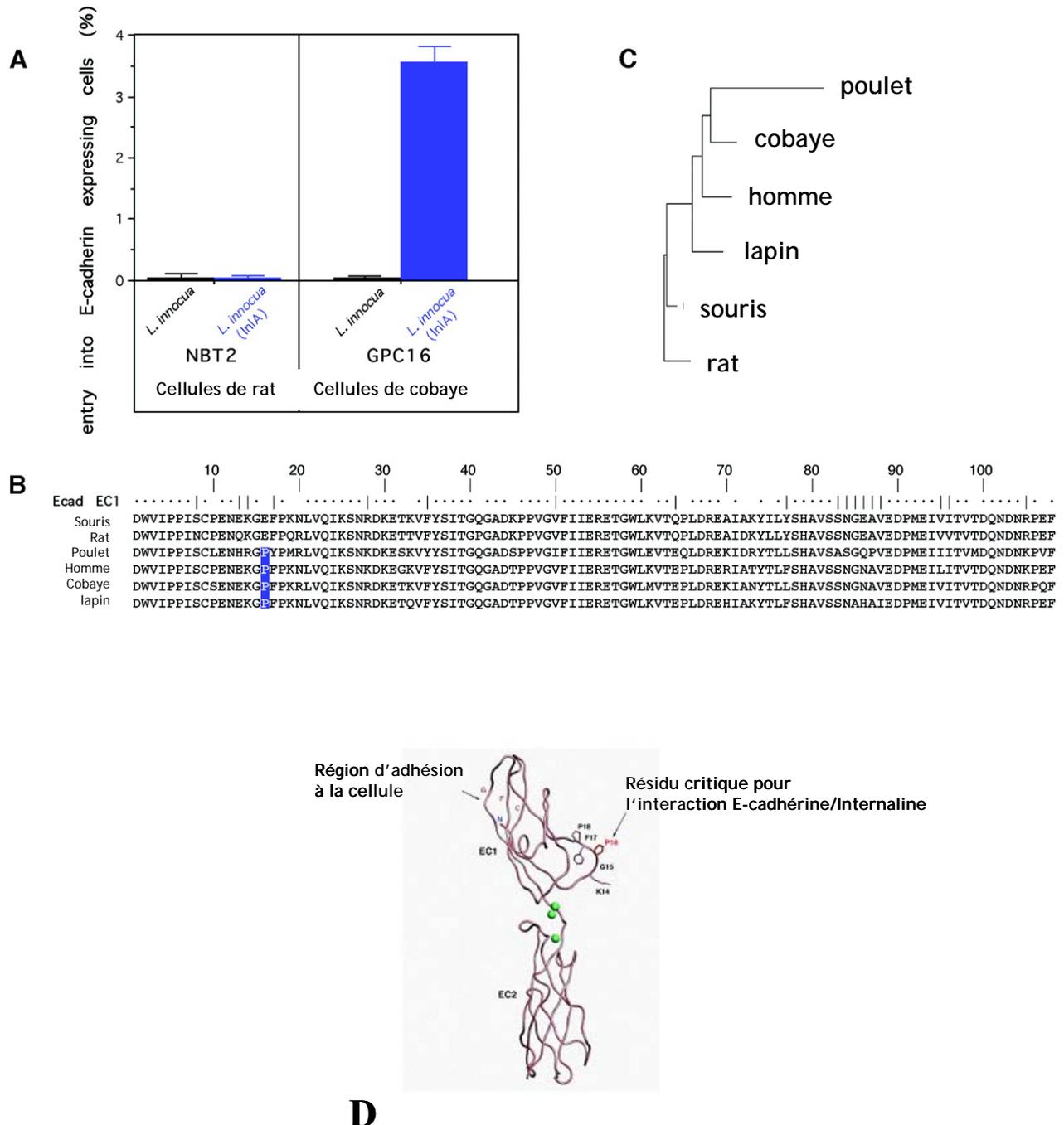
Adaptation de Lecuit & Cossart, 2001, *Médecine/Sciences* ; American Scientist, the magazine of Sigma Xi, The Scientific Research Society, 2001.

Dans un premier temps, la bactérie ingérée via l'aliment contaminé résisterait à la traversée de l'estomac avant d'atteindre la porte d'entrée du pathogène située dans les intestins. L'acidité gastrique réduirait cependant considérablement le nombre de bactéries ingérées. En effet, les doses d'inoculation nécessaire sont diminuées lorsque l'animal est préalablement traité à la cimétidine ou par des agents bloquants de type H<sub>2</sub>, qui ont pour effet d'augmenter le pH de l'estomac (Czuprynski & Faith, 2002). D'autres sites d'entrée ont été suspectés mais non démontrés (voies respiratoires supérieures). Il est reconnu que *L. monocytogenes* est une bactérie invasive capable d'induire sa propre phagocytose dans un grand nombre de types de cellules, mais par contre, la voie par laquelle elle traverse la barrière épithéliale a longtemps été un sujet à controverses. En effet, certaines études réalisées sur le cobaye suggéraient que les cellules entérocytaires du pôle apical des villosités intestinales pouvaient être la cible de la bactérie (Racz *et al.*, 1972 ; Fontan *et al.*, 2001 ; Manohar *et al.*, 2001). Cette hypothèse est d'ailleurs cohérente avec le fait que *L. monocytogenes* est capable d'entrer *in vitro* par les surfaces baso-latérales des cellules humaines Caco-2 polarisées (Gaillard & Finlay, 1996). Par contre, d'autres études ont montré

que les plaques de Peyer étaient colonisées, suggérant que le site préférentiel d'entrée de la bactérie était les cellules M, à savoir des cellules épithéliales intestinales vouées au transfert et à la présentation des antigènes depuis la lumière intestinale jusqu'aux cellules immunocompétentes des plaques de Peyers (Marco *et al.*, 1992 ; Marco *et al.*, 1997). Il est aussi possible que les entérocytes soient infectés via la propagation de cellule à cellule à partir des cellules M au niveau des plaques de Peyer. Un épithélium ainsi infecté pourrait être à l'origine des cas de gastro-entérites diagnostiqués.

Les modèles animaux (rat et souris) sensés reproduire l'infection orale n'étant pas satisfaisant, Pron *et al.* (1998) ont réalisé l'inoculation dans l'anse iléale ligaturée chez le rat, et ces auteurs suggèrent qu'il n'y a finalement pas de site préférentiel d'entrée. L'internalisation de la bactérie a été observée par microscopie à la fois dans les entérocytes et dans les cellules M, l'ensemble des bactéries internalisées migrant au final vers les plaques de Peyer. En revanche, ce système d'inoculation chez le rat n'est pas relevant puisque la translocation de *L. monocytogenes* n'est pas plus efficace que celle obtenue avec *L. innocua*, une espèce non invasive.

La mise en évidence du tropisme de la bactérie pour la E-cadhérine cellulaire humaine a permis au final de reconstituer les premières étapes du passage de la barrière intestinale et de couper court à toutes les hypothèses jusqu'ici formulées : en effet, il a été montré dans un premier temps que l'interaction entre InlA de *L. monocytogenes* et son récepteur cellulaire, la E-cadhérine, est nécessaire à l'internalisation de la bactérie dans la cellule épithéliale humaine *in vitro* (Mengaud *et al.*, 1996b). Cette interaction s'est révélée très spécifique car elle n'est pas fonctionnelle avec des cellules murines. En effet, cette interaction est fonction de la séquence en acides aminés de la E-cadhérine. Ainsi, bien que la E-cadhérine humaine (hEcad) et la E-cadhérine murine (mEcad) soient identiques à 85%, la E-cadhérine murine n'est pas un récepteur pour l'internaline, car son 16<sup>ème</sup> acide aminé est différent de celui de la E-cadhérine humaine (Lecuit *et al.*, 1999). Par comparaison des séquences en acides aminés des E-cadhérines de différentes espèces, il a ainsi été mis en évidence que le rat comme la souris ne constituaient pas des modèles pertinents pour l'étude de l'interaction entre *L. monocytogenes* et leurs cellules car l'acide glutamique porté en position 16 inhibe l'interaction *in vitro*. Par contre, les E-cadhérines du cobaye et du poulet (L-CAM) comme la E-cadhérine humaine portent une proline en position 16 (figure 4).



## Figure 4 : La E-cadhérine et la spécificité des espèces : structure primaire et tertiaire

- (A) InIA permet l'entrée de la souche initialement non invasive (*L. innocua*) dans les cellules de cobaye et non dans les cellules de rat.
- (B) La séquence primaire de la E-cadhérine de cobaye possède comme celle de l'homme une proline en position 16 de la structure primaire de EC1.
- (C) Dendrogramme réalisé sur la base des séquences primaires (EC1) de la E-cadhérine de plusieurs espèces.
- (D) Structure tridimensionnelle de la E-cadhérine humaine

D'après Lecuit *et al.* 1999. *EMBO Journal*.

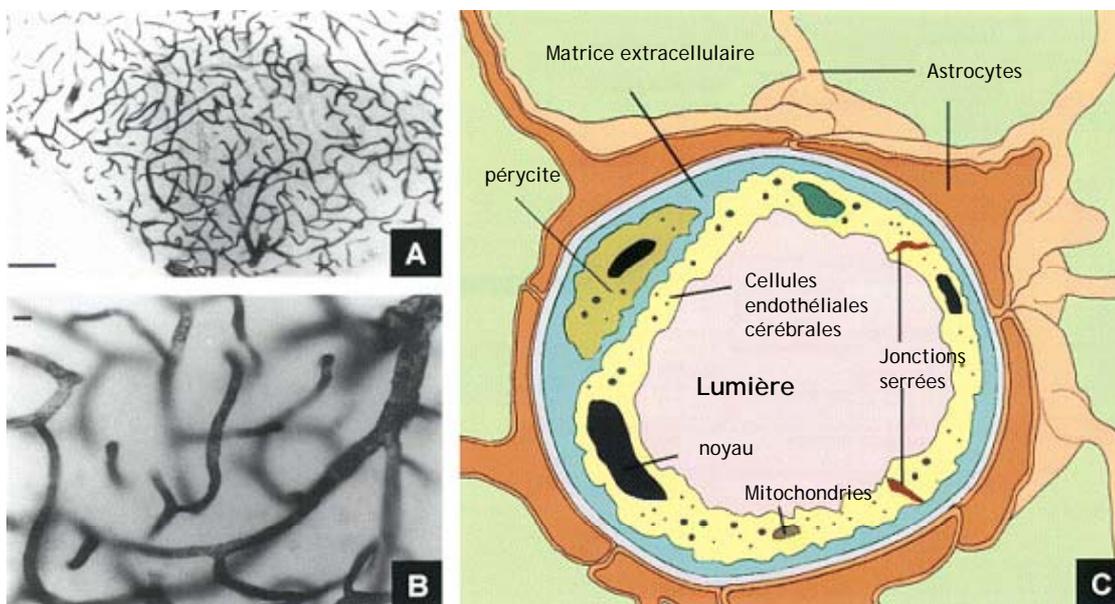
*In vivo*, il a ensuite été confirmé que après inoculation orale du cobaye, et contrairement à celle du rat ou de la souris, la mortalité est dose-dépendante et internaline-dépendante (Lecuit *et al.*, 2001). Au final, par l'utilisation de souris transgéniques synthétisant la E-cadhérine humaine localement au niveau des entérocytes, Lecuit *et al.* (2001) ont pu observer l'infection des entérocytes de l'intestin grêle, l'afflux de polynucléaires et de monocytes au niveau des sites de réplication bactérienne dans la lamina propria des villosités intestinales, et leur parcours pour atteindre les ganglions mésentériques, le foie et la rate. Ce modèle a en outre permis de mettre en évidence que *L. monocytogenes* pouvait infecter directement les entérocytes, sans passer nécessairement par les cellules M qui ne produisent pas de hEcad chez la souris transgénique. Sachant que la E-cadhérine est exprimée uniquement sur les faces basolatérales de l'entérocyte, il est suggéré que l'accès à ces faces par *L. monocytogenes* est autorisé transitoirement sur le pôle apical des villosités intestinales lors du relargage des cellules entérocytaires qui est opéré pour permettre le renouvellement des cellules de la crypte. Une autre hypothèse mettrait en jeu InlB, une seconde protéine impliquée dans l'internalisation de la bactérie dans divers types cellulaires. InlB arriverait à désorganiser les jonctions adhérentes pour ouvrir la voie à InlA (Lecuit *et al.*, 2001).

Ainsi, une fois cette première barrière intestinale franchie, les bactéries pourraient disséminer très rapidement, infecter le tissu intestinal et les organes profonds. Les bactéries localisées au niveau des plaques de Peyer utiliseraient par contre les cellules dendritiques dans un premier temps, puis les monocytes et les macrophages pour se multiplier et gagner les ganglions mésentériques et les tissus intestinaux et extra-intestinaux via les vaisseaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins (Pron *et al.*, 2001). Le mode de transport de la bactérie, à savoir dans les cellules mononucléaires ou dans le milieu extérieur, n'est pas clairement défini.

Au niveau du foie, si l'infection n'est pas maîtrisée par les cellules de l'immunité, la bactérie se multiplie activement dans les hépatocytes et regagne la circulation sanguine pour atteindre les tissus cibles que sont le cerveau et le placenta. La multiplication de la bactérie au niveau hépatique stimule l'arrivée des neutrophiles, des macrophages et des cellules mononucléaires du sang, formant ainsi les granulomes hépatiques.

Les bases moléculaires du franchissement de la barrière hémato-encéphalique (nommée BBB pour *blood-brain barrier*) lors des atteintes neuro-méningées et du franchissement de la barrière materno-fœtale chez la femme enceinte ne sont pas connus. Les atteintes du système nerveux central sont très différentes d'une espèce à l'autre, suggérant

que des différences dans l'anatomie et la physiologie ont une influence sur le pouvoir infectieux de *L. monocytogenes* à ce niveau (Huang *et al.*, 2000 ; Huang & Yong, 2001). La barrière hémato-encéphalique sépare l'espace interstitiel encéphalique du sang et elle est constituée par des cellules microvasculaires endothéliales du cerveau (BMEC pour *brain microvascular endothelial cells*) fortement associées par des jonctions serrées formant ainsi un microvaisseau (figure 5). Des études *in vitro* ont pu mettre en évidence une internalisation de la bactérie InIB-dépendante dans les BMEC (Greiffenberg *et al.*, 2000 ; Greiffenberg *et al.*, 1998).



### **Figure 5 : le franchissement de la barrière hématoencéphalique (BBB)**

La barrière est composée de cellules endothéliales microvasculaires (BMEC) observées en A et en B par révélation des anticorps antitransferrine OX26 couplés à des billes colloïdales de 5 nm.

Echelles : (A) 100µm ; (B) 10 µm.

C. Section d'un microvaisseau montrant les différentes couches qui composent la barrière hématoencéphalique.

D'après Huang & Jong, 2001, *Cellular Microbiology*

Chez la femme enceinte, la colonisation du trophoblaste permettrait par la suite la translocation de la bactérie à travers la barrière endothéliale et son passage dans le sang du fœtus.

222. La réponse immunitaire de l'hôte (Edelson & Unanue, 2000)

L'activation et le recrutement des cellules phagocytaires sur les sites infectés par *L. monocytogenes* constituent les bases de la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte. En effet, compte tenu du cycle infectieux intracellulaire, la réponse immunitaire spécifique est médiée uniquement par les lymphocytes T et non par les anticorps circulants, qui ne joueraient donc aucun rôle dans la protection contre une seconde infection. Même la présence de *L. monocytogenes* dans la lumière intestinale ne stimulerait pas la sécrétion des IgA sécrétoires. Une translocation à travers la barrière intestinale trop rapide de la bactérie serait responsable de la non-activation des lymphocytes B à ce niveau. Par contre, l'inoculation orale par une souche mutée actA<sup>-</sup> (qui permet une infection localisée seulement au niveau intestinal), procure une activation des IgA sécrétoires dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT pour Gut Associated Lymphoid Tissue). Ces IgA spécifiques de *L. monocytogenes* sont présents à partir du 14<sup>ème</sup> jour et pendant au moins 90 jours après l'inoculation (Manohar *et al.*, 2001).

Bien que *L. monocytogenes* soit majoritairement à l'abri des anticorps circulants dans la cellule hôte, il a été montré que l'administration passive d'anticorps anti-LLO pouvait avoir un rôle dans la lutte contre l'infection (Edelson & Unanue, 2000). En effet, il a été montré que le traitement de souris SCID (dépourvues d'immunoglobulines) avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la LLO de *L. monocytogenes* (toxine qui permet à la bactérie de s'échapper du phagosome) permettait de diminuer significativement les quantités de bactéries retrouvées dans le foie et la rate et permettait d'augmenter les taux de survie de ces souris. Cependant de très faibles taux d'anticorps sont produits naturellement lors d'une infection.

La bactérie serait phagocytée par les cellules des plaques de Peyer une fois transloquées, par les cellules de Küppfer au niveau du foie et par les macrophages résidents de la rate. Au niveau hépatique, les polynucléaires neutrophiles activés sont chargés de détruire les hépatocytes infectés pour libérer les bactéries intracellulaires, immédiatement phagocytées par les macrophages. Alors que les organes sont pratiquement indemnes de *L. monocytogenes*, les cellules présentatrices des déterminants antigéniques de *L. monocytogenes* (souvent des protéines bactériennes sécrétées comme LLO) induisent alors la multiplication clonale des lymphocytes T lors de la phase de la réponse immunitaire adaptative. L'éradication du pathogène chez l'hôte immunocompétent survient généralement après 5 à 7 jours d'infection et résulte de l'activation synergique des lymphocytes T et des macrophages. En effet,

les macrophages infectés produisent notamment du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) et de l'interleukine 12 (IL12), qui conjointement avec des facteurs bactériens stimulent les cellules NK (Natural Killer). L'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) produit par les cellules NK conjointement avec le TNF- $\alpha$ , réactive en boucle les activités bactéricides des macrophages. L'amocellement des cellules immunitaires constituerait une barrière physique permettant de circonscrire l'infection au niveau hépatique. Par ailleurs, la production de l'IFN $\gamma$  et d'autres cytokines permettrait aux hépatocytes de devenir moins permissifs à la prolifération bactérienne.

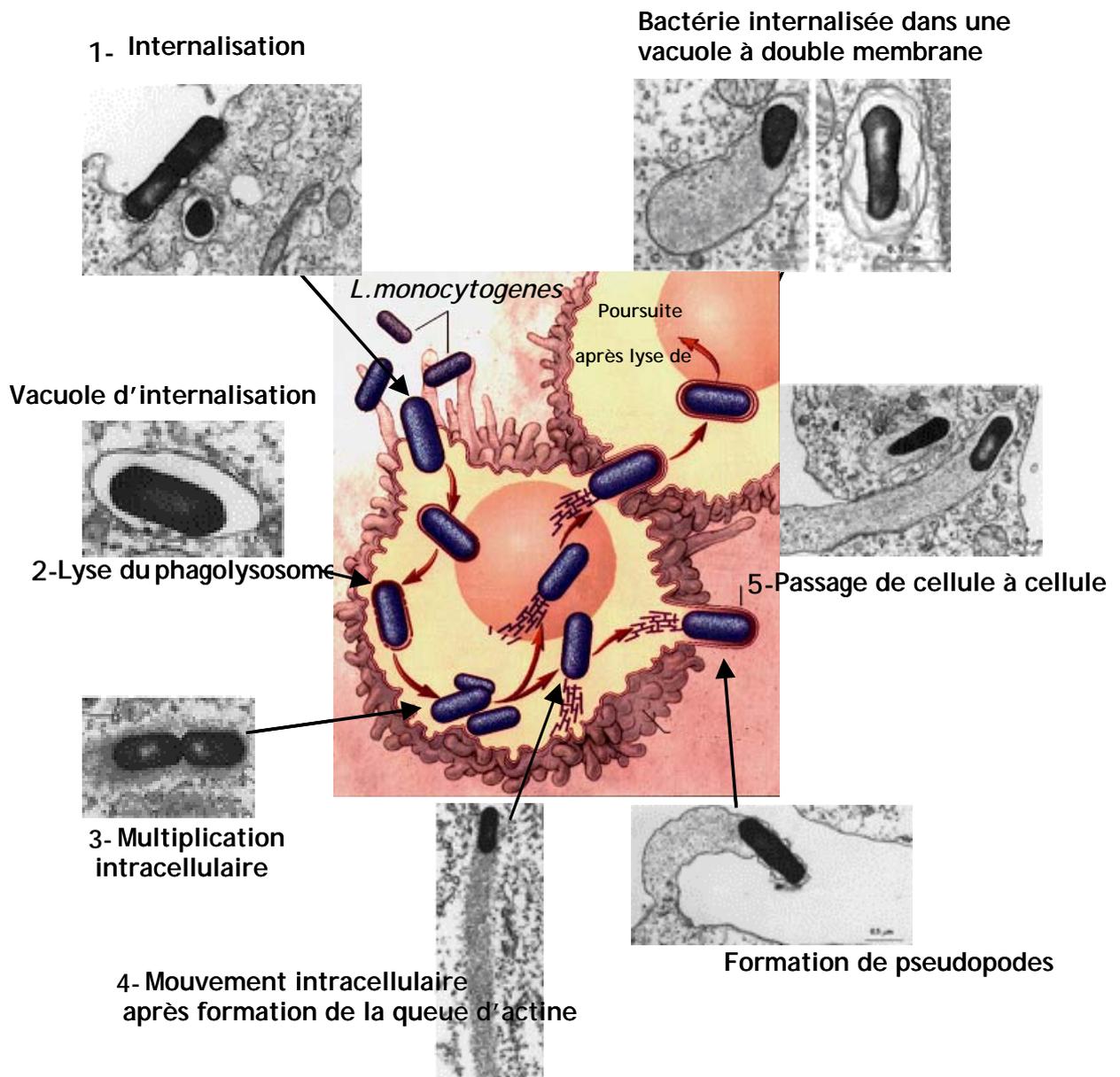
De même, les macrophages et neutrophiles sont recrutés au niveau des cellules endothéliales infectées au niveau du système nerveux central (Drevets, 1997).

Chez la souris, le placenta ne contiendrait pas de macrophages et les neutrophiles constitueraient la seule barrière contre *L. monocytogenes*, sachant que la gestation réduit l'immunité cellulaire, de manière à prévenir le rejet du fœtus.

### 23. Le cycle infectieux au niveau cellulaire (Cossart & Lecuit, 1998 ; Cossart & Bierne, 2001)

Comme c'est le cas pour un grand nombre de bactéries pathogènes intracellulaires (*Shigella*, *Samonella*, *Yersinia*..), la virulence de *L. monocytogenes* implique l'internalisation par des phagocytes professionnels et des cellules non phagocytaires dans différents tissus. Ainsi, la bactérie a la capacité de provoquer sa propre phagocytose dans plusieurs types cellulaires non phagocytaires : cellules épithéliales, cellules dendritiques, fibroblastes, hépatocytes, cellules endothéliales ou encore neurones. Quelle que soit la cellule ciblée, le mécanisme de pénétration et de vie intracellulaire est identique (figure 6) :

Un premier contact entre la cellule hôte et la bactérie amène à une interaction forte entre des protéines d'adhésion de *L. monocytogenes* et des récepteurs de la surface cellulaire. Ce phénomène dynamique est appelé mécanisme de type fermeture à éclair (« *zipper-type mechanism* ») et se distingue du mécanisme utilisé par *Shigella* ou *Salmonella* (« *trigger-type mechanism* ») qui injectent un effecteur dans le cytoplasme de la cellule hôte à l'aide d'un système de sécrétion de type III pour induire leur internalisation par pinocytose.



**Figure 6** : le cycle infectieux de *L. monocytogenes* dans la cellule hôte

Photographies : Cossart & Lecuit, 1998. *EMBO Journal* ;  
Schéma [www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html](http://www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html)

Un ensemble de signaux amène alors la membrane plasmique à s'invaginer et entourer la bactérie jusqu'à l'internaliser dans une vacuole. Un traitement préalable des cellules par la cytochalasine D inhibe l'internalisation des bactéries adhérentes, suggérant ainsi que l'invagination de la membrane plasmique dans la cellule hôte est liée à la réorganisation de l'actine intracellulaire.

Alors que beaucoup de bactéries restent dans la vacuole d'internalisation, *L. monocytogenes* lyse rapidement (en moins de 30 minutes) la membrane vacuolaire pour se retrouver libre dans le cytoplasme où elle se multiplie (le temps de doublement atteint 1h). La bactérie s'entoure alors de filaments d'actine cellulaire qu'elle réorganise pour former une « queue » d'actine polymérisée qu'elle met à profit pour se mouvoir dans le cytoplasme. Dans sa course (elle atteint une vitesse d'environ 10 à 20  $\mu\text{m}$  par minute), la bactérie rencontre la membrane plasmique et forme un pseudopode nommé listériopode lorsqu'elle invagine cette membrane accolée à la membrane plasmique d'une cellule adjacente. Une fois cette protusion internalisée dans la deuxième cellule, la bactérie se retrouve internalisée dans une vacuole à double membrane, qu'elle peut lyser à nouveau. Une fois libre dans le cytoplasme pour se multiplier, *L. monocytogenes* peut continuer son cycle d'infection. Ce passage de cellule à cellule peut aussi se faire entre des macrophages et des cellules endothéliales ou entre des macrophages et des cellules neuronales, ce qui permet la propagation de l'infection dans les tissus à l'abri des anticorps circulants.

#### 24. Les principaux facteurs de virulence identifiés et leur relation à l'hôte

L'ensemble des facteurs bactériens identifiés est de type protéique. Ces protéines sont soit relarguées dans le milieu extérieur, soit associées à la membrane de la bactérie pour interagir plus directement avec les composants de la cellule hôte. Le séquençage du génome de *L. monocytogenes* a permis d'identifier plusieurs types d'insertion de ces protéines de surface au sein de l'enveloppe bactérienne (Cabanès *et al.*, 2002). Certaines protéines sont liées par leur domaine C-terminal de manière covalente au peptidoglycane (41 protéines ont été reconnues par leur motif LPXTG et qualifiées de protéines LPXTG), là où d'autres sont associées de manière non covalente (protéines GW, protéines à queue hydrophobe et protéines de type P60). Une autre catégorie de protéines sont attachées à la surface par leur région N-terminale (lipoprotéines).

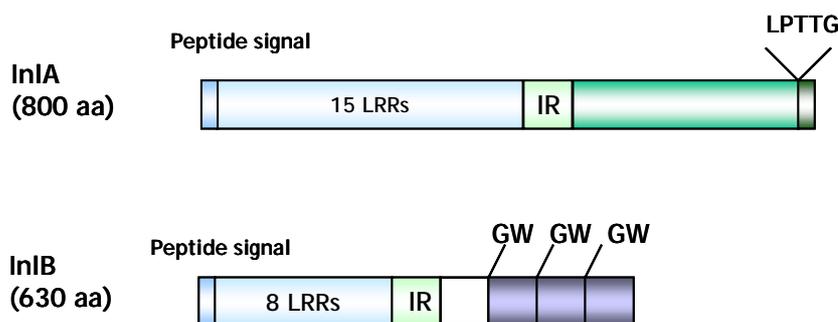
241. Le processus dynamique menant à l'entrée dans la cellule

- Les facteurs bactériens : protéines d'invasion
  - L'internaline (InIA) et les autres internalines

Deux protéines de surface participent directement à l'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules en culture par un mécanisme de type fermeture éclair : InIA et InIB, codées respectivement par les gènes *inIA* et *inIB* organisés de manière opéronique (Gaillard *et al.*, 1991 ; Dramsi *et al.*, 1995 ; Lingnau *et al.*, 1995). Par contre, ces deux protéines sont associées à la surface bactérienne selon 2 voies d'adressage différentes :

**InIA** est l'une des premières protéines de type LPXTG identifiée (Lebrun *et al.*, 1996). Elle est nécessaire à l'entrée dans les cellules épithéliales intestinales *in vitro* (cellules Caco-2) (Gaillard *et al.*, 1991) et *in vivo* (Lecuit *et al.*, 2001).

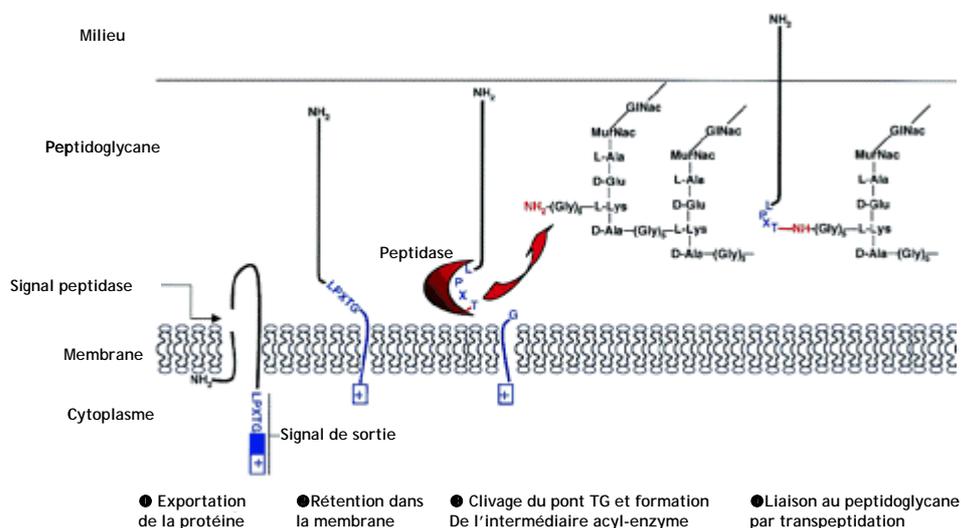
Cette protéine de 800 acides aminés est organisée en domaines : elle possède une séquence signal du côté N-terminal, une région A constituée de 15 répétitions de 22 acides aminés riches en leucines (15 régions LRR pour « Leucine Rich Repeat »), une région B constituée de 3 séquences répétées plus longues (49 ou 70 acides aminés), une région sépare ces 2 domaines (IR pour « Inter-repeat Region ») et la séquence d'ancrage C-terminale comportant le motif d'adressage LPXTG et la queue hydrophobe suivie de quelques résidus chargés positivement (figure 7).



**Figure 7** : Représentation schématique de la structure primaire des protéines d'invasion InIA et InIB

Abréviations : GW, dipeptide (Glycine et tryptophane) ; IR, « Inter repeat » ; LPTTG, séquence consensus d'acides aminés (Leucine, proline, thréonine (2) et glycine) ; LRR, « Leucin rich repeat »

Une fois synthétisée dans le cytoplasme, la protéine à l'état de précurseur est transloquée à travers la membrane par le biais de son peptide signal. Des peptidases séparent alors le peptide signal situé dans la partie N-terminale du reste de la protéine mature qui reste tout de même retenue à la membrane par les régions hydrophobe et chargée à l'extrémité C-terminale. La sortase StrA reconnaît alors le motif d'adressage LPXTG situé dans la partie C-terminale, le clive entre les résidus thréonine et glycine et le relie de manière covalente au peptidoglycane (Garandau *et al.*, 2002)(figure 8). StrA joue ainsi un rôle important dans l'adressage des protéines de surface des bactéries Gram-positives (Cossart & Jonquières, 2000). Ainsi, il a été montré que l'inactivation du gène codant pour SrtA chez *L. monocytogenes* inhibe l'ancrage de InlA et engendre une diminution de la virulence de la souche *in vitro* (Bierne *et al.*, 2002). En effet, il avait été observé que InlA est complètement fonctionnelle uniquement lorsque la protéine est associée au peptidoglycane et non sous forme soluble dans le milieu extérieur (Lebrun *et al.*, 1996 ; Jonquieres *et al.*, 1998). Compte tenu que la virulence est atténuée même chez une souris inoculée oralement par ce mutant, il est suggéré que la StrA est nécessaire à l'ancrage d'autres facteurs de virulence qui ne sont pas contrôlés par une entrée dépendante de la E-cadhérine (la E-cadhérine de la souris n'est pas un récepteur pour InlA).



**Figure 8 : Adressage des protéines de type InlA (motif LPXTG)**  
D'après Cossart & Jonquières, 2000, *PNAS*

Les séquences répétées nommées LRRs, associées à la séquence d'acides aminés en aval IR sont indispensables à la fonction de la protéine. En effet, l'expression des séquences LRRs et IR chez une espèce naturellement non invasive (*L. innocua*) suffit à la bactérie pour induire sa propre internalisation (Lecuit *et al.*, 1997). La séquence IR serait ainsi impliquée dans le bon repliement de la séquence LRR qui elle, est directement impliquée dans l'interaction avec son récepteur cellulaire, la E-cadhérine. Les structures tridimensionnelles de ce domaine LRR, seul ou en complexe avec le domaine EC1 de la E-cadhérine humaine ont été obtenus et confirment l'importance notamment de la 6<sup>ème</sup> répétition LRR (21 acides aminés au lieu de 22) de InlA et du 16<sup>ème</sup> acide aminé de EC1 dans l'interaction (Schubert *et al.*, 2002).

**InlB** est une protéine associée à la surface bactérienne de manière non covalente (protéine GW). Les études réalisées *in vivo* suggèrent que InlB est un facteur de virulence nécessaire pour l'infection des hépatocytes (Dramsı *et al.*, 1995). Cependant, *in vitro*, InlB, contrairement à InlA, permet l'entrée de *L. monocytogenes* dans un grand nombre de types cellulaires parmi lesquelles, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Dramsı *et al.*, 1997 ; Ireton *et al.*, 1999). La protéine, retrouvée à la fois sous forme soluble et associée à la membrane bactérienne, est fonctionnelle dans les deux cas. La forme soluble provoque des altérations de la membrane des cellules eucaryotes en perturbant les jonctions adhérentes, alors que la forme associée engendre l'adhésion selon le mécanisme de fermeture éclair comme InlA (Ireton *et al.*, 1999). Il a été suggéré que l'altération de la membrane par InlB pourrait d'ailleurs permettre un accès facilité pour l'entrée de *L. monocytogenes* via l'interaction entre InlA et la E-cadhérine localisée sur les faces baso-latérales des cellules de mammifère.

Du point de vue de sa structure primaire (figure 7), InlB (630 acides aminés) ressemble à InlA dans le sens où InlB possède une séquence signal ainsi que une région A (8 domaines LRRs) dans sa partie N-terminale. Il a été montré que ce sont les 213 acides aminés constitutifs des 8 LRR de la région N-terminale qui sont indispensables pour promouvoir l'entrée de InlB dans les cellules Vero (Braun *et al.*, 1999).

Par contre, InlB ne possède pas de motif LPXTG, ni de queue hydrophobe susceptible de laisser prévoir une liaison covalente avec le peptidoglycane. Le domaine d'Ancre à la Surface de la Cellule bactérienne (Csa) s'est révélé être dans la région C-terminale (Braun *et al.*, 1997 ; Braun, *et al.*, 1998). Ces 232 résidus interagiraient de manière non covalente avec les acides lipoteichoïques (LTA) eux même associés à la membrane bactérienne. Ce type d'association originale est lié à cette région constituée de motifs nommés modules GW.

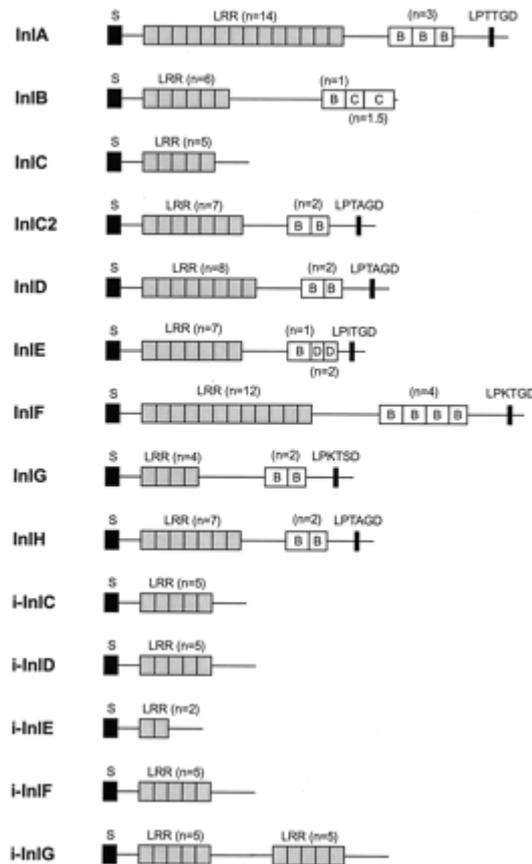
Ces motifs (3 dans la partie C-terminale de InlB) correspondent à des séquences répétées très conservées d'environ 80 acides aminés, chacune commençant par les dipeptides GW (Jonquieres *et al.*, 1999). Ainsi, l'invasion de la cellule hôte serait optimale en présence des modules GW pour s'accrocher à la membrane bactérienne et en présence des modules LRRs pour l'interaction avec la cellule hôte (Jonquieres *et al.*, 2001).

D'autres protéines de la famille de InlA et InlB ont été étudiées pour évaluer leur rôle dans l'internalisation de la bactérie :

Par comparaison de séquences nucléotidiques laissant présager des domaines LRR, IR et LPXTG, 6 autres gènes codant pour des internalines putatives de type LPXTG ont été identifiés (*inlC2*, *inlD*, *inlE*, *inlF*, *inlG* et *inlH*). La délétion du cluster *inlGHE* chez la souche EGD n'affecterait cependant pas le processus d'internalisation, mais serait a priori impliqué dans la colonisation des tissus *in vivo* (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Pourtant chez un autre isolat, la délétion du cluster *inlC2DE*, l'homologue de *inlGHE*, et du gène *inlF* n'affectait par contre, ni l'internalisation, ni une autre étape impliquée dans le processus infectieux (Dramsi *et al.*, 1997). Sachant que des homologues de ces gènes ont été aussi retrouvés chez *L. innocua*, il a été suggéré que cette famille d'internalines pouvait avoir un rôle dans des mécanismes autres que la virulence. Pourtant, une étude récente montre que l'internalisation InlA-dépendante requiert la présence à la fois de InlB mais aussi de l'expression des gènes *inlC* et *inlGHE* (Bergmann *et al.*, 2002). L'hypothèse retenue serait une association directe entre les internalines plutôt que l'augmentation de l'expression de InlA pour améliorer l'interaction avec la cellule hôte. InlB agirait indépendamment des autres internalines qui pour certaines (InlG, InlH et InlE) inhiberaient même l'entrée InlB-dépendante, suggérant ainsi une compétition pour un récepteur commun. De plus, d'après leurs expériences au cours desquelles les mutants bactériens sont injectés directement dans la cellule, la présence de ces internalines ne serait pas indispensable pour la dissémination de la bactérie de cellule à cellule.

Un troisième type de protéines de la famille des internalines a été rencontré à la fois chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* (figure 9) (Lingnau *et al.*, 1996) : il s'agit de protéines comprenant un peptide signal et des domaines LRR mais pour lesquelles il n'y a ni région B, ni motif LPXTG, ni domaine GW. L'absence de domaine C-terminal empêche l'ancrage de ces protéines de petite taille qui sont par conséquent des protéines solubles relarguées dans le milieu extérieur. Chez *L. monocytogenes*, un seul représentant de ces protéines de faible masse moléculaire a été identifié simultanément par le groupe de Z. Sokolovic (Engelbrecht *et*

*al.*, 1996) et le groupe de T. Chakraborty (Domann *et al.*, 1997), et nommée respectivement InlC et IrpA. Cette internaline pourrait être impliquée tardivement dans le processus infectieux, et plus particulièrement elle pourrait intervenir dans la dissémination du pathogène. Chez *L. ivanovii*, 5 internalines de faible masse moléculaire ont été identifiées (i-InlC, i-InlD, i-InlE, i-InlF, i-InlG). La virulence serait aussi diminuée chez *L. ivanovii* mutée pour i-InlE et i-InlF (Engelbrecht *et al.*, 1998). Cependant, le rôle de l'ensemble de ces internalines de faible masse moléculaire reste obscur.



**Figure 9** : Structure des membres de la famille des internalines chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*

Abréviations : B, répétitions de type B ; C, domaine Csa (Domaine d'ancrage à la surface bactérienne) ; D, répétitions de type D ; S, peptide signal

Vasquez-Roland *et al.* 2001 *Clinical Microbiology Reviews*

Compte tenu que la délétion du locus *inlAB* chez *L. monocytogenes* permet à la bactérie d'adhérer tout de même 10 à 20 fois plus que *L. innocua*, une espèce non pathogène, il est probable que d'autres protéines sont impliquées dans l'internalisation de *L. monocytogenes*. Certaines pourraient faciliter l'internalisation de la bactérie en favorisant l'adhérence de la bactérie. Ainsi, les facteurs qui influencent la **charge de surface** de la bactérie comme l'incorporation de la D-alanine dans les LTA de la paroi cellulaire influencent l'adhérence : il a été montré qu'un mutant déficient pour l'incorporation de la D-alanine diminue l'adhérence de la bactérie sur l'hôte, soit par modification de la charge de surface, soit par une altération de la liaison d'adhésines, et réduit en conséquence l'internalisation du pathogène, rendu ainsi plus accessible aux polynucléaires (Abachin *et al.*, 2002). D'autres adhésines ont été identifiées : **p104** (nommée aussi LAP) est impliquée dans l'adhérence de *L. monocytogenes* sur les cellules Caco-2 (Pandiripally *et al.*, 1999) ; En plus de son activité de muréine hydrolase codée par le gène *iap*, la protéine **P60** est requise pour procurer un phénotype invasif à la bactérie. P60 est une protéine retrouvée à la fois dans le milieu extérieur et à la surface bactérienne et pourrait intervenir directement dans l'adhérence aux cellules épithéliales Caco-2 (Park *et al.*, 2000). Son rôle est mal connu car un mutant *iap*<sup>-</sup> n'est pas viable. P60 possède 2 domaines LysM (domaine de type SH3) et un domaine C-terminal NLPC/P60. Le domaine LysM a souvent été retrouvé chez des protéines impliquées dans la dégradation du peptidoglycane bactérien alors que la fonction du domaine NLPC/P60 n'est pas connue.

Grâce à la réalisation d'une banque de mutant à l'aide de transposons, le groupe de A. Charbit a mis en évidence 4 loci probablement liés à des composants du peptidoglycane et impliqués dans l'internalisation de la bactérie et dans la multiplication du pathogène dans le cerveau (Autret *et al.*, 2001), et le groupe de J-L Gaillard a identifié 4 nouveaux loci impliqués dans l'adhésion de *L. monocytogenes* à partir d'une souche délétée du locus *inlAB* (Milohanic *et al.*, 2001). Parmi les mutants obtenus, un gène en amont de celui codant pour la protéine **Ami** a été identifié comme une amidase autolytique exposée à la surface de la bactérie (Braun, *et al.*, 1997) (McLaughlan & Foster, 1998). Ami appartient à la famille des protéines GW comme InlB. Un nombre plus élevé de modules GW serait la raison pour laquelle cette protéine serait plus fortement liée à la surface bactérienne que InlB (Jonquieres *et al.*, 1999). Cette région C-terminale est similaire à celle de InlB, et apparemment de la même manière que pour InlB, Ami intervient dans l'invasion de *L. monocytogenes* dans la cellule hôte par ce site d'ancrage à la paroi bactérienne (Milohanic *et al.*, 2001).

Grâce à l'annotation du génome de *L. monocytogenes*, l'identification de nouveaux facteurs d'invasion est possible. LpeA (pour « *lipoprotein promoting entry* »), une protéine homologue à PsaA de *Streptococcus pneumoniae* a ainsi été identifiée comme un facteur impliqué dans l'invasion dans la cellule mais qui par contre ne faciliterait pas la survie de la bactérie dans le cytoplasme de la cellule hôte (Réglier-Poupet *et al.*, 2003).

Enfin, la participation de **ActA** dans l'entrée de *L. monocytogenes* s'est révélée nécessaire (Suarez *et al.*, 2001). Cette protéine de la surface bactérienne, initialement décrite pour sa faculté de polymérisation de l'actine cellulaire est une protéine comportant une queue hydrophobe suivie d'acides aminés chargés positivement du côté C-terminal, un domaine qui lui servirait de point d'ancrage à la surface cellulaire.

#### □ Les récepteurs cellulaires eucaryotes

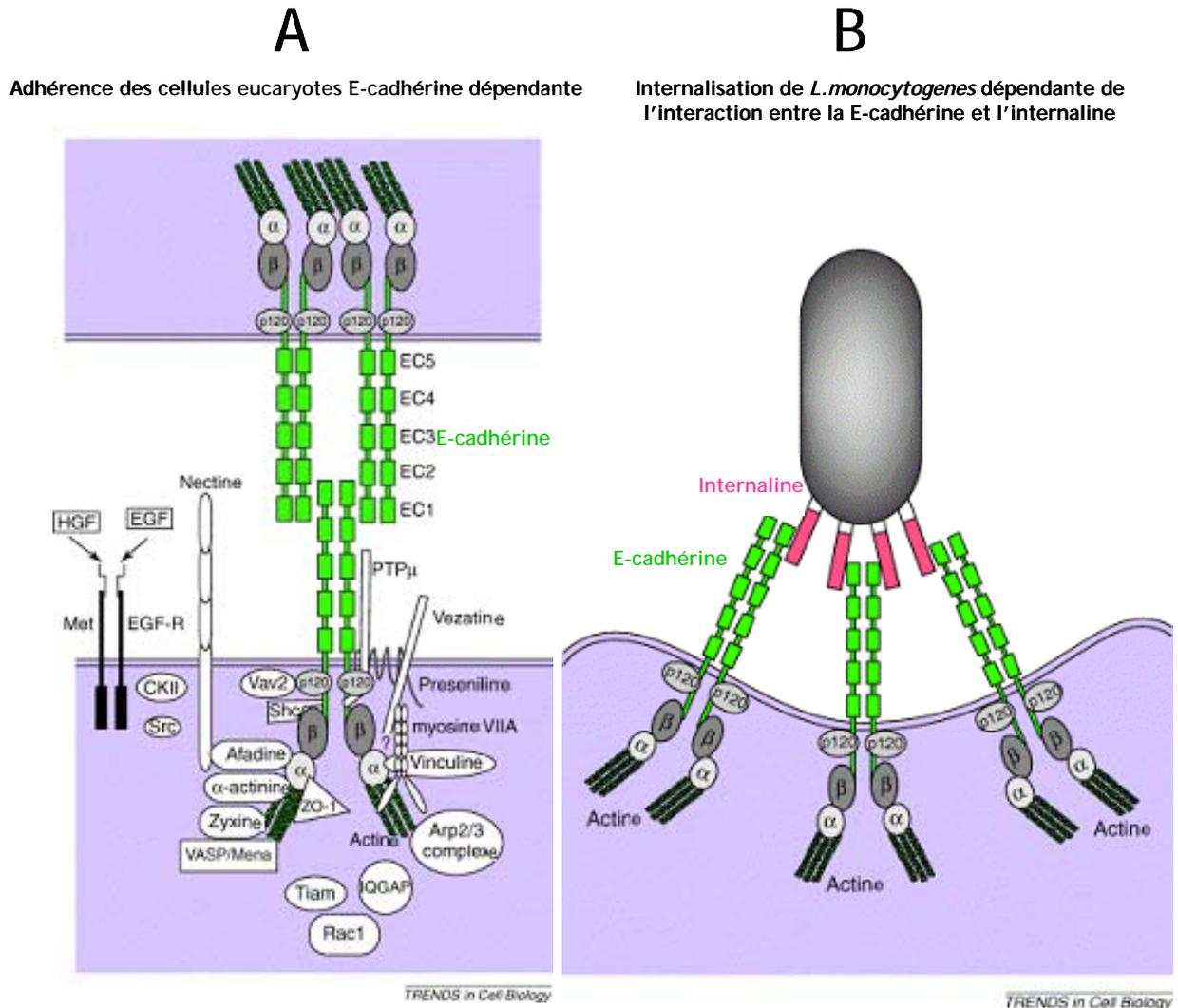
L'entrée de *L. monocytogenes* est un processus dynamique qui nécessite la participation active de la cellule hôte. Seuls les récepteurs eucaryotes de InlA et InlB ont été identifiés :

**Le récepteur cellulaire de InlA** est la E-cadhérine (110 kDa), une glycoprotéine d'adhésion intercellulaire calcium-dépendante. Elle est retrouvée au niveau des jonctions adhérentes et plus généralement sur les faces baso-latérales de la plupart des cellules épithéliales polarisées où elle assure la cohésion de l'épithélium par des interactions homophiliques E-cadhérine/E-cadhérine qui garantissent une adhérence forte entre les cellules (Mengaud *et al.*, 1996b) (figure 10). La E-cadhérine joue aussi un rôle très important dans l'élaboration des tissus chez l'embryon (Larue *et al.*, 1994). Elle est donc notamment exprimée à la surface des entérocytes, des hépatocytes, des cellules dendritiques, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales bordant le plexus choroïde et les villosités chorioniques placentaires, laissant présager un rôle pour l'entrée InlA-dépendante de *L. monocytogenes* dans ces cellules.

Cette protéine transmembranaire est composée de 5 domaines extracellulaires et une queue cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine recrute notamment des caténines, à savoir des molécules relais qui assurent l'adhérence intercellulaire et la réorganisation du cytosquelette. Le premier domaine extracellulaire (EC1) est impliqué à la fois dans l'interaction homophile et dans l'interaction avec InlA (Lecuit *et al.*, 1999). En effet, les mécanismes de signalisations intracellulaires induits lors de la formation de la jonction serrée comme lors de l'interaction avec InlA seraient similaires. Par contre,

contrairement au cas de la jonction serrée où les tensions présentes entre les deux cellules s'équilibrent, la bactérie « libre » ne compenserait pas la tension exercée par la cellule eucaryote, ce qui entraînerait en conséquence son internalisation (Cossart *et al.*, 2003)(figure 10).

Le polymorphisme observé au niveau du domaine EC1 (16<sup>ème</sup> acide aminé) est un facteur clé dans l'interaction avec InlA car il détermine le tropisme d'hôte (figure 4). La structure tridimensionnelle en boucle comprenant la proline en position 16 lui procurerait un environnement hydrophobe et non chargé, alors que l'acide glutamique est un acide aminé chargé qui réduirait l'hydrophobicité du domaine. Les caténines  $\alpha$  et  $\beta$  sont aussi impliquées au cours de l'interaction entre la E-cadhérine et InlA pour promouvoir l'internalisation de la bactérie par le réarrangement du cytosquelette (Lecuit *et al.*, 2000).



**Figure 10 : Représentation schématique de la disposition de la E-cadhérine humaine**

- (A) Liaison E-cadhérine- E-cadhérine impliquée dans la formation des jonctions serrées nécessaire à la cohésion des tissus
- (B) Liaison entre la E-cadhérine et l'internaline de *L.monocytogenes* menant au recrutement de protéines sur le site d'entrée de la bactérie

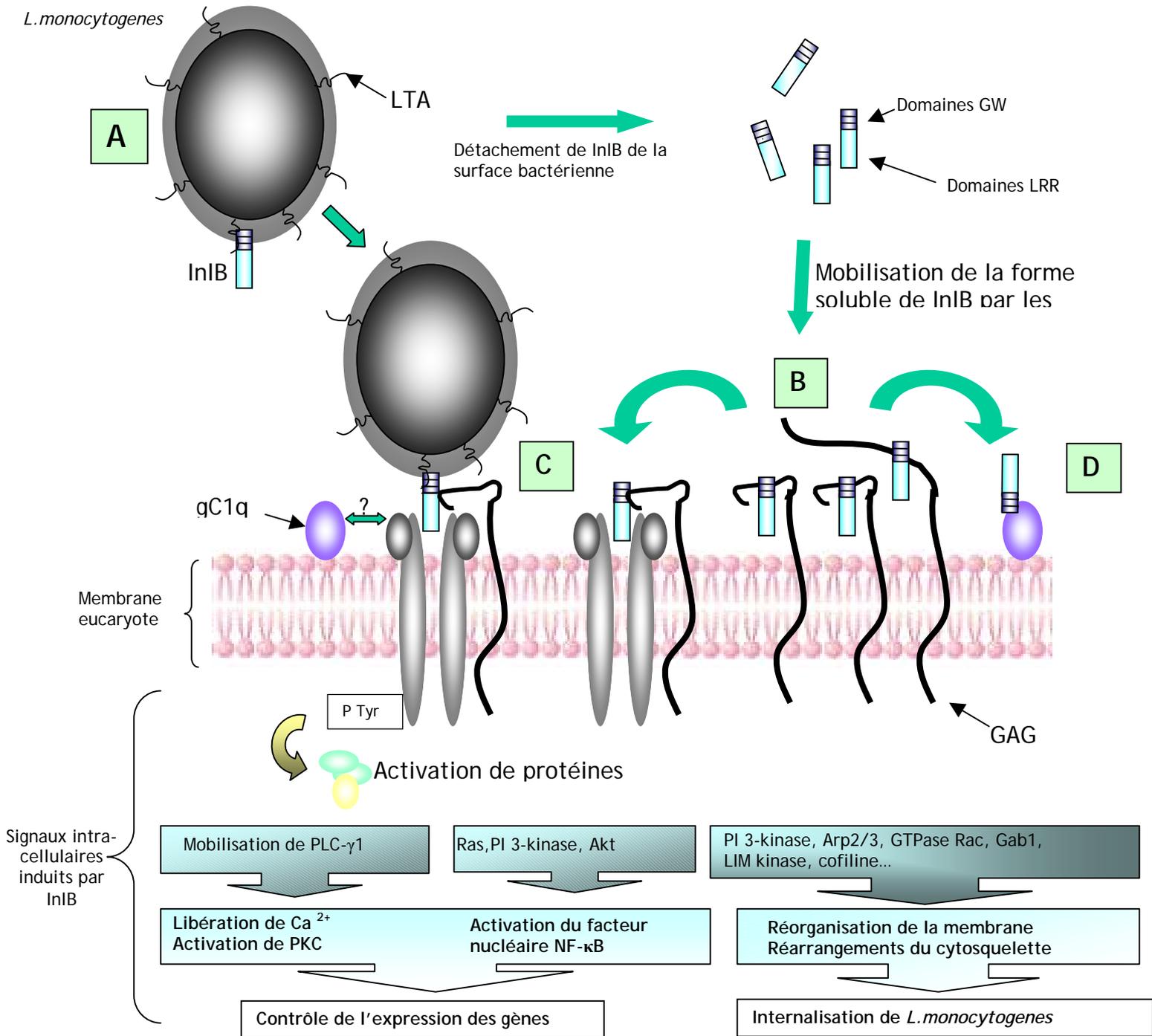
Abréviations :  $\alpha$ ,  $\alpha$ -caténine ;  $\beta$ ,  $\beta$ -caténine ; p120, p120caténine

D'après Cossart *et al.*, 2003, *TRENDS in Cell Biology*

**Plusieurs ligands cellulaires de InlB ont été identifiés (figure 11).** Il a été montré que du côté N-terminal, les domaines LRRs de InlB interagissaient avec le récepteur du facteur de croissance HGF/SF (*Hepatocyte Growth Factor* ou *Scatter Factor*) (Shen *et al.*, 2000). InlB interagirait avec ce récepteur soit lorsqu'il est associé à la surface bactérienne soit sous sa forme soluble. Ce récepteur nommé Met est de type tyrosine kinase et il a été découvert par la similarité des signaux induits par HGF et InlB dans la cellule hôte. Ainsi, suite à l'activation par HGF ou InlB, le récepteur est autophosphorylé au niveau de résidus tyrosines intracellulaires et il recrute des protéines (complexe Arp2/3, GTPase Rac, Gab1, PI 3-kinase, LIM kinase, cofiline) qui, une fois activées, assurent notamment le réarrangement du cytosquelette (Bierne *et al.*, 2001). Cependant, la durée d'activation du récepteur est de 2 heures via HGF alors qu'elle n'est que de 10 à 20 minutes via InlB.

InlB active aussi des facteurs de transcription comme le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B (via l'activation préalable des facteurs Ras, PI 3-kinase et Akt) qui n'interviendraient pas dans l'entrée de *L. monocytogenes* mais dans la réponse proinflammatoire dans les macrophages (Mansell *et al.*, 2000) ou dans l'inactivation du processus d'apoptose cellulaire (Mansell *et al.*, 2001). Il a aussi été rapporté que InlB pouvait activer la phosphorilase C- $\gamma$ 1 (via l'activation de PI 3-kinase) que *L. monocytogenes* mettrait à profit pour une étape post-internalisation (Bierne *et al.*, 2000). Un dernier facteur, la MSF, une GTPase de la famille des septines serait induit lors de l'internalisation de *L. monocytogenes* dans l'endosome de cellules LoVo (Pizarro-Cerda *et al.*, 2002).

Par contre, du côté C-terminal, les modules GW seraient utiles à la fois pour s'associer avec les LTA de la surface bactérienne, pour s'associer avec les glycosaminoglycanes cellulaires (GAG) (Jonquieres *et al.*, 2001) et pour interagir avec le récepteur cellulaire gC1q-R (Braun *et al.*, 2000). Les GAGs pourraient permettre le regroupement local de la forme soluble de InlB à la surface de la cellule eucaryote. L'interaction de InlB avec gC1q-R a été observée par cristallographie (Marino *et al.*, 2002) et suppose donc la dissociation entre InlB et le LTA de la surface bactérienne, et le relargage consécutif de InlB sous forme soluble (Marino *et al.*, 2002).



**Figure 11 :** Entrée de *L. monocytogenes* dépendante de InIB dans la cellule hôte

- (A) InIB est naturellement associée à la surface bactérienne via l'interaction entre les domaines GW de InIB et les LTA (Acides lipoteichoïques) fixés à la membrane plasmique bactérienne.
- (B) A proximité de la surface de la cellule hôte, InIB peut se retrouver sous forme soluble. Les GAGs (Glycosaminoglycanes) de la membrane eucaryote interagissent avec InIB qui s'y trouve protégé des protéases et regroupé localement.
- (C) Interaction de InIB (sous forme soluble ou non) avec son récepteur Met via ses domaines LRRs
- (D) Interaction de InIB (plutôt sous forme soluble) avec son récepteur gC1qR via ses domaines GWs

Adaptation de Cossart *et al.*, 2003, *TRENDS in Cell Biology*

Le rôle réel de gC1q-R dans l'entrée de *L. monocytogenes* n'est pas connu. La protéine gC1q-R est le récepteur de la partie globulaire du composant C1q du complément. Elle est exprimée de manière assez ubiquitaire, à savoir notamment dans les lymphocytes, les neutrophiles, les hépatocytes ou les cellules endothéliales. Bien qu'identifiée comme une protéine membranaire, gC1q-R ne possède pas de domaine transmembranaire, suggérant qu'elle est ancrée via un autre composant. Une éventuelle association avec Met a été suspectée mais non observée. Cette protéine a aussi été retrouvée dans des compartiments intracellulaires mais sa fonction à l'état cytosolique n'a pas été déterminée.

#### 242. Les facteurs impliqués dans la lyse des vacuoles

Une fois dans la cellule hôte, la bactérie se retrouve dans des vacuoles à deux reprises. La première vacuole se forme lors de la phagocytose de la bactérie. La deuxième vacuole est formée à partir de l'internalisation de la protusion formée par *L. monocytogenes* lorsqu'elle se dissémine de cellules à cellules et se trouve délimitée par une double membrane. De même, pour échapper à l'action bactéricide du phagolysosome, la bactérie s'échappe de ces deux types de vacuole principalement par l'expression des gènes *hly*, *plcA* et *plcB* codant respectivement pour LLO, pour la phosphatidyl-inositol phospholipase C (Pi-PLC) et pour la phosphatidylcholine phospholipase C (Pc-PLC). D'autres facteurs comme la catalase (CA) et la superoxyde dismutase (SOD) sont aussi définis comme des facteurs de virulence. Ils aident la bactérie à résister aux agents oxydants cytotoxiques déversés dans la vacuole des macrophages.

##### □ La listériolysine O (LLO)

La listériolysine O, un des premiers facteurs de virulence identifiés, est une toxine qui perce les deux types de membrane vacuolaire dans la plupart des types cellulaires (Gedde *et al.*, 2000). Un mutant délété pour le gène *hly* est non virulent chez la souris car la bactérie reste cloisonnée dans la première vacuole, ce qui limite la propagation de l'infection (Gaillard *et al.*, 1987). Cependant, le rôle primordial de LLO dans l'infection a encore été renforcé récemment puisqu'il a été montré que l'induction de l'expression de LLO pouvait permettre aussi l'augmentation de l'efficacité de la multiplication et de la dissémination de la souche, et ce de manière dose-dépendante (Dancz *et al.*, 2002). Cette protéine (529 résidus, 58 kDa) de la famille des « *pore forming toxins* » est sécrétée dans le milieu extérieur en tant que monomère *via* une séquence signal typique du côté N-terminal (25 résidus). Du côté

C-terminal, une séquence très conservée est essentielle à l'activité hémolytique et serait impliquée en partie dans le contact avec la membrane de la vacuole et plus particulièrement avec le cholestérol de cette membrane (Michel *et al.*, 1990). *In vitro*, son activité est maximale pour des pH compris entre 4,9 et 6,7, à savoir des pH rencontrés dans le compartiment vacuolaire lors de son acidification (Beauregard *et al.*, 1997). Une fois le compartiment cytosolique atteint, LLO est rapidement dégradée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette courte demi-vie suggère que la quantité de LLO cytosolique serait contrôlée, au moins en partie par des mécanismes de la cellule hôte induisant sa dégradation pour garantir l'intégrité de la membrane cellulaire par la suite. Un motif PEST (résidus 32-50), caractéristique des protéines intracellulaires de faible demi-vie a été identifié dans la partie N-terminale de LLO et rejoint ces hypothèses. Cette séquence PEST s'est révélée importante pour la virulence de la bactérie mais pas essentielle pour la sécrétion et l'activité hémolytique de la protéine (Lety *et al.*, 2001). Plus particulièrement, la substitution de 2 résidus situés en aval de ce motif PEST intact était critique pour permettre la fuite de la bactérie hors du phagosome et suffisait pour réduire la virulence de la souche. Par contre, la nature de la séquence PEST (plus ou moins consensuelle) n'était pas directement liée à une dégradation protéolytique plus ou moins importante (Lety *et al.*, 2002). Les mécanismes moléculaires permettant la formation des pores et la lyse de la membrane vacuolaire restent peu connus et impliquent l'intervention d'autres facteurs. En effet, le type de cellule rencontré par la bactérie influencerait le mécanisme par lequel la bactérie s'échappe de la vacuole : LLO ne serait pas indispensable à cette étape lors de l'infection des cellules humaines HeLa ou Henle 407 (Marquis *et al.*, 1995).

□ La phosphatidylinositol phospholipase C (Pi-PLC)

La phosphatidylinositol phospholipase C, codée par le gène *plcA*, est une phospholipase de type C connue pour être impliquée dans la lyse de la membrane vacuolaire résultant de la phagocytose de la bactérie. Cette protéine de 33 kDa (317 acides aminés) est exportée dans le milieu environnant pour exercer sa fonction. A cette étape, Pi-PLC agit en synergie avec la listériolysine LLO décrite précédemment (Goldfine *et al.*, 1995), mais son rôle pourrait n'être qu'accessoire lors de l'infection pour certains types de cellules, telles les cellules Henle 407 (Marquis *et al.*, 1995). La fonction exacte de Pi-PLC dans la dissolution de la membrane de la vacuole reste donc incertaine. Il est certes connu que Pi-PLC possède une activité enzymatique permettant l'hydrolyse spécifique du phosphatidylinositol et des groupements glycosyl-phosphatidylinositol permettant l'ancrage

de protéines. L'activité enzymatique de Pi-PLC, comme celle de LLO, est elle aussi optimale pour des pH situés entre 5,5 et 6,5 *in vitro*. L'activité de Pi-PLC nécessaire à la virulence de la bactérie n'impliquerait cependant pas uniquement cette activité enzymatique (Goldfine *et al.*, 1995). En effet, il a été montré que Pi-PLC possédait aussi une activité de « perméabilisation » de la membrane (Bannam & Goldfine, 1999). Par ailleurs, Pi-PLC intervient également dans la dissolution de la double membrane formée lors de la dissémination de la bactérie (Smith *et al.*, 1995).

□ La phosphatidilcholine phospholipase C (Pc-PLC)

Une deuxième phospholipase, Pc-PLC ou encore nommée lécithinase, est nécessaire à la lyse de la deuxième vacuole à double membrane formée lorsque la bactérie se dissémine de cellule à cellule. Cette phospholipase interviendrait aussi dans la lyse de la première vacuole au moins dans les cellules épithéliales humaines (Marquis *et al.*, 1995). Cette phospholipase (289 acides aminés, 29 à 30 kDa) est elle aussi sécrétée mais sous forme non active au cours de la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes* : la transcription du gène *plcB* conduit à la synthèse d'une pro-enzyme de 33 kDa (proPc-PLC) qui reste associée à la bactérie. Cette pro-enzyme est ensuite activée et maturée (clivage protéolytique de la partie N-terminale de Pc-PLC) par une métalloprotéase (Mpl), elle-même codée par le gène *mpl*, et maturée une fois sécrétée. Cette activation de proPc-PLC par Mpl au niveau de la surface de la bactérie est nécessaire avant que Pc-PLC ne soit relarguée efficacement. L'acidification de la vacuole entraîne un relargage important de Pc-PLC (Marquis & Hager, 2000). Cependant, d'autres voies de maturation indépendantes de Mpl ont été envisagées et seraient spécifiques du compartiment cellulaire et/ou des facteurs de la bactérie voire de l'hôte rencontrés (Marquis *et al.*, 1997). Pc-PLC a par ailleurs du point de vue enzymatique un spectre d'action plus large que la précédente. Elle est capable d'hydrolyser la majeure partie des phospholipides de la cellule des mammifères.

Il est probable que les 2 phospholipases (Pi-PLC et Pc-PLC) aient en fait des fonctions redondantes au cours du processus infectieux pour permettre l'accès de *L. monocytogenes* au cytoplasme de la cellule hôte à la fois lors du processus d'invasion initial et lors de la dissémination de cellule à cellule (Smith *et al.*, 1995). Par ailleurs, compte tenu que des produits de l'hydrolyse comme le diacylglycérol sont isolés même en présence de *L. monocytogenes* n'exprimant ni Pc-PLC ni Pi-PLC, il est suggéré que la bactérie active et utilise aussi des phospholipases endogènes de la cellule hôte (Marquis *et al.*, 1997).

□ SvpA

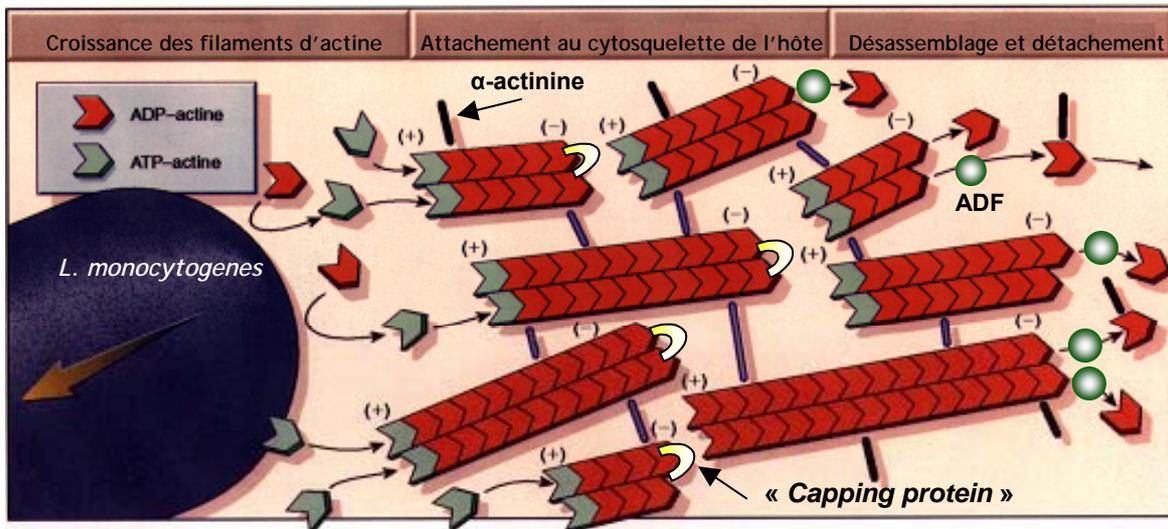
Récemment, une nouvelle protéine impliquée dans le cycle intracellulaire de *L. monocytogenes* a été identifiée (Borezee *et al.*, 2001). Cette protéine sécrétée, nommée SvpA, appartient à la famille des protéines à queue hydrophobe comme ActA laissant ainsi prévoir sa réassociation à la surface de la bactérie. SvpA faciliterait ainsi la fuite de la bactérie du phagosome vers le cytoplasme de la cellule hôte.

243. Les facteurs impliqués dans les déplacements intra et inter-cellulaires

*L. monocytogenes* est capable de recruter l'actine cellulaire et de la polymériser à l'un de ses pôles. Dans un premier temps, les monomères d'actine recouvrent la surface d'un des pôles de la bactérie dès son arrivée dans le cytoplasme de la cellule. Ensuite le réseau d'actine s'organise et se polymérise pour former une queue d'actine (ou comète) (Dabiri *et al.*, 1990). Cette queue d'actine reste immobile dans le cytoplasme, alors que sa formation est réalisée uniquement à une extrémité située au niveau de la surface de la bactérie provoquant ainsi sa motilité (Kocks *et al.*, 1993). La vitesse de déplacement de la bactérie serait liée à la vitesse d'assemblage de la queue d'actine (10 à 20  $\mu\text{m}$  par minute) (figure 12).

A elle seule, la protéine **ActA** est suffisante pour permettre les mouvements de *L. monocytogenes* dans la cellule hôte via l'utilisation des mécanismes de polymérisation de l'actine cellulaire (Kocks *et al.*, 1995 ; Cameron *et al.*, 1999). ActA, composée de 639 acides aminés pour sa forme immature et 610 acides aminés pour la forme mature, est une protéine de surface localisée plus particulièrement à l'un des pôles de la bactérie, ce qui suggère que cette distribution polaire détermine le site d'assemblage de l'actine cellulaire. Cependant les déterminants qui contrôlent cette distribution asymétrique de ActA ne sont pas connus. ActA est ancrée à la membrane plasmique de la bactérie par sa queue hydrophobe suivie de la présence de résidus chargés positivement dans sa partie C-terminale (Cabanes *et al.*, 2002). Du côté N-terminal, la séquence primaire de ActA est constituée d'une séquence signal conventionnelle (résidus 1 à 29) permettant sa sécrétion, suivie d'une région riche en acides aminés chargés (ActA-N) (résidus 30 à 263). Une région centrale se caractérise par un domaine riche en proline (PRR) (figure 13).

Par contre, de nombreux facteurs de l'hôte sont impliqués dans la formation du réseau d'actine et de la queue d'actine permettant la propulsion de *L. monocytogenes* dans le cytoplasme cellulaire et vers les cellules adjacentes : le complexe Arp2/3, la cofiline, la « *capping protein* », VASP (« vasodilator-stimulated phosphoprotein ») et l'actine (figure 14).

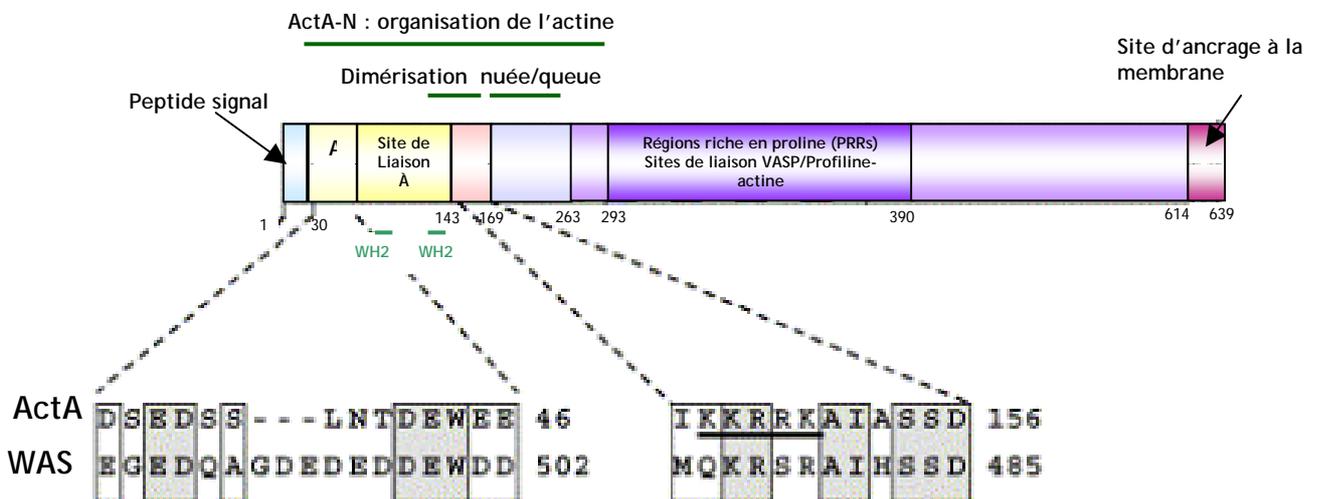


**Figure 12 :** Modèle représentant l'assemblage de l'actine cellulaire conduisant au mouvement intracellulaire de *Listeria monocytogenes*.

L'assemblage de l'actine cellulaire est réalisé à l'un des pôles de la bactérie. Cet assemblage forme une queue d'actine polymérisée et fixée au cytosquelette de la cellule hôte. La croissance des filaments permet la mobilité de la bactérie.

La « capping protein » protège l'extrémité des filaments formés de l'ADF, chargée elle, de dépolymériser l'actine.

D'après [www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html](http://www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html)



**Figure 13 :** Représentation schématique de la structure primaire de ActA et de l'alignement de séquences avec WASP.

La région N-ActA comprend les domaines de structure qui organisent le recrutement de l'actine et de son organisation (dimérisation, en nuée ou en queue) via notamment le recrutement du complexe Arp2/3 et de la profiline. La région A est un domaine riche en acides aminés acides. Les domaines WH2 sont des sites qui complètent le site d'interaction avec le complexe Arp2/3.

La séquence soulignée pour ActA (KKRRK) correspond à la région essentielle à l'assemblage de la queue d'actine et à l'activation du complexe Arp 2/3.

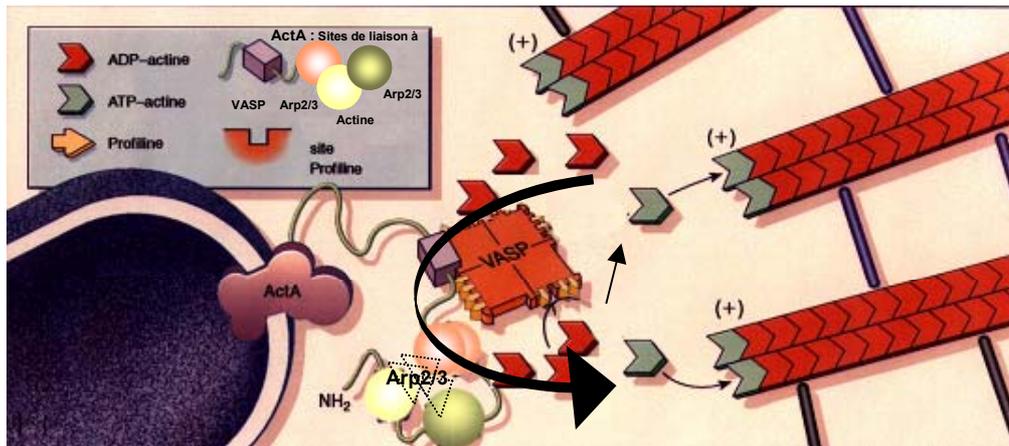
Adaptation de Cossart & Bierne, 2001, *Current Opinion in Immunology*

- La région N-terminale de ActA mime l'action des protéines cellulaires de la famille WASP

Il est suggéré que ActA mime l'action des protéines cellulaires de la famille WASP (pour « Wiskott-Aldrich Syndrom Protein ») et la similarité de leur séquence au niveau de la région ActA-N semble confirmer cette hypothèse (figure 13). Les protéines cellulaires de la famille WASP stimulent l'activation du complexe Arp2/3. Cette région contient notamment un domaine acide (A), deux domaines homologues à la région 2 de WASP (WH2) et une région supposée interagir avec le complexe Arp2/3. Ainsi de la même manière que WASP, ActA-N est le domaine qui stimulerait directement l'activité de nucléation de l'actine G du complexe cellulaire Arp2/3 (Cossart, 2000). Le complexe Arp2/3 est un polypeptide très conservé qui, lorsqu'il est associé à son domaine d'interaction sur ActA (acides aminés 143 à 169), est impliqué à la fois dans la nucléation des filaments d'actine, dans leur élongation et dans l'organisation du cytosquelette en réseau dense de filaments d'actine (Welch *et al.*, 1998). Plus particulièrement dans cette région, les acides aminés 146 à 150 (KKRRK) seraient indispensables à l'assemblage de la queue d'actine et à l'activation du complexe Arp2/3 (Lasa *et al.*, 1997) (Lauer *et al.*, 2001). Une seconde région impliquée dans l'interaction de ActA avec Arp2/3 a été identifiée et correspondrait à la région A (domaine acide). Ce complexe Arp2/3 est aussi retrouvé tout le long de la queue d'actine car il se dissocie de ActA après chaque assemblage de 10 monomères d'actine. L'arrivée d'un nouveau complexe Arp2/3 au niveau de ActA permet à nouveau la nucléation *de novo* de l'actine pour former des ramifications.

Cette nucléation de l'actine suppose donc aussi des domaines de liaison de l'actine sur ActA (Zalevsky *et al.*, 2001). ActA possède la faculté d'interagir avec 2 monomères d'actine. Ces deux sites comprennent des domaines WH2 de la famille des protéines WASP.

La séquence N-terminale de ActA comprise entre les acides aminés 166 à 256 serait impliquée dans la conversion entre l'actine organisée en nuée et l'actine organisée en queue. Enfin, ActA est parfois observée sous forme de dimère et la région impliquée dans cette dimérisation est située dans la région entre les acides aminés 126 à 155. La répercussion de cette dimérisation sur la polymérisation de l'actine n'est pas connue (Mourrain *et al.*, 1997).



**Figure 14** : Représentation schématique de ActA et des facteurs cellulaires impliqués dans la nucléation de l'actine.

Le complexe Arp2/3 activé par l'interaction avec ActA organise la nucléation de l'actine. L'actine, pour interagir avec ActA, serait accumulée au voisinage de ActA par l'intermédiaire de VASP et de la profiline, 2 facteurs indirectement liés à l'efficacité du processus.

D'après [www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html](http://www.med.ufl.edu/biochem/DLPURICH/Listeria.html)

#### □ Les régions PRRs de ActA et le recrutement de VASP

Les régions riches en proline (PRRs) (acides aminés 293 à 390), similaires à celles retrouvées dans la vinculine et la zyxine, seraient impliquées dans le recrutement et l'interaction avec la protéine cellulaire VASP. VASP est retrouvé au niveau du site de polymérisation de l'actine, soit le site de localisation de ActA.

VASP recrute à son tour la profiline, une protéine cellulaire qui favorise la polymérisation des monomères compétents d'actine, laissant présager que VASP permettrait indirectement l'accumulation de monomères d'actine dans la périphérie de ActA. VASP serait donc plutôt impliqué dans la régulation et l'efficacité de mouvement (Geese *et al.*, 2002). VASP ne contrôlerait pas directement l'initiation du processus réalisé par l'intermédiaire du complexe Arp2/3, mais pourrait augmenter l'activation du complexe Arp2/3 par ActA (Skoble *et al.*, 2001). Il a aussi été suggéré que VASP pourrait intervenir dans le processus de formation de la queue d'actine à partir de la nuée de filaments d'actine.

#### □ Les autres intervenants cellulaires

D'autres facteurs cellulaires sont impliqués dans le mécanisme induit par ActA et plus particulièrement des facteurs qui interviennent dans le dynamisme du phénomène (figure 12). Parmi eux, la protéine cofiline (ADF) dépolymériserait l'actine et à l'inverse, la « capping

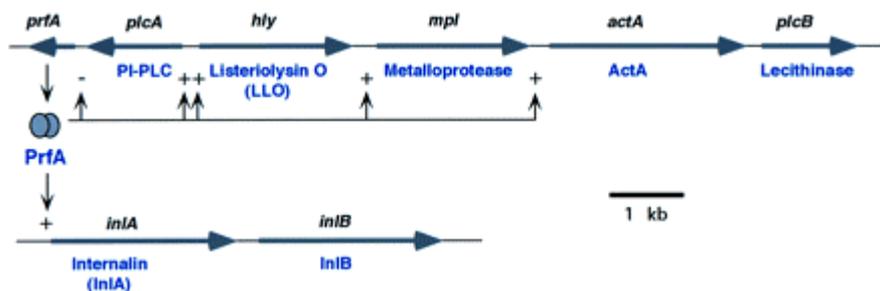
*protein* » coifferait les extrémités des filaments d'actine et empêcherait la dissociation des filaments. Enfin, l' $\alpha$ -actinine serait chargée de ponter les filaments d'actine formés.

## 25. Organisation génétique des facteurs de virulence

Les facteurs de virulence décrits précédemment sont tous situés sur le chromosome de *L. monocytogenes* et absents ou non transcrits chez d'autres espèces non pathogènes. Ils sont organisés en clusters pour la plupart, voire en îlots de pathogénicité (PAIs) (figure 14) comme c'est le cas pour beaucoup de bactéries intracellulaires telles que *Salmonella*, *Shigella* ou encore *Yersinia*.

### 251. PrfA, le régulateur principal des deux clusters de gènes impliqués dans la virulence de *L. monocytogenes*

La majorité des facteurs de virulence sont regroupés au sein de 2 clusters de gènes régulés au moins en partie par le seul régulateur transcriptionnel des gènes de virulence connus à ce jour, PrfA (figure 15).

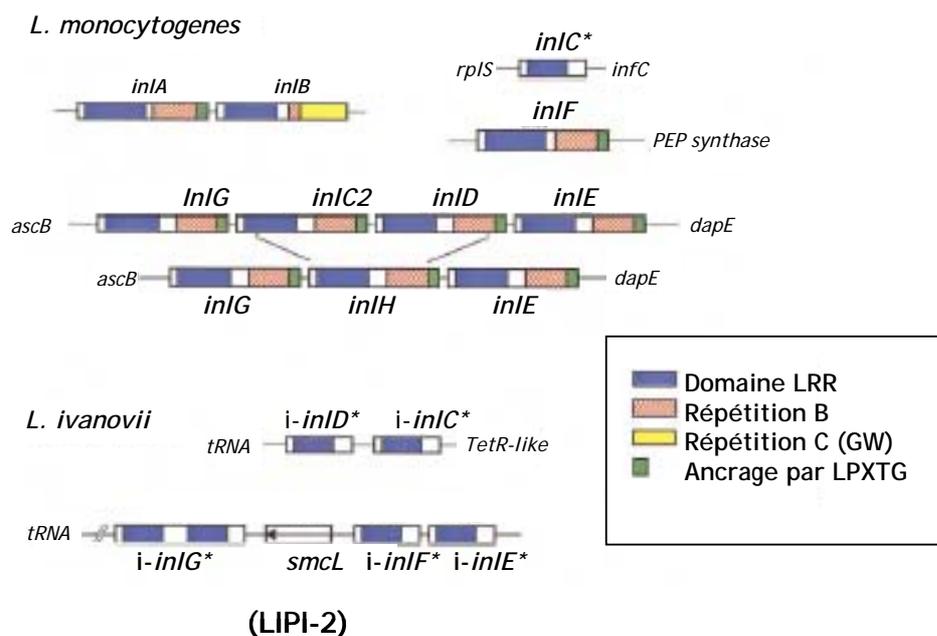


**Figure 15** : les gènes régulés par PrfA, l'activateur transcriptionnel de la famille Crp/Fnr de *L. monocytogenes*  
Cossart *et al.*, 1998. *EMBO Journal*

Le premier cluster comprend 6 facteurs de virulence (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* et *plcB*) intervenant dans les étapes de parasitisme intracellulaire et comprend d'ailleurs le gène codant pour PrfA, ce qui entraîne l'autoactivation de PrfA en boucle. Ce domaine de 9kb est nommé *vgc* pour « *virulence gene cluster* » ou encore LIPI-1 pour « *Listeria pathogenicity Island 1* ». Selon les promoteurs activés, les transcrits obtenus sont variables : à partir de celui de *plcA*, le gène *plcA* est transcrit seul ou avec *prfA*. Le gène *prfA* peut aussi être transcrit séparément car il est précédé par 2 promoteurs nommés *prfAP1* et *prfAP2*. Le transcrit de *hly* est lui monocistronique alors que les gènes *mpl*, *actA* et *plcB* peuvent être cotranscrits. Les

gènes *actA* et *plcB* sont toujours cotranscrits alors que le gène *mpl* peut être transcrit indépendamment des 2 autres.

Le deuxième opéron, nommé opéron *inLAB*, comprend les gènes codant pour les Internalines A et B. Contrairement au LIPI-1, les gènes *inIA* et *inIB* sont seulement partiellement contrôlés par PrfA (Lingnau *et al.*, 1995). Le gène *inIA* est cotranscrit avec *inIB* lorsqu'il est sous la dépendance du promoteur dépendant de PrfA mais il est sous le contrôle de 2 autres promoteurs indépendants de PrfA. Un transcrit monocistronique permet aussi la synthèse de InIB indépendamment de InIA. Parmi la famille des internalines (figure 16), *inIC* est sous la dépendance de PrfA (Engelbrecht *et al.*, 1996 ; Domann *et al.*, 1997) et à l'inverse, l'opéron *inIGHE* (ou encore *inIGC2DE* selon la souche) n'est pas sous le contrôle de PrfA (Raffelsbauer *et al.*, 1998).



**Figure 16** : les gènes codant pour la famille des internalines chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*

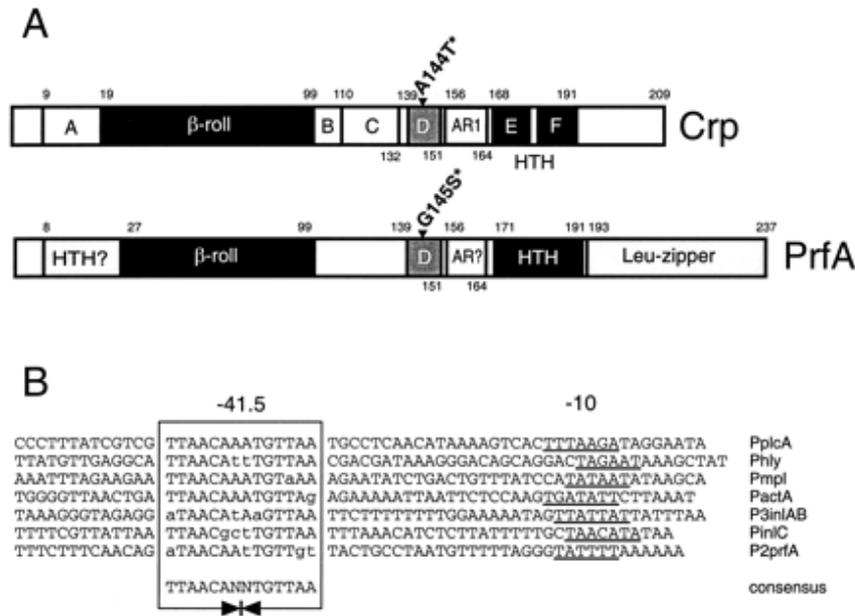
La transcription de tous les gènes s'effectue de la gauche vers la droite sauf pour le gène *smcL* comme indiqué par la flèche dans sa boîte. Le schéma montre les différents arrangements de mêmes gènes rencontrés chez deux isolats de sérotype 1/2a de *L. monocytogenes* EGD ; le gène *inIH* dériverait d'une recombinaison de la partie 5'-terminale du gène *inIC2* et de la partie 3'-terminale du gène *inID*. Les gènes annotés (\*) correspondent à des internalines de faible masse moléculaire ne possédant pas de motif d'ancrage à la surface de la bactérie (protéines sécrétées).

Vazquez-Boland *et al.*, 2001. *Microbes & Infection*

PrfA est un activateur transcriptionnel pour l'ensemble de ces gènes (Leimeister-Wachter *et al.*, 1990). Cependant, PrfA contrôle aussi un certain nombre de gènes dispersés sur l'ensemble du chromosome, soit directement, soit avec le concours de différents facteurs sigma (Milohanic *et al.*, 2003). De plus, par cette analyse du transcriptome de la souche EGD-e, il a aussi été montré que parmi les catégories de gènes contrôlés par PrfA, un certain nombre étaient réprimés par PrfA (Milohanic *et al.*, 2003). Cette protéine est spécifique des espèces pathogènes du genre *Listeria* (Wernars *et al.*, 1992). PrfA est aussi retrouvé chez *L. ivanovii* et active la transcription de certains gènes intégrés au sein d'un îlot de pathogénicité nommé LIPI-2 (*Listeria pathogenicity Island 2*). Ainsi, la plupart de gènes de LIPI-2 codant pour des protéines de la famille des internalines sont partiellement contrôlés par PrfA.

Bien que sur la base de la séquence totale des protéines, PrfA et Crp (pour « *cAMP receptor protein* » de *E. coli* ou encore connu sous le nom de CAP soient assez différentes (20% d'identité), PrfA appartiendrait à la famille de ce régulateur nommée Crp/Fnr. En effet, les domaines de ces protéines pris indépendamment sont très proches à la fois dans leur structure et dans leur fonction (figure 17). Ainsi, les protéines de la famille Crp/Fnr sont toutes impliquées dans la régulation des gènes de virulence chez d'autres pathogènes des plantes ou des mammifères.

PrfA possède un motif hélice-tour-hélice (HTH) caractéristique dans sa partie C-terminale (acides aminés 171 à 191) et qui aurait pour fonction de permettre l'interaction entre la protéine et la séquence d'ADN cible située dans la région du promoteur du gène à transcrire (Sheehan *et al.*, 1996). Cette séquence cible est nommée boîte *prfA*. Elle est centrée sur la position -41,5 par rapport au +1 et se compose d'une séquence palindromique de 14 paires de base. Plus cette séquence se rapprocherait de la séquence palindromique parfaite, plus l'interaction entre PrfA et la boîte *prfA* serait stable et forte (Sheehan, et al., 1996). La composition de cette séquence influencerait d'ailleurs l'expression des gènes contrôlés par PrfA et par voie de conséquence apporterait un niveau supplémentaire de régulation de la virulence de la souche (Williams *et al.*, 2000)(figure 17).



**Figure 17** : Représentation schématique de la structure primaire de PrfA (A) et la séquence cible de PrfA sur le promoteur des gènes contrôlés par PrfA (B)

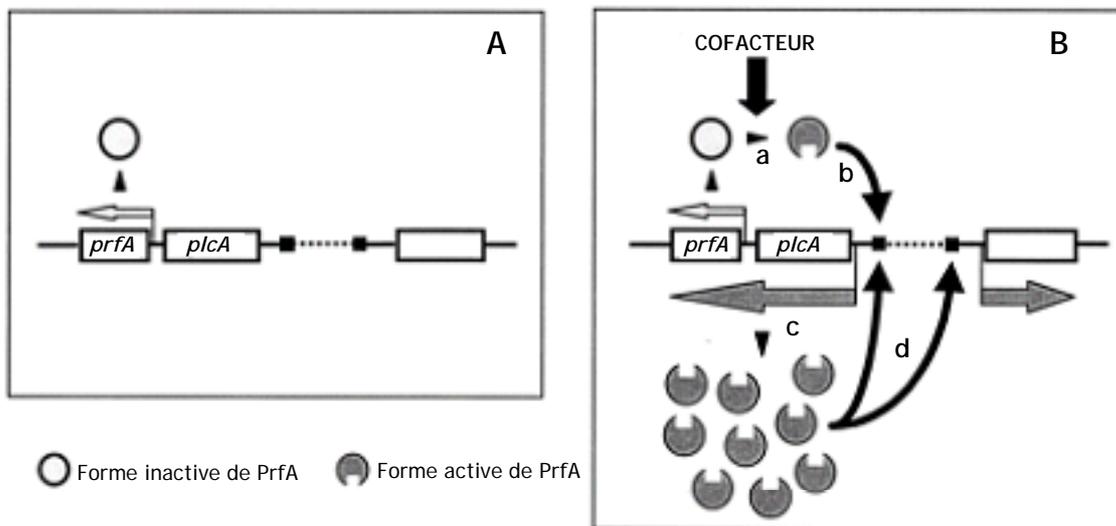
- (A) Comparaison des structures primaires de Crp (« *cAMP receptor protein* » de *E.coli*) et PrfA, deux régulateurs de la famille Crp/Fnr. Les domaines A à F correspondent à des hélices  $\alpha$ . La région AR est la région 1 d'activation (2 autres région AR2 et AR3 sont situées dans le domaine  $\beta$ -roll).
- (B) Comparaison des séquences des boîtes PrfA situées au niveau des promoteurs des gènes *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *inIAB* (P3), *inIC* et *prfA* (P2) par rapport à la séquence consensus.

Vasquez-Boland *et al*, 2001. *Clinical Microbiology Reviews*

Ensuite PrfA, de la même manière que Crp, possède dans sa séquence secondaire une série de feuillets  $\beta$  antiparallèles permettant la formation d'une structure en «  $\beta$ -roll ». Pour Crp, ce domaine est dédié à l'interaction avec le cofacteur cAMP. Pour PrfA, les résidus importants pour l'interaction avec cAMP ne sont pas conservés et cAMP n'agirait pas comme un messager intracellulaire pour les bactéries à Gram-positif (Vega *et al.*, 1998). Le rôle de ce domaine n'a pas encore été attribué pour PrfA.

Cependant de nombreux éléments permettent de penser que PrfA agit en présence d'un cofacteur qui affinerait la complexité du mécanisme. Renzoni et ses collaborateurs (Renzoni *et al.*, 1997) avaient montré que la présence de PrfA n'impliquait pas forcément l'activité dépendante de PrfA. Ensuite, Ripio et ses collaborateurs (1997b) ont notamment décrit des souches à phénotype particulier puisque ces souches de type 2 exprimaient constitutivement les gènes sous la dépendance de PrfA. Ces auteurs ont montré qu'une substitution Gly145Ser était responsable de ce phénotype. Une substitution équivalente a été retrouvée pour Crp chez

*E. coli* et bloquerait Crp sous une conformation active même en absence de cAMP, ce qui laisse penser qu'il existe une double conformation de PrfA, à savoir une forme active et une forme inactive (Vega *et al.*, 1998). La présence de ce cofacteur, alors nommé Paf pour « PrfA activating Factor », a été montrée notamment par footprinting (Bockmann *et al.*, 1996) (Dickneite *et al.*, 1998). Ce facteur de nature protéique et permettant la formation d'un complexe avec l'ADN cible et PrfA (Complexe CI) s'est révélé être au final l'ARN polymérase (Bockmann *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré qu'une mutation dans la structure «  $\beta$ -roll » permettait l'interaction de PrfA sur sa séquence cible mais ne permettait plus la formation d'un complexe stable avec l'ARN polymérase pour initier la transcription, ce qui laisse penser qu'au moins une partie de ce domaine servirait à l'interaction avec l'ARN polymérase (Herler *et al.*, 2001). Cependant, il est probable qu'un autre cofacteur (de faible masse moléculaire) permet le changement rapide de conformation entre la forme active et non active de PrfA. Cette hypothèse rejoindrait toutes les observations et permet d'élaborer le modèle suivant (figure 18) (Vega *et al.*, 1998) :



**Figure 18** : Représentation schématique du système de régulation de PrfA

Vega *et al.*, 1998. *Journal of Bacteriology*

(A) En absence de cofacteur, PrfA est synthétisée à un faible niveau basal à partir du transcrit monocistronique généré à partir du promoteur en amont du gène *prfA*. (B) En présence du cofacteur en concentration élevée, PrfA est activé (figure 18a). Son affinité pour les boîtes *prfA* est augmentée (figure 18b). La présence de la forme active de PrfA stimule la synthèse de formes actives de PrfA en boucle par la transcription de l'ARNm bicistronique

(*plcA-prfA*) situé en amont du gène *plcA* (figure 18c) et mène à l'expression des gènes possédant en amont de leur promoteur une boîte *prfA* (figure 18d). Ce système est fonctionnel tant que le cofacteur est présent en concentration importante.

Par contre un deuxième motif HTH présent du côté N-terminal et un motif leucine zipper du côté C-terminal de PrfA sont absents chez Crp. Par mutation dans la région du motif leucine-zipper, il a été montré que cette structure était impliquée dans l'interaction entre PrfA et sa séquence cible sur l'ADN, probablement car la dimérisation de PrfA ne pouvait pas être réalisée (Herler *et al.*, 2001).

## 252. Comparaison avec les autres espèces du genre : vers la compréhension de l'évolution du genre *Listeria* (figure 19)

L'acquisition de l'îlot de pathogénicité LIPI-1 par certaines souches a probablement été un des premiers événements ayant une répercussion sur la diversité de l'actuel genre *Listeria*. En effet, alors que les espèces ayant acquis LIPI-1 pouvaient coloniser de nouvelles niches comme les tissus des mammifères et donner jour aux espèces pathogènes, *L. grayi* restait une espèce saprophyte et constitue aujourd'hui à elle seule un groupe phylogénétique distinct.

Le deuxième événement fut probablement la séparation du groupe de souches à parasitisme intracellulaire en deux sous-groupes phylogénétiques, l'un constitué par les espèces actuelles *L. monocytogenes* et *L. innocua* et l'autre regroupant *L. seeligeri*, *L. ivanovii* et *L. welshimeri*.

Enfin, cet îlot de pathogénicité aurait été stabilisé chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*, et perdu par *L. innocua* et *L. welshimeri*, une fois le processus de spéciation effectué (Vazquez-Boland *et al.*, 2001a). La perte de ce cluster résulterait d'un souci d'économie pour les bactéries ayant un tropisme pour l'environnement et un mode de vie saprophyte. En effet, pour *L. innocua*, retrouvé largement dans l'environnement, cet îlot permettant le parasitisme intracellulaire ne constituerait pas un avantage adaptatif pour la bactérie. Curieusement, *L. seeligeri* bien que non pathogène ne se serait pas (encore ?) débarrassée de l'îlot de pathogénicité. Celui-ci reste stable à l'état non fonctionnel du fait de l'insertion d'un gène orienté de manière divergente (*orfE*) entre les gènes *plcA* et *prfA*, dont la transcription effective est nécessaire à l'activation en boucle de PrfA.



Plusieurs éléments permettent d'avancer ce scénario. Premièrement, du point de vue phylogénétique, les espèces actuellement pathogènes du fait de la présence de LIPI-1 (*L. monocytogenes* et *L. ivanovii*) appartiennent à des groupes phylogénétiques différents. De même, les espèces ayant perdu LIPI-1 (*L. welshimeri* et *L. innocua*) sont classées dans 2 groupes phylogénétiques distincts. Compte tenu de la distribution aléatoire de l'îlot de pathogénicité au sein de ces groupes phylogénétiques, il est suggéré que ce cluster devait être présent chez un ancêtre commun antérieur à la spéciation car il est peu probable qu'il se soit inséré indépendamment chez les 3 espèces concernées (Vazquez-Boland *et al.*, 2001a).

Ensuite, le taux de polymorphisme (73 à 78%) entre les séquences contenues dans le LIPI-1 de *L. ivanovii* et *L. monocytogenes* correspond au degré de divergence phylogénétique observé entre ces deux espèces (Vazquez-Boland *et al.*, 2001a). D'ailleurs, bien que l'identité entre les deux protéines ActA de *L. monocytogenes* et de *L. ivanovii* aient seulement 34% d'identité, leur fonction reste identique (Gouin *et al.*, 1995 ; Gerstel *et al.*, 1996).

Enfin, les caractéristiques atypiques de l'îlot de pathogénicité LIPI-1 laissent supposer qu'il a beaucoup évolué chez *Listeria* depuis son acquisition lors d'un transfert horizontal de gènes. En effet, le pourcentage G+C de LIPI-1, habituellement plus faible que dans le reste du génome des autres pathogènes, est quasiment identique au reste du génome chez *L. monocytogenes*, à moins que ces gènes proviennent d'une espèce bactérienne proche de *Listeria*. Ensuite, LIPI-1 est a priori inséré de manière stable alors qu'un îlot de pathogénicité est plutôt défini comme un élément instable. Cependant, des séquences homologues aux séquences consensuelles d'intégration Tn1545 auraient été localisées et permettraient de prouver le passage au cours de l'évolution de l'îlot de pathogénicité à ce niveau avant d'être excisé chez *L. innocua* et *L. welshimeri* (Cai & Wiedmann, 2001).

La famille des internalines regroupe des protéines possédant des domaines LLR. Elle est retrouvée largement chez les eucaryotes et dans une moindre mesure chez les bactéries. Cette acquisition chez les bactéries pourrait donc être tout de même relativement récente. Pourtant, les clusters comprenant les gènes codant pour les internalines sont retrouvés dans l'ensemble des espèces du genre *Listeria*, ce qui suppose que les gènes *inl* ont aussi été acquis avant la spéciation. Pourtant, ils sont disposés différemment sur le chromosome en fonction des espèces. *L. ivanovii* possède notamment un cluster comprenant 10 *inl* (LIPI-2) et constitue le 2<sup>ème</sup> îlot de pathogénicité répertorié chez *Listeria* (figure 16). Cet îlot, situé entre 2 gènes de maintenance, n'a pas d'équivalent chez *L. monocytogenes*. LIPI-2, contrairement à LIPI-1,

possède les caractères d'un îlot de pathogénicité : son pourcentage en G+C est différent du reste du chromosome ; il est instable et possède des éléments génétiques responsables de sa mobilité (des gènes codant pour des ARNt) (Vazquez-Boland *et al.*, 2001a).

Ces gènes *inl* sont disposés au moins par deux (sauf *inlC* et *inlF* de *L. monocytogenes*) et sont tous orientés dans le même sens, ce qui favoriserait leur recombinaison de manière assez fréquente et entraînerait leur duplication et leurs réarrangements intra et/ou intergéniques. C'est ainsi que selon les souches de *L. monocytogenes*, un des clusters retrouvés est soit *inlGC2DE* ou *inlGHE* (figure 16), l'un dérivant de l'autre par remaniement chromosomique (Dramsi *et al.*, 1997 ; Raffelsbauer *et al.*, 1998).

Ces domaines LRR caractérisent donc l'ensemble des internalines mais la présence des répétitions de type B et la présence du motif LPXTG est réservée aux internalines de masses moléculaires plus élevées de *L. monocytogenes*. Ce motif LPXTG, bien qu'il ait déjà été observé aussi chez d'autres bactéries à Gram positif et permet l'ancrage de la protéine à la surface bactérienne, n'a jamais été observé conjointement à un domaine LRR. Ces internalines composites sont probablement issues d'une évolution réalisée au sein de l'espèce *L. monocytogenes*, une fois les éléments séparés importés. Cette adaptation spécifique à l'espèce pathogène *L. monocytogenes* pourrait expliquer sa reconnaissance pour de nombreux récepteurs de l'hôte et donc expliquer la différence de tropisme entre *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* (Kreft *et al.*, 2002). LIPI-2, constitué essentiellement de gènes codant pour des internalines de faibles masses moléculaires, possède d'ailleurs le gène *smcL* dont le produit est destiné à lyser les membranes riches en sphingomyéline, tels les érythrocytes des moutons. Ce gène est aussi requis pour permettre la multiplication de *L. ivanovii* dans les cellules d'origine bovine (MDCK) (Vazquez-Boland *et al.*, 2001a ; Vazquez-Boland *et al.*, 2001b).

La dispersion des gènes contrôlés par PrfA sur l'ensemble du génome de *L. monocytogenes* mais aussi sa présence chez *L. ivanovii* et *L. seeligeri* pose encore un problème pour la compréhension de l'origine de ce régulon (Kreft *et al.*, 2002).

### **3. Influence des paramètres environnementaux sur la survie de *Listeria monocytogenes* et sur l'expression du pouvoir pathogène : régulation du mode saprophyte/ parasite**

Comme la plupart des bactéries, *L. monocytogenes* s'adapte aux changements soudains rencontrés durant sa vie à l'état de saprophyte. Cette faculté d'adaptation est un avantage que la bactérie met aussi à profit lors de stress rencontrés dans les ateliers agroalimentaires, dans les aliments mais aussi chez l'hôte qui l'a ingéré. La réponse au stress de *L. monocytogenes* lui garantit une meilleure capacité de survie notamment dans l'aliment et lui laisse en conséquence plus de chance d'infecter l'hôte.

En parallèle, la bactérie perçoit et discrimine les signaux correspondants à ceux de l'environnement ou ceux de l'hôte et adapte son potentiel pathogénique en conséquence (Mekalanos, 1992).

Par contre, plusieurs questions relatives à l'adaptation de la bactérie subsistent :

- 1- les stress rencontrés au cours de la préparation des aliments (et considérés pour la plupart comme doux) ne favorisent-ils pas l'adaptation de la bactérie aux stress plus importants qu'elle va rencontrer chez l'hôte ?
- 2- ces stress n'influenceraient-ils pas la virulence des souches adaptées ?

En d'autres termes, les méthodes de préparation des aliments ne sélectionnent-elles pas des pathogènes plus résistants ou plus virulents ?

#### **31. Les paramètres rencontrés en mode saprophyte et en mode parasite**

##### **311. Les paramètres rencontrés dans l'environnement agroalimentaire**

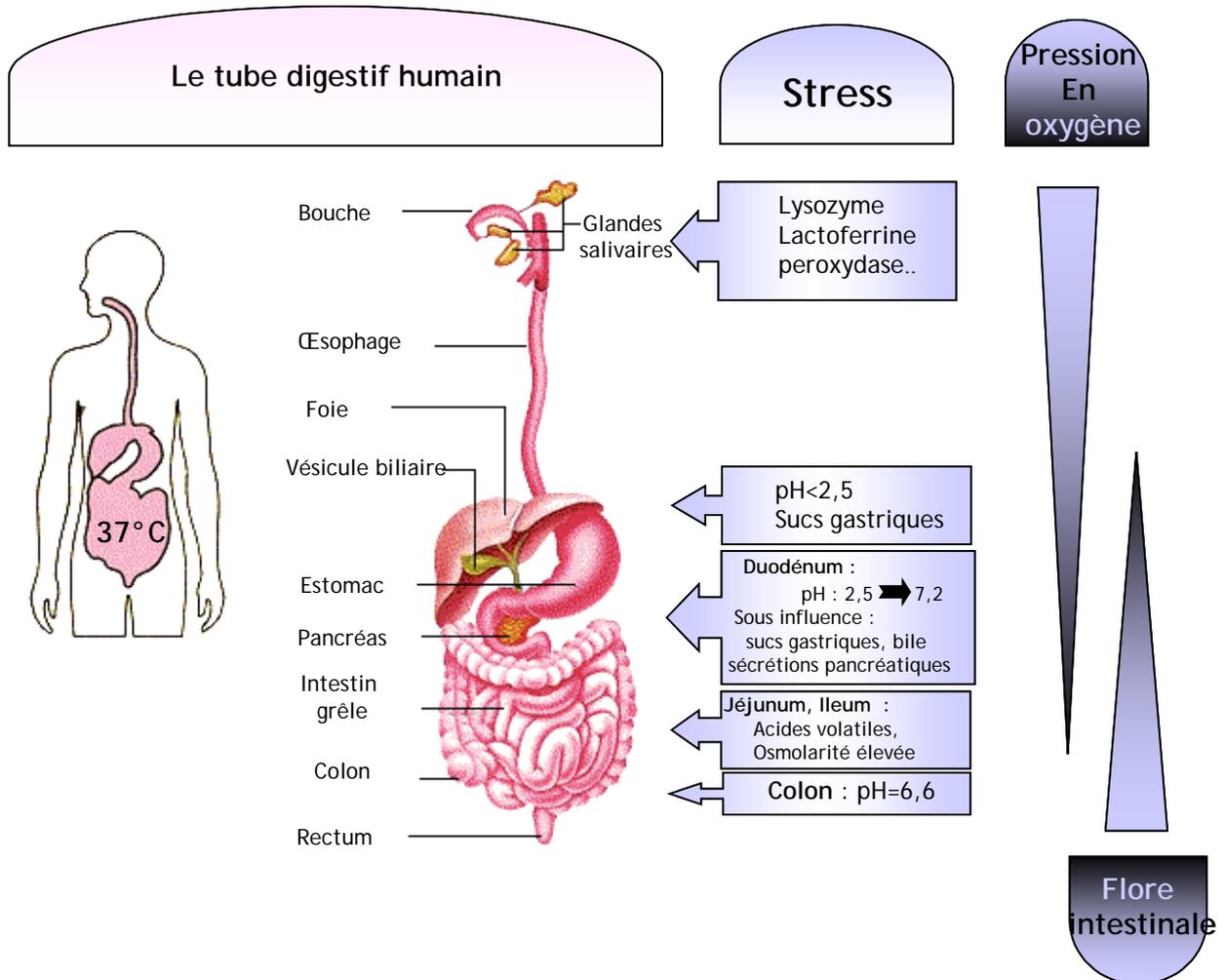
Dans le sol, la température peut varier entre des valeurs proches de 0°C et des valeurs correspondant à la température ambiante. Par contre, dans le milieu agroalimentaire, la bactérie est souvent confrontée aux températures réfrigérées comme aux températures élevées. Ces températures, bien que tolérées pour la plupart, ne correspondent donc pas aux températures optimales de croissance de *L. monocytogenes*.

En ce qui concerne les sources de carbone rencontrées dans la végétation en décomposition, le cellobiose, l'arbutine et les  $\beta$ -glucosides dans leur ensemble sont

fermentables pour *L. monocytogenes*. La concentration en nutriments est souvent faible mais variable selon l'aliment contaminé. La quantité de fer disponible est généralement basse. Les pH rencontrés sont généralement proches de la neutralité tant dans le sol que dans les aliments mais ils sont parfois beaucoup plus extrêmes dans les aliments. L'osmolarité rencontrée dans les aliments peut être élevée (10% de sels).

### 312. Les paramètres rencontrés chez l'hôte (figure 20)

Pour coloniser l'hôte (mammifères et oiseaux principalement), *L. monocytogenes* doit d'abord s'adapter rapidement à la température des animaux à sang chaud, à savoir au minimum 37°C. Ensuite, il lui faut résister aux substances antimicrobiennes comprises dans la salive et dans les sucs digestifs (lactoferrine, lysozyme, peroxydase..). Aux abords de l'environnement gastrique, les variations de pH sont extrêmes. Le pH diminue particulièrement au cours de la digestion des aliments pour atteindre un pH inférieur à 2,5 au niveau de l'estomac humain, puis remonte rapidement au niveau des intestins malgré la présence des acides gras volatiles issus de la fermentation des sucres. De même, la pression en oxygène diminue progressivement jusqu'à l'intestin et à l'inverse l'osmolarité augmente. L'environnement est alors composé d'acides gras volatiles, de sels biliaires, de diverses enzymes bactéricides produites par la muqueuse intestinale et de la microflore résidente. *L. monocytogenes* doit faire face à l'ensemble de ces facteurs pour coloniser le tractus digestif avant d'initier son processus infectieux. Au cours du franchissement de la barrière intestinale et de l'infection des tissus internes, la bactérie est internalisée dans des cellules phagocytaires ou non, et subit l'acidification et la présence de radicaux libres dans le phagolysosome. De même, les changements de compartiment (entre la vacuole du phagosome et le cytoplasme de la cellule par exemple) imposent un rythme d'adaptation élevé pour la bactérie (changements de concentrations de nutriments, de sels, sucres phosphorylés .... ).



**Figure 20** : Les conditions rencontrées par la bactérie lors de son parcours dans le tube digestif humain

### 32. La réponse au stress de *Listeria monocytogenes*

La bactérie perçoit son environnement et les variations de conditions rencontrées grâce à des signaux. Lors d'un stress, l'homéostasie de la cellule est modifiée et met en jeu la survie de la bactérie. Des médiateurs de cette information induisent alors une réponse au stress qui se caractérise (suivant les désordres occasionnés) par réajustement de la fluidité de la membrane, par réparation des ADN ou des ARN endommagés (MutSL est un système de réparation chez *L. monocytogenes* (Merino *et al.*, 2002)), par la synthèse de protéines de stress chargées, soit de replier les protéines endommagées, soit de les détruire, par l'induction de mécanismes permettant soit la modification de son pH intracellulaire, soit des mécanismes limitant l'action de l'agent stressant. L'ensemble des mécanismes de réponse au stress décrit dans ce chapitre sont illustrés dans la figure 21.

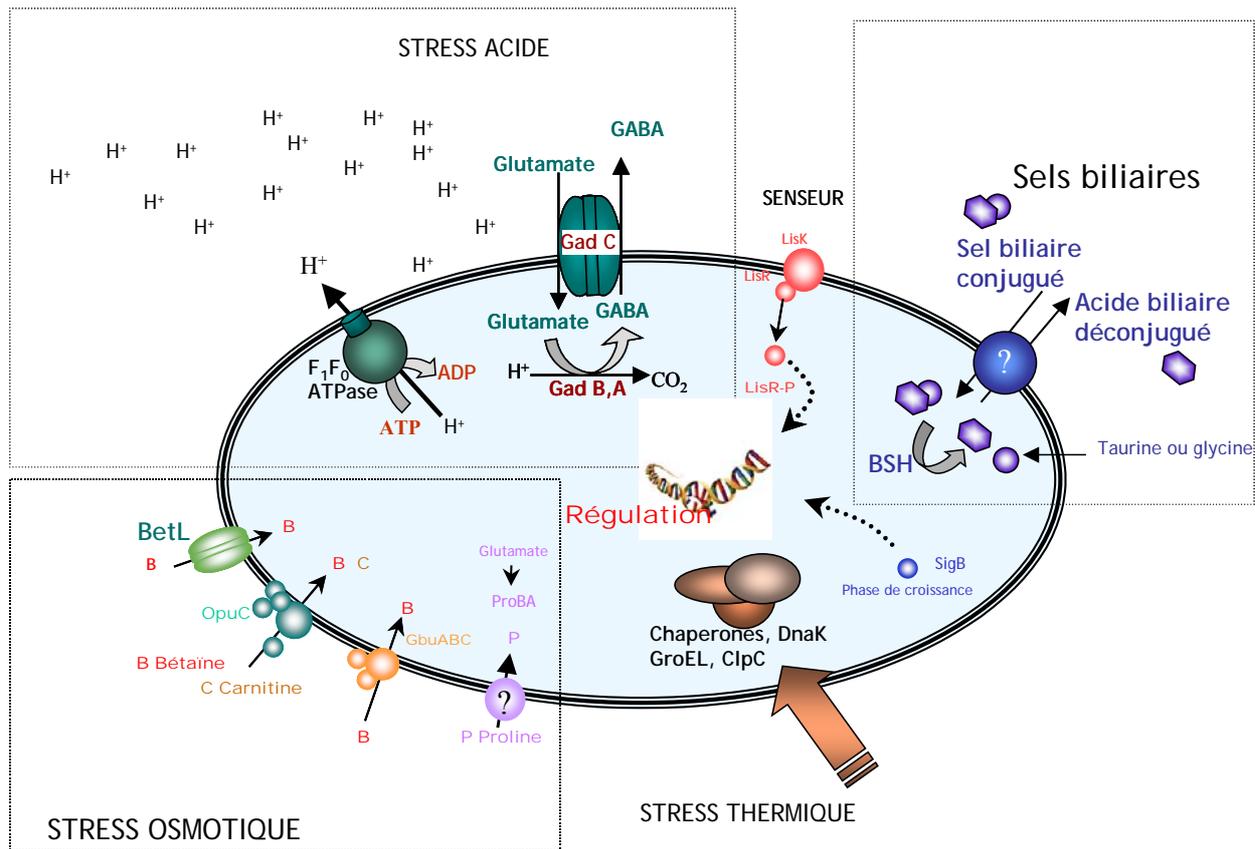


Figure 21 : Représentation schématique de la réponse aux stress de *Listeria monocytogenes*  
Adapté de Hill *et al.*, 2002, *International Dairy Journal*

### 321. Facteurs impliqués dans la réception et la réponse aux signaux de l'environnement

#### □ Le facteur alternatif sigma ( $\sigma^B$ )

Le facteur alternatif  $\sigma^B$  est un facteur de régulation qui coordonne la réponse à divers stress via le contrôle de la transcription des gènes de stress de classe II. Il s'agit d'une sous unité secondaire de l'ARN polymérase qui était déjà connue pour gouverner le régulon de la réponse au stress chez *B. subtilis*. L'activité de  $\sigma^B$  est liée à plusieurs signaux physiques et chimiques, qui, par un mécanisme post-transcriptionnel, permettent le passage de la forme inactive de  $\sigma^B$  (en complexe avec RsbW, un facteur anti  $\sigma^B$ ) à la forme active ( $\sigma^B$  libre) requise pour se complexer à l'ARN polymérase. Une régulation très fine des activités implique cependant d'autres protéines de type Rsb (Becker *et al.*, 1998 ; Wiedmann *et al.*, 1998).

Ainsi, le facteur alternatif  $\sigma^B$  s'est révélé être impliqué, mais de manière variable en fonction de la phase de croissance de la bactérie, dans la réponse au stress acide (Wiedmann *et al.*, 1998), mais aussi dans la réponse au stress osmotique, au stress oxydatif, à la chaleur, à la carence en source de carbone ou encore à l'éthanol (Becker *et al.*, 1998 ; Ferreira *et al.*, 2001). L'activité de  $\sigma^B$  serait aussi nécessaire à la fois à la capture des osmoprotecteurs lors d'un choc froid et lors d'une croissance de *L. monocytogenes* à température réfrigérée (Becker *et al.*, 2000). Enfin  $\sigma^B$  pourrait moduler l'expression de la virulence de la bactérie car le promoteur *prfAp2* serait dépendant du facteur alternatif  $\sigma^B$  (Nadon *et al.*, 2002). La présence de promoteurs putatifs dépendants du facteur  $\sigma^B$  devant plusieurs gènes régulés par PrfA a d'ailleurs été récemment décrite (Milohanic *et al.*, 2003).

#### □ Le système à deux composants LisRK

Plusieurs systèmes de transduction de signal ont été décrits chez de nombreuses bactéries. LisRK, découvert chez la souche LO28, est le seul système à deux composants impliqué dans la réponse au stress décrit chez *L. monocytogenes* (Cotter *et al.*, 1999). Le senseur, LisK correspond à une histidine kinase associée à la membrane. Le régulateur LisR est cytoplasmique et, sous la dépendance de l'état d'activation du senseur LisK, il gouverne la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress. Ce système serait utile à la bactérie pour faire face notamment à l'acidité, à l'éthanol, à la nisine ou encore aux céphalosporines (Cotter *et al.*, 2002). Comme c'est le cas chez d'autres bactéries comme *Salmonella*, ce type de système à deux composants interférerait dans les mécanismes de régulation de l'expression de la virulence. En effet, il a été montré qu'un mutant déficient pour *lisRK* avait une virulence atténuée sur le modèle murin (Cotter *et al.*, 1999). Les gènes contrôlés par ce système restent à ce jour non connus.

### 322. Les protéines générales de stress

Les protéines de stress sont induites par divers stimuli comme un choc thermique, un produit oxydatif, une carence nutritionnelle, un environnement acide ou les dommages causés par un agent chimique ou physique. Ces protéines synthétisées sont principalement de 2 catégories, les protéines chaperonnes et les protéases. Dans la bactérie, les protéines chaperonnes ont la charge d'assembler et de replier correctement les protéines natives comme les protéines endommagées par un stress, alors que les protéases s'occupent d'éliminer des protéines trop endommagées pour être « réparées » et qui par leur accumulation pourraient devenir toxiques pour la bactérie. Les catégories de protéines présentées ici comme

protéines générales de stress sont induites en réponse à divers stress mais il existe aussi des protéines synthétisées sous l'influence d'un stress particulier : par exemple, les CSP pour « *Cold Shock Proteins* » sont induites lors d'un stress froid (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002a), et les ASP pour « *Acid Shock Proteins* » sont induites en conditions acides (Duche *et al.*, 2002).

□ DnaK, GroEL, GroES

La réponse au choc thermique est la réponse la mieux connue et la première caractérisée. Les protéines induites lors de ce stress appartiennent à la famille des HSP mais se sont révélées par la suite non spécifiques aux températures extrêmes. Parmi elles, les protéines DnaK, GroEL et GroES agissent comme des molécules chaperonnes.

L'**opéron *dnak*** a été cloné, séquencé et analysé (Hanawa *et al.*, 2000). Il comprend 4 gènes de choc thermique (*hrcA*, *grpE*, *dnaK*, *dnaJ*) ainsi que 2 Orfs (*orf29* et *orf35*). Cette organisation correspond à celle retrouvée chez d'autres bactéries Gram-positives. La présence d'une séquence CIRCE (pour « Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression ») entre le promoteur situé en amont de *hrcA* et le codon d'initiation de *hrcA*, ainsi que la présence de ce même gène codant pour une protéine homologue à HrcA de *B. subtilis*, laisse effectivement supposer que ce locus fonctionne comme chez *B. subtilis*. Ainsi, ce locus *dnaK* serait contrôlé négativement au niveau transcriptionnel par HrcA et donc appartient aux gènes de stress de classe I. Dnak serait impliqué dans les premières étapes de l'infection chez l'hôte (Hanawa *et al.*, 1999).

De même, l'**opéron *groESL*** a été caractérisé et son organisation correspond à celle des gènes de stress de classe I de *B. subtilis* (Gahan *et al.*, 2001). La synthèse de cet opéron est induite en présence de pH bas, d'éthanol, de sels ou encore de sels biliaires comme c'est le cas chez un grand nombre de bactéries. De plus, l'augmentation de la transcription de *groESL* est observée lors de la présence de *L. monocytogenes* dans les macrophages (Gahan *et al.*, 2001). GroEL et GroES fonctionnent ensemble, l'augmentation de GroES et de GroEL n'a jamais été observée pour ce même type cellulaire (Hanawa *et al.*, 1995), laissant présager qu'une régulation postranscriptionnelle limiterait l'expression de ces protéines.

□ Les protéines codées par l'opéron *clpC*

La thermotolérance implique aussi la famille des protéines caseinolytiques (Clp) qui ont à la fois une activité protéolytique (ATP dépendante) et une activité de chaperonne. Parmi ces protéines de stress, une **ClpC ATPase** a été identifiée (826 acides aminés) (Rouquette *et al.*, 1996). C'est aussi une protéine de la famille des HSP, largement répandue au sein des espèces eucaryotes et procaryotes. Cette HSP est impliquée lors de stress thermiques, de stress osmotique ou encore lors de stress nutritionnel. Par des approches *in vitro*, il a été observé dans un premier temps que ClpC avait un rôle dans la virulence de *L. monocytogenes* en participant à la fuite de la bactérie hors du compartiment vacuolaire du macrophage (Rouquette *et al.*, 1996 ; Rouquette *et al.*, 1998). Curieusement, il a été observé que chez un mutant exprimant constitutivement PrfA, l'expression de *clpC* était abolie. Les mécanismes de régulation de la virulence et de la réponse au stress sont donc là encore liés puisque PrfA contrôlerait négativement ClpC (Ripio *et al.*, 1998). ClpC serait aussi impliquée dans l'internalisation de la bactérie dans les hépatocytes *in vivo*. Il s'est avéré que ClpC pourrait moduler l'expression de InlA, InlB et ActA, trois protéines qui jouent un rôle notamment dans l'internalisation de la bactérie (Nair *et al.*, 2000b). Il a été proposé que ClpC pourrait permettre leur repliement et leur transport vers leur site d'activité.

De même, **ClpE** est impliquée dans la virulence de *L. monocytogenes*. Cette HSP (726 acides aminés) agirait en synergie avec ClpC dans les mécanismes de division cellulaire induits lors de stress nutritionnels ou de stress thermiques occasionnant des pertes d'énergie inhabituelles (Nair *et al.*, 1999). ClpE et ClpC auraient des rôles redondants au niveau de la tolérance au stress et l'absence de l'un des deux composants serait compensée par une surexpression de l'autre.

Enfin, **ClpP**, une protéine de la famille des ClpP serines protéases, s'est révélée indispensable à la survie de *L. monocytogenes* dans les macrophages (Gaillot *et al.*, 2000). ClpP permettrait d'induire la synthèse de la listériolysine O, un des facteurs de virulence impliqué dans la lyse précoce du phagolysosome (Gaillot *et al.*, 2001). Un mutant *clpP* serait moins performant dans l'infection des tissus chez la souris.

La transcription de *clpC*, *clpE* et *clpP* est régulée par CtsR, un répresseur transcriptionnel de la réponse au stress de *L. monocytogenes* (Nair *et al.*, 2000a). En conditions stressantes, ce répresseur ne serait plus capable de se fixer sur la région promotrice des gènes qu'il contrôle, à savoir des gènes de stress de classe III.

323. La réponse à l'acidité

*L. monocytogenes* possède plusieurs systèmes de résistance à l'acide qui permettent à la bactérie de faire face aux bas pH de son environnement. L'ensemble des mécanismes de résistance peut être mis en place lors d'une exposition à un stress subléthal et permet d'augmenter la résistance de la souche lors de l'exposition à un stress léthal. Ces mécanismes d'adaptation sont regroupés sous le terme d'ATR pour « Acid Tolerance Response ».

En réponse à l'acidité, la bactérie doit dans un premier temps mettre en place des systèmes capables de rétablir son homéostasie en maintenant son pH intracellulaire aux alentours de 8. A cet effet, la bactérie module notamment les flux d'entrées et de sortie des protons (Shabala *et al.*, 2002). Les intervenants cités précédemment interviendraient aussi dans cette réponse au stress acide ( $\sigma^B$ , LisRK). Au niveau protéique, un certain nombre de protéines participent à l'ATR (Davis *et al.*, 1996 ; O'Driscoll *et al.*, 1996 ; Phan-Thanh *et al.*, 2000). En complément, *L. monocytogenes* possède des mécanismes spécifiques de résistance à l'acide, à savoir la glutamate décarboxylases (GAD) et la  $F_0F_1$ -ATPase :

□ Le système GAD

Lorsque le milieu extérieur devient acide, la glutamate décarboxylase (L-glutamate-1-carboxy-lyase, EC 4.1.1.15) catalyse la conversion du glutamate en  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) et en  $CO_2$  tout en consommant un proton.

A ce jour, la glutamate décarboxylase a été observée chez peu de bactéries. Ce système est notamment rencontré chez *E. coli*, *Lactococcus lactis* et *Lactococcus brevis*, *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella flexneri*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* et chez certaines espèces de *Mycobacteria* (Sukhareva & Mamaeva, 2002). Pour la plupart de ces espèces, il faut d'ailleurs remarquer qu'elles sont amenées à parcourir le système digestif et coloniser les intestins de l'Homme, ce qui laisse penser que ce système joue effectivement un rôle dans la survie de la bactérie dans l'environnement gastrique en présence de glutamate. Pourtant l'examination de la distribution de *gadAB* chez des bactéries entériques montre que bien que toutes les souches de *E. coli* (173), pathogènes ou non, possèdent ces gènes, la majorité des autres genres testés ne les possèdent pas (Grant *et al.*, 2001).

Chez les bactéries comme *E. coli*, le modèle établi propose que le glutamate du milieu extérieur soit capturé et importé dans la cellule *via* un transporteur spécifique et décarboxylé une fois dans le cytoplasme. D'un côté, le produit de la réaction, GABA, serait exporté via ce même transporteur et contribuerait dans une moindre mesure à l'alcalinisation du milieu environnant, et d'un autre côté, la consommation du proton permettrait de limiter la diminution du pH intracellulaire lors d'un stress acide. Comme chez *E. coli*, l'ensemble du mécanisme implique chez *L. monocytogenes* un antiport membranaire GadC codé par le gène *gadC*, et deux glutamate décarboxylases cytoplasmiques homologues, à savoir GadA et GadB, codées respectivement par les gènes *gadA* et *gadB*, *gadB* faisant partie d'un opéron avec *gadC* (Cotter *et al.*, 2001a). Ces deux enzymes sont probablement issues d'une duplication car *E. coli* et *L. monocytogenes* constituent une exception de ce point de vue. Chez *E. coli*, 2 protéines de liaison à l'ADN seraient impliquées dans la régulation de *gadA* et *gadB* : GadX et GadW. Cependant, la régulation de ce système est très complexe et implique d'autres facteurs de régulation plus généralement impliqués dans la réponse au stress (Ma *et al.*, 2002).

Ainsi, le rôle du système GAD dans la tolérance à l'acidité des fluides gastriques a été montré notamment chez la souche LO28. La transcription des gènes *gadBC* serait induite dès que le pH atteint 5,5 alors que celle du transcrit monocistronique *gadA* nécessiterait des stress plus intenses. De même, ce système est aussi important pour la survie de *L. monocytogenes* dans les aliments fermentés comme dans tous les aliments dont le pH est faible et ceux, même lorsque la quantité de glutamate libre dans l'aliment reste faible (0,22 mM) (Cotter *et al.*, 2001b). Le glutamate libre est omniprésent dans les aliments, et parfois en grande quantité (1200 mg dans 100 g de parmesan ; 140 mg dans 100g de poisson, de tomates ou encore de champignons). De plus, le glutamate libre est parfois ajouté de manière délibérée dans les aliments pour augmenter leur saveur umami. En conséquence, la glutamate décarboxylase pourrait donc être un des mécanismes majeurs impliqués dans la survie de *L. monocytogenes* dans l'aliment et par voie de conséquence dans notre système digestif.

Par ailleurs, il a été observé que le niveau d'activité GAD pouvait être variable en fonction de la souche considérée (Cotter *et al.*, 2001a).

#### □ L' ATPase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>

L'opéron codant pour l'ATPase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> a été identifié chez *L. monocytogenes* grâce à l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés provenant de la séquence de l' H<sup>+</sup> ATPase de *Salmonella* (Cotter *et al.*, 2000). La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase est une enzyme multimérique composée d'une partie catalytique F<sub>1</sub> et d'une partie intégrée dans la membrane F<sub>0</sub>. F<sub>1</sub> comprend

les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  et se charge d'hydrolyser ou de synthétiser de l'ATP.  $F_0$  comprend les sous-unités a, b et c qui, par leur organisation, fonctionnent comme un canal permettant la translocation des protons. En conditions aérobies, la  $F_0F_1$ -ATPase est chargée de synthétiser de l'ATP lorsqu'elle importe des protons dans la cellule alors qu'en conditions anaérobies, elle génère une force proton-motrice par l'expulsion de protons. Grâce à un inhibiteur de l'ATPase, Cotter et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence le rôle de ce mécanisme d'expulsion des protons dans le maintien du pH intracellulaire chez *L. monocytogenes* lorsque le pH de l'environnement diminue (Cotter *et al.*, 2000).

#### 324. La tolérance aux sels via les osmoprotecteurs

La survie de *L. monocytogenes* dans un environnement riche en sels est attribuée majoritairement à l'accumulation de composés organiques nommés osmolytes ou encore osmoprotecteurs. Les osmolytes sont des composés solubles compatibles avec le métabolisme de la cellule, même en concentration élevée. Ils sont soit synthétisés par la cellule, soit importés du milieu extérieur et servent à contrebalancer la pression osmotique externe qui pourrait induire des pertes d'eau et la plasmolyse de la cellule bactérienne. De plus, il a été montré qu'ils étaient aussi destinés à protéger et stabiliser l'activité des enzymes sujettes notamment aux salinités élevées. Les osmoprotecteurs identifiés sont la glycine betaine, la carnitine, l'acétylcarnitine, la  $\gamma$ -butyrobetaine et la proline betaine (Bayles & Wilkinson, 2000). La glycine betaine et la carnitine ne sont pas synthétisées par *L. monocytogenes* et sont importées dans la cellule par un transport actif. Elles seraient aussi impliquées dans la cryotolérance (Sleator *et al.*, 2000).

La capture de la **glycine betaine** est réalisée par BetL, un système de transport spécifique de cet osmolyte (Sleator *et al.*, 1999 ; Sleator *et al.*, 2000). Le gène *betL* est précédé par un promoteur contenant une séquence consensus destinée à sa régulation par  $\sigma^B$ . Il est donc induit au niveau transcriptionnel, mais il serait aussi induit au niveau de l'activité de la protéine. La mutation du gène de ce transporteur n'aurait aucun effet sur la virulence de la souche (Sleator *et al.*, 2000). L'accumulation de la glycine betaine est aussi réalisée par deux autres transporteurs : Gbu (Ko & Smith, 1999) et OpuC (Sleator *et al.*, 2001c), ce dernier servant aussi à l'importation de la **carnitine** (Fraser *et al.*, 2000). GbuA code pour une ATPase, GbuB pour une perméase et GbuC pour une protéine de liaison au substrat, l'ensemble formant un système connu sous le nom de transporteur ABC-ATP dépendant. OpuC fait aussi partie de la famille de protéines de type transporteur ABC-ATP dépendant et

serait le plus impliqué parmi ces 3 transporteurs dans la colonisation de l'intestin grêle (Wemekamp-kamphuis *et al.*, 2002b). Concernant le transport de la carnitine, il ne se ferait pas uniquement par OpuC car un mutant *opuc*<sup>-</sup> pourrait tout de même accumuler la carnitine lors d'un stress salin (Fraser & O'Byrne, 2002). Ce deuxième transporteur pourrait être le transporteur Gbu d'après les derniers travaux de Mendum & Smith (2002). BetL pourrait aussi importer de faibles quantités de carnitine lorsque le stress est réalisé en présence de NaCl (mais pas en présence de KCl) (Angelidis & Smith, 2003).

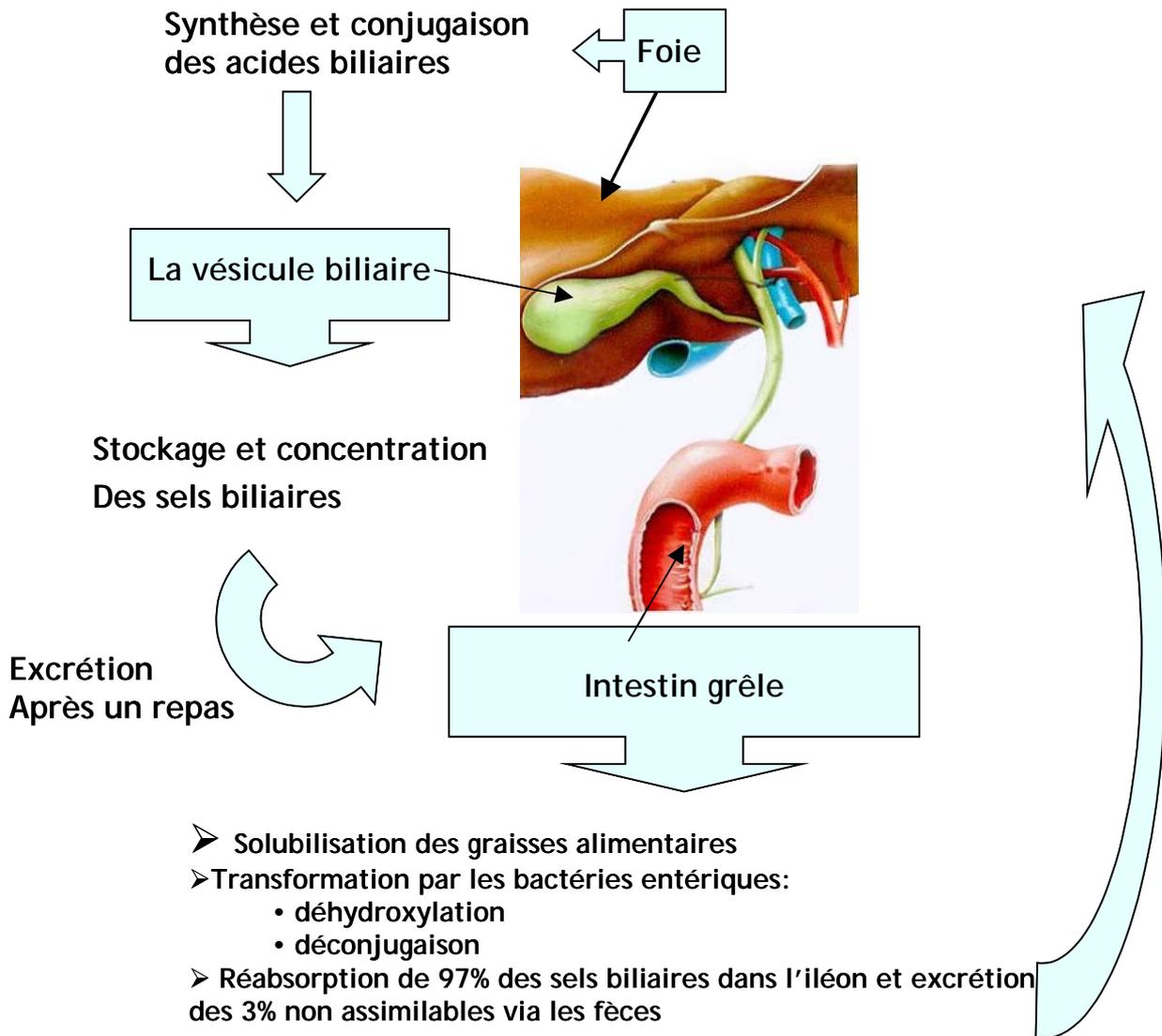
La transcription des gènes *proAB* permet la synthèse d'enzymes qui permettent l'obtention de la **proline** à partir du glutamate. Un mutant *proAB*<sup>-</sup> verrait sa croissance et sa survie affectée en conditions d'osmolarité élevée. Par contre, la virulence de ce mutant ne serait pas modifiée car le mutant pourrait importer la proline de l'hôte via un transporteur non connu à ce jour (Sleator *et al.*, 2001a). De même, l'obtention d'une surproduction de proline par la création de mutations dans le gène *proB* n'aurait pas de répercussion sur le pouvoir pathogène de la souche mais l'osmotolérance de la souche ne serait pas améliorée (Sleator *et al.*, 2001b).

Récemment, le rôle de Ctc, une protéine induite en condition de stress osmotique, a été étudié. Cette protéine contribuerait à la résistance au stress osmotique dans un milieu dépourvu des osmoprotectants préalablement cités (Gardan *et al.*, 2003).

### 325. La résistance aux acides biliaries

La bile est une sécrétion digestive dont les rôles sont multiples. En effet, elle participe à l'émulsification et la solubilisation des lipides lors de la digestion des aliments mais elle permet aussi de tamponner le milieu environnant particulièrement acide aux abords de l'estomac (duodénum). La bile est composée notamment par des sels biliaries qui sont des produits de fin de métabolisme du cholestérol et sont à 95% conjugués soit à la taurine, soit à la glycine dans le foie. Les sels biliaries sont synthétisés dans le foie, concentrés et stockés dans la vésicule biliaire et enfin déversés dans le duodénum en période de digestion. La majeure partie des sels biliaries serait réabsorbée par l'intestin au niveau de l'iléon. Les sels biliaries non réabsorbés sont entraînés vers le colon et excrétés via les fèces (figure 22).

Les sels biliaries, de par leur structure amphiphile, fonctionnent comme des détergents et agissent notamment sur les membranes bactériennes. En effet, les sels biliaries déversés dans l'intestin auraient une activité antimicrobienne et seraient capables de désorganiser les membranes cellulaires.



**Figure 22** : Représentation schématique du cycle entérohépatique des sels biliaires

- Les systèmes de résistance aux sels biliaires des bactéries entériques

De manière à contrecarrer cette toxicité, les bactéries entériques possèdent des systèmes de résistance aux sels biliaires (Gunn, 2000). Chez les bactéries Gram-négatif, la membrane externe constitue par elle-même une excellente barrière hydrophobe contre les sels biliaires. Les molécules non stoppées par cette première barrière (sels biliaires non chargés) pourraient de plus être expulsées par des pompes à flux situées dans la membrane externe (Thanassi *et al.*, 1997). Chez les bactéries Gram-positif, les systèmes de résistance à la bile sont peu connus. Dans un premier temps, comme chez certaines bactéries

Gram-négatif, un senseur leur permettrait de mettre en place une réponse adaptative, notamment par la synthèse de protéines spécifiques. Cette réponse adaptative observée chez *Enterococcus faecalis* (Flahaut *et al.*, 1996) ou encore *Salmonella* (Van Velkingurgh & Gunn, 1999) a récemment été abordée chez *L. monocytogenes* (Begley *et al.*, 2002). Ainsi *L. monocytogenes* est capable de résister à la bile même en présence de concentrations dépassant celles rencontrées dans le tractus digestif (comprises en moyenne entre 0,2 et 2% dans l'intestin grêle). Cette constatation confirme en réalité les observations réalisées par Briones et ses collaborateurs (1992), qui, après inoculation de la bactérie dans la souris par voie intraveineuse, avaient pu isoler *L. monocytogenes* dans la vésicule biliaire où les concentrations de bile sont proches de 10%. La réponse au stress induite par des concentrations subléthales de bile chez *L. monocytogenes* est très rapide (en quelques secondes comme en présence de SDS) et n'impliquent pas de synthèse protéique, ce qui suggère l'activation de mécanismes impliqués dans la composition et la structure de la membrane. En parallèle, plusieurs loci génétiques impliqués dans la résistance à la bile ont été identifiés et correspondent à des facteurs régissant la maintenance de l'intégrité de la membrane ou la réponse au stress. Parmi eux, *btlA* est un locus impliqué dans la tolérance à la bile mais serait aussi impliqué dans la résistance à d'autres stress (sels, éthanol, acides, SDS, ampicilline et phosphomycine) (Begley *et al.*, 2003).

□ La transformation des sels biliaires par les bactéries entériques

Les bactéries entériques possèdent deux mécanismes principaux pour transformer les sels biliaires. Premièrement, les bactéries intestinales ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires conjugués soit à la taurine ou à la glycine grâce à des activités hydrolases réalisées par des enzymes nommées BSH (« *Bile salt Hydrolase* »). Ces activités réduiraient la toxicité des sels biliaires conjugués. En effet, les sels biliaires conjugués provoqueraient certes des dommages au niveau de l'enveloppe mais sous leur forme protonnée, ils diffuseraient passivement à travers l'enveloppe bactérienne et, au contact du pH interne plus élevé, ils passeraient sous forme dissociée (tel un acide faible). En conséquence, l'acidification du cytoplasme ainsi générée inhiberait le transport des nutriments et serait donc toxique pour la bactérie. Par contre, les acides biliaires déconjugés formés grâce aux BSH seraient moins acides, moins solubles, et leur propriété de surfactant serait amoindrie (De Smet *et al.*, 1995 ; De Boever *et al.*, 2000).

L'activité BSH a notamment été retrouvée chez des bactéries du genre *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus* ou encore *Bifidobacterium*. Elle a aussi été retrouvée

chez *L. monocytogenes*, ce qui la rapproche encore des propriétés des bactéries entériques (Dussurget *et al.*, 2002). Il a ainsi été montré que cette activité enzymatique contribuait notamment à la survie de la souche EGD-e dans le tractus intestinal chez le cobaye. Pourtant, il a été observé par Begley et ses collaborateurs (2002), que les produits de l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avaient un effet particulièrement bactéricide pour la souche LO28 non adaptée préalablement.

Le deuxième type de transformation des sels biliaires par certaines espèces de bactéries regroupe des activités menées sur l'acide biliaire déconjugué. L'acide cholique et l'acide chenodeoxycholique (acides biliaires primaires) peuvent être déhydroxylés par les bactéries pour former l'acide deoxycholique et l'acide lithocholique (acides biliaires secondaires) (Hylemon & Harder, 1999). Ces acides biliaires secondaires résultant de l'activité de la flore endogène colique sont par ailleurs connus pour promouvoir les cancers coliques humains.

- L'effet des sels biliaires sur l'expression de la virulence chez plusieurs microorganismes pathogènes

Ainsi, les sels biliaires régulent de manière positive la synthèse des gènes impliqués dans l'invasion de *Shigella* dans la cellule et plus particulièrement les gènes codant pour le système de sécrétion de type III permettant la sécrétion de Ipa (Pope *et al.*, 1995). De même la croissance de *Vibrio parahaemolyticus* en présence de bile permet l'augmentation de la synthèse de protéines impliquées dans la virulence (Pace *et al.*, 1997). Par contre, chez *Vibrio cholerae*, alors que la mobilité de la bactérie est augmentée en présence de sels biliaires, la production de facteurs de virulence comme la toxine CT et la toxine co-régulée avec le pilus TCP serait diminuée (Gupta & Chowdhury, 1997). Enfin, chez *Salmonella typhimurium*, la bile diminue les capacités d'invasion de la bactérie dans la cellule eucaryote plus précisément par la répression de la synthèse du système de sécrétion de type III de l'îlot de pathogénicité SPI-1 (Prouty & Gunn, 2000).

Au sein du genre *Listeria*, seules les espèces pathogènes seraient équipées par le gène *bsh* codant pour la BSH. D'ailleurs, ce gène est précédé par une boîte PrfA, suggérant que ce gène est sous l'influence du régulateur positif des gènes de virulence, ce qui permet de le classer parmi les facteurs de virulence. L'inoculation de la souris par voie intraveineuse de *L. monocytogenes* confirme d'ailleurs qu'une souche délétée du gène *bsh* est moins virulente et plus particulièrement moins efficace au niveau de la colonisation du foie (Dussurget *et al.*, 2002).

### 33. Stress et virulence

La relation entre l'état de stress de *L. monocytogenes* et l'expression de son potentiel pathogène a beaucoup été étudiée et reste un vaste domaine à comprendre. Les tableaux 7 et 8 résument un certain nombre d'études montrant les effets des conditions environnementales sur l'expression du pouvoir pathogène de *L. monocytogenes*.

En réalité, la majorité des mécanismes de tolérance au stress décrit précédemment est impliquée dans la survie de *L. monocytogenes* (tableau 7) et en conséquence dans sa capacité à se multiplier, sachant que les capacités de multiplication sont étroitement liées à la virulence de la souche.

Par ailleurs, *L. monocytogenes* répond aux conditions dans lesquelles la bactérie se trouve, à savoir dans l'environnement ou chez l'hôte (tableau 8) : En effet, l'ensemble des conditions menant à la vie saprophyte de *L. monocytogenes* réprime en général la transcription des gènes de virulence, et plus particulièrement, certains paramètres fonctionneraient comme des senseurs comme la température ambiante voire réfrigérée en milieu industriel ou dans l'aliment et les sucres spécifiquement retrouvés dans la végétation en décomposition. A l'inverse, la température du corps de l'hôte (37°C), les variations de pH rencontrées dans le système digestif, la présence de sucres spécifiques dans la cellule hôte (G1P impliqué dans le turn-over du glycogène), le changement radical de composition du milieu correspondant aux changements de compartiments rencontrés par la bactérie dans son parcours infectieux, la faible teneur en oxygène du système digestif, sont des conditions qui stimulent l'expression du pouvoir pathogène.

La préadaptation des souches à l'acidité et à la température est efficace et pourrait en plus procurer une tolérance à d'autres stress (Lou & Yousef, 1997). Des souches ainsi préadaptées à des stress plus intenses modifient leur virulence vis à vis du modèle animal, ce qui permet de penser qu'effectivement, le traitement des aliments par des stress n'éliminant pas *L. monocytogenes* pourraient avoir une répercussion sur leur pouvoir pathogène chez l'Homme (O'Driscoll *et al.*, 1996 ; Marron *et al.*, 1997 ; Conte *et al.*, 2000b). Pourtant des études ont montré que la conservation de *L. monocytogenes* à 4°C diminue sa virulence chez l'œuf embryonné de poulet (Buncic *et al.*, 1996). Par ailleurs, cet effet serait plus ou moins important selon la souche : les souches isolées d'aliments (et majoritairement de sérogroupe 1) sont plus affectées par la conservation à 4°C que les souches cliniques (majoritairement des souches 4b) une fois inoculée chez l'œuf embryonné de poulet (Avery & Buncic, 1997 ; Buncic *et al.*, 2001).

Tableau 7 : Effet de stress sur la virulence de *Listeria monocytogenes*

Paramètre testé en condition de stress :	Référence	Méthode	Influence sur la virulence
<b>Mécanismes non spécifiques induits lors de stress :</b>			
<b>MutSL</b> (réparation de l'ADN) <b>Le facteur <math>\sigma^B</math></b>	Merino <i>et al.</i> , 2002 Nadon <i>et al.</i> , 2002	EGD $\Delta$ mutSL souche $\Delta\sigma^B$	▼ virulence du mutant chez la souris ▼ virulence du mutant chez la souris
<b>LisRK</b> <b>Senseurs putatifs (RR)</b>	Cotter <i>et al.</i> , 1999 Kallipolitis & Ingmer, 2001	souche $\Delta$ lisRK LO28 $\Delta$ RR	▼ virulence du mutant chez la souris ▼ virulence du mutant chez la souris
<b>Le stress thermique :</b>	Leimeister-Wachter <i>et al.</i> , 1992 Sokolovic <i>et al.</i> , 1993	Analyse transcriptionnelle en fonction de la t°C Analyse protéique 1D en fonction de la t°C	▲ synthèse de LLO à température $\geq 37^\circ\text{C}$ ▲ synthèse de toutes les protéines dépendantes de PrfA en choc chaud
Mécanismes induits : <b>DnaK</b> <b>GroEL, GroES</b>	Hanawa <i>et al.</i> , 1999 Hanawa <i>et al.</i> , 1995 Gahan <i>et al.</i> , 2001	souche $\Delta$ dnaK analyse protéique 2D analyse transcriptionnelle	survie de la souche ▼ dans les macrophages pas de surexpression dans les macrophages ▲ transcription dans les macrophages
<b>ClpC</b>	Rouquette <i>et al.</i> , 1998 Ripio <i>et al.</i> , 1998 Nair <i>et al.</i> , 2000b	LO28 $\Delta$ clpC souche PrfA* souche $\Delta$ clpC	▼ sortie du phagolysosome connexion entre PrfA et ClpC ▼ internalisation via InlA, InlB, ActA
<b>ClpE</b> <b>ClpP</b>	Nair <i>et al.</i> , 1999 Gaillot <i>et al.</i> , 2001	souche $\Delta$ clpE souche $\Delta$ clpE	▼ virulence du mutant chez la souris ▼ synthèse de LLO
<b>Le stress acide :</b> Mécanismes d'adaptation :	O'Driscoll <i>et al.</i> , 1996 Saklani-Jusforgues <i>et al.</i> , 2000 Conte <i>et al.</i> , 2000b Marron <i>et al.</i> , 1997	LO28 préadaptée à l'acide LO28 préadaptée à l'acide Souches préadaptées à l'acide LO28 $\Delta$ ATR	▲ virulence du mutant chez la souris inoculée par voie intraveineuse (VI) ou gastrique (VG) ▲ internalisation dans les Caco-2 et les macrophages ▼ virulence du mutant chez la souris
Mécanismes spécifiques : <b>Le système GAD</b>	Cotter <i>et al.</i> , 2001a	LO28 $\Delta$ gad	▼ survie dans les fluides gastriques
<b>L' ATPase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub></b>			?
<b>Le stress osmotique</b> Mécanismes spécifiques :	Sleator <i>et al.</i> , 2000 Sleator <i>et al.</i> , 2001c Wemekamp-kamphuis <i>et al.</i> , 2002b	LO28 $\Delta$ betL Souche $\Delta$ opuC Souche $\Delta$ betL $\Delta$ opuC $\Delta$ gbu	aucun effet sur la virulence : compensation ▼ colonisation de l'intestin grêle ▼ colonisation de l'intestin grêle et de la virulence par inoculation orale
<b>Le stress oxydatif</b>			?
<b>Les sels biliaires</b>	Dussurget <i>et al.</i> , 2002 Begley <i>et al.</i> , 2003	EGD-e $\Delta$ bsh LO28 $\Delta$ btlA	▼ colonisation de l'intestin grêle ▼ multiplication dans le foie — virulence chez la souris par voie IP

**Tableau 8 : Effet des conditions environnementales sur la virulence de *Listeria monocytogenes***

Paramètre testé	Référence	Méthode	Influence sur la virulence
<b>Milieu environnement :</b>			
<b><u>La température</u></b>	Datta & Kothary, 1993 Renzoni <i>et al.</i> , 1997	Analyse transcriptionnelle ou protéique en fonction t°C	▲ gènes PrfA-dépendants à 37°C Répression pour des températures ≤26°C
Préadaptation 4 semaines à 4°C	Buncic <i>et al.</i> , 1996	Analyse enzymatique	▼ activité LLO et ▼ virulence chez l'œuf embryonné de poulet
<b><u>La teneur en oxygène :</u></b> Faible teneur en O <sub>2</sub>	Dussurget <i>et al.</i> , 2002	Suivi d'activité enzymatique	▲ activité BSH
<b><u>La source de carbone :</u></b> <b>présence/absence :</b>			
<b>B-glucosides :</b> Cellobiose, Arbutine, salicine	Park & Kroll, 1993 Park, 1994 Brehm <i>et al.</i> , 1999  Huillet <i>et al.</i> , 1999	Analyse transcriptionnelle et enzymatique Disruption <i>bvrAB</i> (capture des β-glycosides) Disruption <i>mdlR</i> (pompe à flux)	▼ synthèse de <i>hly</i> et <i>plcA</i>  Répression des gènes de virulence abolie  Répression de <i>hly</i> abolie
<b>Autre sucres :</b> Glucose, fructose, maltose, tréhalose	Milenbachs <i>et al.</i> , 1997 Behari & Youngman, 1998	Analyse transcriptionnelle et enzymatique Analyse transcriptionnelle	▼ synthèse de LLO et Pi-PLC  ▼ synthèse de <i>hly</i> indépendante de la répression catabolique
Glucose-1-phosphate	Ripio <i>et al.</i> , 1997a	Analyse transcriptionnelle	▲ multiplication intracytoplasmique sans réprimer le système PrfA
Glucose-6-phosphate	Chico-Calero <i>et al.</i> , 2002	EGDΔ <i>htp</i> (translocaseG6P)	▼ virulence du mutant chez la souris
<b><u>Les nutriments</u></b>			
Milieu riche (TSB,BHI)	Ripio <i>et al.</i> , 1996	Analyse transcriptionnelle et enzymatique	▼ synthèse de <i>prfA</i> , <i>hly</i> et <i>plcB</i> Répression des gènes de virulence abolie
Milieu riche + charbon de bois activé	Ripio <i>et al.</i> , 1996		
Passage du BHI à un milieu minimum (MEM)	Bohne <i>et al.</i> , 1994	Analyse transcriptionnelle	▲ expression gènes de virulence
Apports en oligopeptides	Borezee <i>et al.</i> , 2000	LO28 Δ <i>oppA</i> (transporteur spécifique)	▼ survie dans les macrophages ▼ multiplication dans les organes de la souris
Apports en Cu <sup>2+</sup>	Francis & Thomas, 1997	Souche Δ <i>ctpA</i> (transporteur spécifique)	▼ multiplication dans les organes de la souris
Apports en NaCl Apport en KCl	Myers <i>et al.</i> , 1993 Myers <i>et al.</i> , 1993	Suivi des activités enzymatiques	▲ catalase et activité hémolytique et pour des doses > 428mM — virulence chez la souris par VG ou VI
<b>Le fer</b>			
Milieu riche en fer	Conte <i>et al.</i> , 1996a  Bockmann <i>et al.</i> , 1996	Analyse transcriptionnelle  Footprinting sur extraits protéiques de EGD	▲ expression <i>inlA</i> , <i>inlB</i> ▲ internalisation dans les Caco-2 ▼ interaction PrfA sur le promoteur de <i>hly</i> et <i>actA</i>
Déplétion du milieu en fer	Conte <i>et al.</i> , 2000a	Analyse transcriptionnelle	▲ expression <i>actA</i> comme <i>prfA</i> et <i>hly</i>

Un dernier paramètre de croissance n'a pas été envisagé dans l'étude de la relation à la virulence et il n'est pourtant pas des moindres. Il s'agit de la présence de *L. monocytogenes* à l'état immobilisé au sein de biofilms. C'est justement cet état immobilisé qui entraîne des problèmes de nettoyage et désinfection dans les ateliers agroalimentaires car les désinfectants y diffuseraient moins bien et plus lentement (Norwood & Gilmour, 2000).

Chez *Vibrio cholerae*, des régulateurs des systèmes senseurs contrôleraient directement les gènes de virulence (Zhu *et al.*, 2002). Cependant, le plus souvent, ce sont plus particulièrement des facteurs de régulation qui feraient office de « carrefour » entre la capacité à former des biofilms et la virulence car les mécanismes impliqués seraient communs. ToxR chez *Vibrio anguillarum* (Wang *et al.*, 2002), GacA (Parkins *et al.*, 2001) ou encore PPK (Rashid *et al.*, 2000) chez *Pseudomonas aeruginosa* ont été identifiés et répertoriés comme essentiels à la formation de biofilm et à la virulence. Chez *Streptococcus mutans*, ClpP est impliqué dans la formation de biofilms (Lemos & Burne, 2002). Par contre, chez *Salmonella* Typhimurium, la virulence de la souche n'est pas modifiée quel que soit le mode préalable de culture, à savoir à l'état planctonique ou en biofilm (Turnock *et al.*, 2002).

L'implication du « phénotype biofilm » sur la survie et/ou la virulence de *L. monocytogenes* est inconnue. L'influence de ce paramètre sur la colonisation de l'intestin pourrait avoir un impact mais reste difficile à apprécier compte tenu de la complexité des interactions avec la flore endogène.

De même, la présence de la flore endogène influence probablement la perception des signaux environnementaux par *L. monocytogenes*. Par exemple, il a déjà été observé que la flore naturellement présente dans la viande pouvait moduler les capacités de *L. monocytogenes* à mettre en place sa réponse au stress acide (ATR) (Samelis *et al.*, 2001).

# **Matériel et Méthodes**

## Mise en place des techniques d'étude

Les souches de *Listeria monocytogenes* mises à disposition constituent par leur origine l'une des originalités du projet. Le soucier complet est donc présenté dans une première partie. Lors de ce travail de thèse, l'évaluation du potentiel invasif des souches de *L. monocytogenes* a nécessité au préalable la mise en place au laboratoire des techniques d'étude *in vivo* et *in vitro*. En conséquence, seules les techniques les plus spécifiques et celles ayant nécessité des choix de modèle sont détaillées. Le choix des méthodes et leur validation sont donc présentés dans une seconde partie.

### 1. Le soucier (tableau 9)

#### 1.1. Les souches isolées de prélèvements humains

Les souches Scott A (CIP 103575), EGD-e et LO28, considérées comme des souches de référence, proviennent de l'Institut Pasteur de Paris (Centre National de Référence des *Listeria* dirigé par P. Martin et Unité interactions bactéries-cellules dirigé par P. Cossart). Scott A est une souche responsable d'une épidémie d'origine alimentaire (lait) qui a eu lieu en 1983 aux Etats Unis. EGD-e est l'une des souches les plus étudiées et son génome a été séquencé (Glaser *et al.*, 2001). Cette souche de laboratoire serait dérivée d'une souche isolée lors d'une épidémie dans un élevage d'animaux de laboratoire. La souche LO28 est une souche isolée chez une femme enceinte en bonne santé (Espagne) et sera qualifiée de souche de portage de référence.

Les souches H1 à H38 ont été isolées chez des personnes hospitalisées, des consultants externes ou encore des employés de la restauration subissant un examen dans le cadre de la médecine du travail (tableau 9).

Selon les patients, les souches de portage sont issues d'une campagne de prélèvement réalisée entre Janvier 1991 et Novembre 1997 au Centre Hospitalier Général Philippe Le Bon de Beaune (Côte d'Or, France). Ainsi, sur les 2500 prélèvements analysés (oraux (338), fécaux (932) ou génitaux (1180), 14 souches de *L. monocytogenes* ont pu être isolées chez des personnes pour lesquelles aucun symptôme de listériose n'a pu être observé. En parallèle, des souches de *L. welshimeri* et de *L. innocua*, isolées au cours de cette campagne de prélèvement, ont été utilisées comme souches non pathogènes de référence pour la validation des techniques mises en place. Ces isollements ont été obtenus par deux protocoles spécifiques

consistant à effectuer préalablement soit un enrichissement en bouillon à 37°C avant une incubation supplémentaire de 2 mois à 4°C soit directement un enrichissement en bouillon (Rousset *et al.*, 1994).

Les souches cliniques (sporadiques et épidémiques) proviennent des laboratoires hospitaliers nationaux suivant : Laboratoire de bactériologie, Hôpital-Sud de Rennes (Pr Cormier) ; Service de biologie, Centre hospitalier de Chalon-sur-Saône ; Laboratoire de bactériologie de la faculté de Médecine de Strasbourg (Université Louis Pasteur) ; Centre Hospitalier Universitaire de Dijon ; Centre Hospitalier Général de Beaune, Service Biologie (Pr Rousset).

**Tableau 9** : Liste des souches de *Listeria monocytogenes* étudiées

Isolements de <i>L.monocytogenes</i>	Origine	Serogroupe
<b>Porteurs sains</b>		
Isolements fécaux		
H1	Femme enceinte (Beaune, France, 1991)	1
H2	Enfant de 3 ans (Beaune, France, 1992)	4
H6	Femme de 30 ans (Beaune, France, 1991)	
H11	Homme de 35 ans (Beaune, France, 1992)	1
H17	Enfant de 10 ans (Beaune, France, 1992)	
H27	Enfant de 2 ans (Beaune, France, 1994)	4
H28	Enfant de 7 ans (Beaune, France, 1994)	1
H31	Homme de 55 ans (Beaune, France, 1995)	1
H32	Femme de 19 ans (Beaune, France, 1996)	1
H34	Enfant de 8 ans (Beaune, France, 1997)	1
H35	Enfant de 11 ans (Beaune, France, 1997)	1
H38	(Beaune, France, données non communiquées)	
LO28	Femme enceinte (Espagne)	1/2c
Isolement oral		
H12	Homme de 39 ans (Beaune, France, 1991)	4
<b>Listérioses sporadiques</b>		
Isolements cliniques		
H3	Hémoculture (Chalon/Saône, France, 1991)	1
H4	Hémoculture (Beaune, France, 1992)	1
H5	Liquides céphalorachidiens (Chalon/Saône, France, 1991)	1
H7	Frottis génital (Beaune, France, 1992)	1
H8	Hémoculture (Chalon/Saône, France, 1992)	1
H9	Hémoculture (Dijon, France, 1992)	1
H10	Frottis périphériques (Chalon/Saône, France, 1991)	4
H13	Hémoculture et liquides céphalorachidiens (Chalon/Saône, France, 1991)	4
H14	Liquides céphalorachidiens (Rennes, France, 1992)	4
H15	Hémoculture (Rennes, France, 1992)	1
H16	Hémoculture (Rennes, France, 1992)	1
H18	Hémoculture (Strasbourg, France, 1992)	1/2b
H19	Hémoculture (Strasbourg, France, 1992)	4b
H21	Hémoculture (Strasbourg, France, 1992)	4
H22	Hémoculture (Strasbourg, France, 1992)	4b
H23	Foie (Strasbourg, France, 1992)	1
H24	Placenta (Strasbourg, France, 1992)	4b
H25	Placenta (Strasbourg, France, 1992)	1/2a
<b>Listérioses épidémiques</b>		
Scott A	Epidémie humaine liée à du lait contaminé (Massachusetts, USA, 1983)	4b
EGD-e	Souche dérivée d'une souche responsable d'une épidémie dans un élevage d'animaux de laboratoire (Angleterre, 1924)	1/2a
H36	Epidémie humaine liée à du fromage Epoisses (France, 1999)	4b

## 12. Les souches isolées de l'environnement

Ce lot comprend des souches de *L. monocytogenes* d'origine très diverse qui représentent des maillons importants du cycle de transmission du pathogène. Des souches ont pu être isolées de fèces de corneille, source éventuelle de contamination dans un premier temps du sol. *L. monocytogenes* a été isolée de matières végétales en décomposition (compost), de surfaces biotiques animales (carcasses de bœuf) ou de surfaces abiotiques de plans de travail, de matériels de transformation des aliments ainsi que de produits alimentaires eux-mêmes (saumure, fromage et viande).

Les souches NV4, NV5, NV7 et NV8 proviennent du « Laboratoire départemental de la Haute Vienne » (France). Les autres souches font partie de la collection du laboratoire de Microbiologie UMR INRA/UB 1232, Dijon (France).

### Suite du tableau 9 :

Isolements de <i>L.monocytogenes</i>		Origine	Sérogroupe
Isolements de l'environnement		<b>Prélèvements issus de l'environnement</b>	
NV4	Viande de bœuf haché (Limoges, France)		1/2a
NV5	Viande de bœuf haché (Limoges, France)		1/2c
NV7	Carcasse bovine (Limoges, France)		1/2c
NV8	Carcasse bovine (Limoges, France)		1/2a
1E	Machine /Industrie du fromage (Dijon, France, 1990)		1/2b
3E	Evier /Industrie du fromage (Dijon, France, 1990)		1/2b
6E	Mur /Industrie du fromage (Dijon, France, 1990)		1/2a
1S	Saumure (Dijon, France, 1990)		1/2a
2S	Saumure (Dijon, France, 1990)		1/2a
3S	Saumure (Dijon, France, 1990)		1/2a
1F	Fromage (Dijon, France, 1990)		1/2a
2F	Fromage (Dijon, France, 1990)		1/2a
7F	Fromage (Dijon, France, 1990)		3b
C9	Compost (Dijon, France, 1990)		nd
Isolements fécaux		<b>Portage animal</b>	
23	Fèces de corneille (Besançon, France, 1995)		4
38	Fèces de corneille (Besançon, France, 1995)		1
81	Fèces de corneille (Besançon, France, 1995)		1
97	Fèces de corneille (Besançon, France, 1995)		1

### 13. La conservation des souches

Les souches humaines ont été isolées sur le milieu gélosé sélectif ACA (Acriflavine (10 mg/l, Sigma)-Ceftazidime (50 mg/ml, Glaxo Wellcome) ou sur gélose au sang (Rousset *et al.*, 1994). Après identification, les souches ont été resuspendues dans une solution hypertonique cryo-préservatrice commerciale et conservées sur billes de plastique préalablement immergées dans la solution inoculée (Cryo-billes, AES Laboratoires). Les tubes de congélation contenant les billes sont stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les souches environnementales ont été conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du Bouillon Cœur Cerveille (BCC, Biomérieux) supplémenté par 30% de glycérol.

Avant chaque utilisation d'une souche, une bille de plastique ou la culture glycérolée est ensemencée sur gélose ACA. Après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h, une colonie isolée est transférée généralement dans du bouillon BCC sauf pour des essais particuliers.

## 2. Evaluation du potentiel invasif des souches humaines de *L. monocytogenes*

Quatre approches ont été envisagées : la recherche des activités enzymatiques de certains facteurs de virulence, la détection par Western blot des protéines d'invasion InlA et InlB, l'infection de la lignée de cellules épithéliales coliques (Caco-2) et l'inoculation de l'œuf embryonné de poulet.

### 21. La détection des activités enzymatiques impliquées dans la virulence

Des tests enzymatiques simples sur géloses appropriées témoignent de l'expression et de l'activité des facteurs de virulence tels que LLO et les deux phospholipases (Pi-PLC et Pc-PLC). Ces tests sont réalisés selon des protocoles établis par Fujisawa *et al.* (1994) pour l'activité hémolytique, Coffey *et al.* (1996) pour l'activité phospholipasique de Pc-PLC et Notermans *et al.* (1991a) pour l'activité phospholipasique de Pi-PLC.

### 22. La détection de facteurs de virulence InlA et InlB par Western-blot

Les protéines InlA et InlB ont été recherchées dans différentes fractions cellulaires d'une culture de *L. monocytogenes*, à savoir principalement le surnageant de la culture obtenu après centrifugation et une fraction contenant les protéines associées à la surface bactérienne (nommées PAMs pour « Protéines associées à la membrane »). Le protocole utilisé pour

récupérer les PAMs est celui utilisé notamment par l'équipe de G. Dubray (Tabouret *et al.*, 1992) ou encore l'équipe de T. Chakraborty (Lingnau *et al.*, 1995).

Les anticorps monoclonaux dirigés contre InlA (L7.7) (Mengaud *et al.*, 1996a) et contre InlB (B4.6) (Braun *et al.*, 1999) ont été fournis par l'Institut Pasteur (Paris), à une concentration de 1mg/ml dans du tampon phosphate. Ils sont utilisés couramment au laboratoire au 1/1000.

### 23. Infection de la lignée cellulaire Caco-2

Des tests d'infection *in vitro* sur la lignée cellulaire de carcinome colique humain Caco-2 permettent d'évaluer la capacité des souches à entrer, se multiplier et se disséminer dans la monocouche cellulaire.

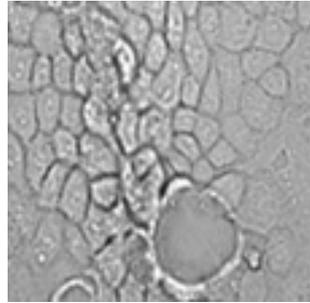
#### 231. Choix de la lignée et entretien de la lignée

Les interactions cellule hôte / microorganisme pathogène sont couramment étudiées sur des lignées cellulaires établies à partir d'adénocarcinomes humains. Les Caco-2 figurent parmi les lignées les plus utilisées pour étudier les interactions des microorganismes pathogènes (dont *L. monocytogenes*) avec les cellules intestinales humaines.

Bien qu'une lignée cellulaire reste un modèle *in vitro*, et donc imparfait, les cellules Caco-2 ont l'avantage d'exprimer des caractères spécifiques des cellules intestinales humaines normales. En effet, en conditions de croissance standard de laboratoire, elles évoluent dans le temps selon le processus de maturation proche de celui effectué par les entérocytes lors de leur migration de la crypte jusqu'aux villis (bien qu'à l'origine elles soient de nature colique). Après repiquage, les cellules se multiplient de manière exponentielle et forment rapidement des îlots circulaires qui se propagent progressivement en monocouche. Les cellules périphériques sont non différenciées et prolifèrent alors que les cellules au centre de l'îlot deviennent polarisées puis se différencient. A confluence, c'est à dire après 5 à 6 jours de culture, l'ensemble de la monocouche est engagé dans le processus de polarisation. Le processus de différenciation est complètement terminé après 10 jours environ de culture. Dès le cinquième jour de culture, les cellules Caco-2 présentent la particularité de former du mucus et des dômes, à savoir des structures circulaires correspondant à un soulèvement de la monocouche cellulaire par accumulation de fluides.

Ces dômes traduisent le dynamisme d'un transport hydroélectrique transmembranaire et aussi leur état de confluence.

Par contre, de part leur origine maligne, les Caco-2 ont un métabolisme particulier, à savoir notamment une forte consommation en glucose et une accumulation importante de glycogène.



Monocouche cellulaire à confluence (X40)

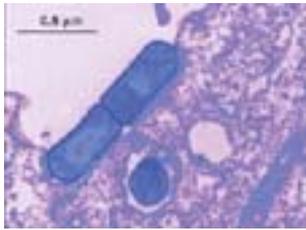
Les cellules produisent du mucus et des dômes

La lignée cellulaire provient de la European Collection of Cell Cultures (ECACC n°86010202, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom). Elle est conservée dans l'azote liquide dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium) complet supplémenté par du DMSO (10% final vol/vol). Le milieu DMEM, pour être qualifié de complet est supplémenté par du sérum de veau fœtal (10% vol/vol final), 2 mM de L-glutamine et des acides aminés non essentiels (1% vol/vol final). De manière à éviter une contamination bactérienne, le milieu est supplémenté de la pénicilline G (100 U/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml) lorsque les cellules sont cultivées en flasques de 25 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

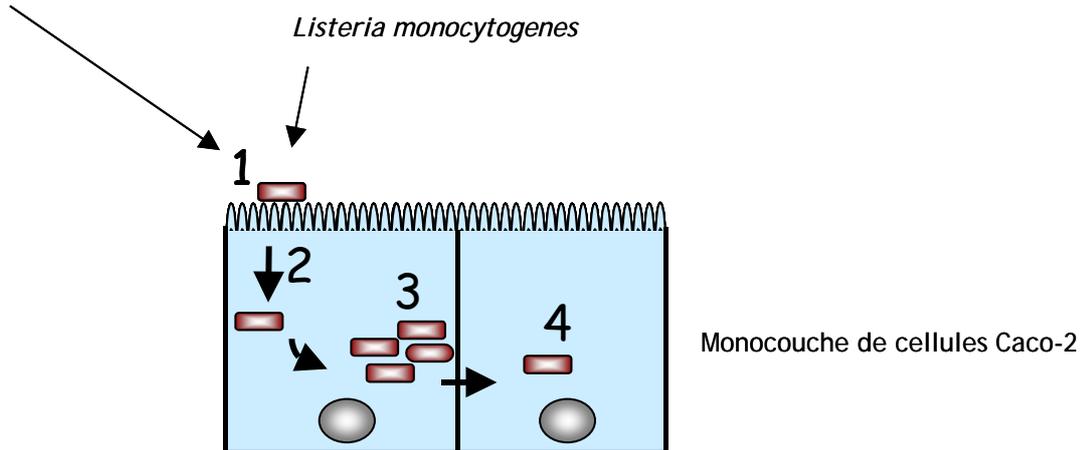
Une fois à confluence (4 à 5 jours de culture), les cellules sont repiquées par trypsination. Le milieu est renouvelé tous les 2 à 3 jours. Pour l'ensemble des types de test d'infection effectués, les cellules sont utilisées entre les passages 36 et 50 en plaque 6 ou 24 puits.

### 232. Infection des Caco-2 par *Listeria monocytogenes* (figure 23)

Utilisée pour la première fois par le groupe de P. Sansonetti (Gaillard *et al.*, 1987), la lignée cellulaire Caco-2 s'est révélée être un bon modèle *in vitro* pour l'étude de l'invasion et de la multiplication intracellulaire de *L. monocytogenes* dans une cellule non phagocytaire.



*L. monocytogenes* en cours d'internalisation dans la cellule hôte (Mengaud *et al.*, *Cell*, 1996b)



Temps de contact avec ou sans antibiotique extra-cellulaire

	Sans	Avec
1: Adhésion	30 mn	
2: Invasion	2 h	1 h 30mn
3: Multiplication intracellulaire	2 h	19 h
4: Dissémination intracellulaire	2 h	48 h

**Figure 23** : Mesures *in vitro* des étapes de l'infection par l'utilisation de la lignée cellulaire Caco-2

- Tests d'adhérence, d'invasion et de multiplication intracellulaire selon le protocole décrit par le groupe de P. Velge (Van Langendonck *et al.*, 1998)

Les cellules sont repiquées en plaques de 24 puits et infectées à semi-confluence après 3 jours de culture ( $10^6$  cellules/puits). Lorsque les cellules sont cultivées dans du DMEM complet avec antibiotiques, ce milieu est remplacé par du DMEM complet sans antibiotiques 12 heures avant l'infection.

Les cultures bactériennes d'une nuit sont centrifugées et le culot bactérien est repris par un même volume de DMEM. Le tapis cellulaire est infecté par cette suspension bactérienne à raison de 100 bactéries par cellule (multiplicité d'infection de 100).

Pour l'adhésion, la durée d'infection est de 30 minutes. Après ce temps d'incubation, le tapis cellulaire est lavé dans du tampon phosphate (PBS) pour retirer les bactéries n'ayant pas adhéré (Santiago *et al.*, 1999). Après une incubation de 10 minutes dans 0,5 ml de TritonX-100 (0,1% dans du PBS froid), le tapis cellulaire est disloqué et les cellules lysées. Le nombre de bactéries adhérentes est déterminé par étalement sur gélose ACA des dilutions décimales issues de la suspension des cellules lysées.

Pour l'invasion et la multiplication intracellulaire, le temps de contact avec les bactéries déposées est de 2 heures. Une fois lavé par du PBS, le tapis cellulaire est recouvert par du DMEM contenant de la gentamycine (concentration bactéricide de 100  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 1 heure 30. Cet antibiotique ne pénètre pas dans les cellules et tue uniquement les bactéries non internalisées. Pour déterminer le taux d'invasion, le tapis est dissocié comme ci dessus et les bactéries dénombrées correspondent aux bactéries internalisées (soit 3,5 heures après le début de l'infection). Pour estimer le taux de réplication intracellulaire, une incubation supplémentaire de 21,5 heures est nécessaire en présence de 5  $\mu\text{g/ml}$  de gentamycine avant de dénombrer les bactéries. Le taux de réplication intracellulaire correspond au rapport entre le nombre de bactéries internalisées et le nombre de bactéries dénombrées après 21,5 heures d'incubation (Van Langendonck *et al.*, 1998).

- Tests de dissémination intracellulaire selon une adaptation des protocoles décrits par le groupe de W. Goebel (Sokolovic *et al.*, 1996)

Les cellules sont repiquées en plaques de 6 puits et infectées une fois à confluence après 4 à 5 jours de culture. Douze heures avant l'infection, le milieu complet est remplacé par du milieu sans antibiotique si besoin.

Des dilutions décimales sont réalisées à partir d'une culture bactérienne d'une nuit préalablement centrifugée. Ces dilutions servent au dénombrement des bactéries par étalement

sur géloses ACA, et 100 µl de chacune des dilutions décimales  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  sont déposées par puits. Après un temps de contact de 2 heures à 37°C, le tapis cellulaire est lavé par du PBS et recouvert par 2 ml de DMEM complet contenant 10 µg/ml de gentamycine pendant 24 heures. La gentamycine a un double rôle pour ce test : elle permet de tuer toutes les bactéries non internalisées au cours des 2 heures de contact ainsi que les bactéries internalisées mais libérées dans le milieu extérieur lors d'une éventuelle lyse de cellules Caco-2. Ainsi aucune bactérie ne pourra recontaminer le tapis cellulaire au cours des 48 heures nécessaires à la formation de plaques de dissémination. La formation d'une plaque de dissémination correspond à une bactérie internalisée au cours des 2 heures d'infection qui s'y est multipliée et dont les bactéries résultantes ont infecté les cellules adjacentes sans passer par le milieu extérieur.

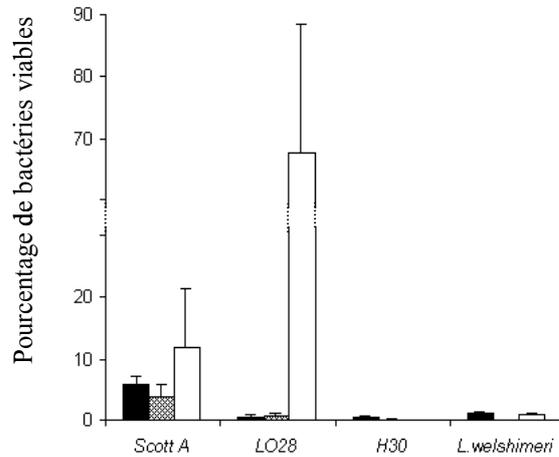
L'observation des plaques de dissémination se fait par l'ajout de 100 µl de bleu de trypan (0,4%) dans chaque puits. Le bleu de trypan colore les cellules mortes et colore donc les cellules dans lesquelles la bactérie internalisée s'est multipliée. Compte tenu de la propagation de la bactérie de cellule à cellule, des îlots de cellules mortes colorées par le bleu de trypan deviennent visibles à l'œil nu dans les 24 heures qui suivent l'ajout du bleu de trypan.

### 233. Validation du modèle

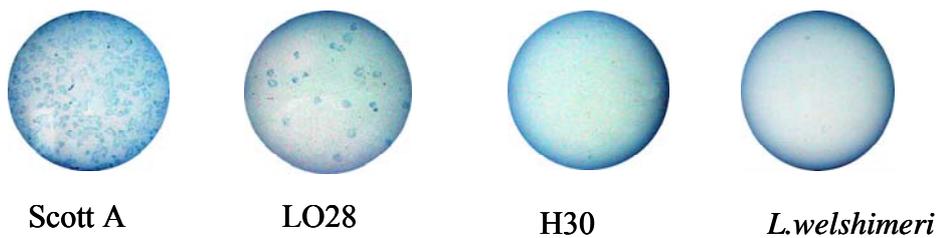
#### □ Tests d'adhérence, d'invasion et de multiplication intracellulaire

Des tests préliminaires d'adhésion, d'invasion et de multiplication intracellulaire ont été réalisés avec des espèces pathogènes et non pathogènes pour attester de leur potentiel à infecter ces cellules (figure 24). Des répétitions ont permis de constater la reproductibilité des résultats obtenus. Quel que soit le type de test effectué, chaque essai est doublé (2 puits) et l'expérience réalisée 3 fois de manière indépendante.

Ainsi, parmi les souches de *L. monocytogenes* choisies, la souche Scott A constitue un témoin de souche invasive et les souches LO28 (reconnue pour avoir des capacités d'internalisation faible sur d'autres modèles cellulaires (Jonquieres *et al.*, 1998)) et H30 (une souche dont les activités hémolytiques et phospholipasiques ne sont pas détectables) devaient permettre d'étalonner les différences observables. Une souche de *L. welshimeri*, une espèce non invasive, constitue un témoin négatif.



**Figure 24 : Taux d'adhérence, d'invasion et multiplication intracellulaire de *Listeria* dans les cellules Caco-2.** Le nombre de cellules viables est déterminé par étalement sur gélose ACA après différent temps d'infection. Le pourcentage de cellules viables pour la détermination de la multiplication intracellulaire n'a pas été réalisé pour la souche H30. Les résultats correspondent aux pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de bactéries initialement déposées. Chacune des deux expérimentations réalisées de manière indépendante correspond à l'infection de deux puits. La barre verticale correspond à la déviation standard.



**Figure 25 : Effet cytopathogénique de *L.monocytogenes* sur les cellules Caco-2 confluentes.** La monocouche est infectée 2 heures, lavée puis recouverte par du milieu frais contenant de la gentamycine. L'antibiotique permet la dissémination de *L.monocytogenes* uniquement de cellule à cellule.  $1,4 \cdot 10^3$  bactéries sont déposées par puits. Les cellules mortes infectées sont colorées par le bleu de trypan. Un dépôt plus important de bactéries ( $10^8$ ) ne permet pas la formation de plaques pour H30 et *L. welshimeri*.

□ Tests de dissémination (figure 25)

*L. monocytogenes* forme des plaques de dissémination et leur nombre correspond au pourcentage d'invasion observé par le test d'invasion en plaque 24 puits. Les souches non pathogènes (*L. welshimeri*) ne forment pas de plaque quel que soit la multiplicité d'infection.

24. Infection de l'embryon de poulet de 14 jours

Des tests d'infection *in vivo* par l'utilisation du modèle de l'œuf embryonné de poulet permettent d'évaluer la capacité des souches à infecter les tissus de l'hôte.

241. Choix du modèle

L'infection engendrée par *L. monocytogenes* fut dans un premier temps observée via le test d'Anton, qui consistait à infecter la cornée de l'œil d'un lapin. Cependant cette technique apporte peu d'information sur la physiopathologie de l'infection. Les modèles animaux les plus couramment utilisés pour observer l'infection due au pouvoir pathogène de *L. monocytogenes* sont la souris, le rat et dans une moindre mesure depuis peu de temps le cobaye.

La souris et le rat constituent a priori de bons modèles pour l'étude de l'infection par voie intraveineuse mais ne constituent pas de bons modèles lorsqu'ils sont inoculés par voie orale, à savoir la voie principale d'infection chez l'homme. En effet, par voie orale, l'infection n'est pas reproductible. Par exemple, des modifications dans la séquence en acides aminés de l'un des récepteurs chez ces hôtes (la E-cadhérine) empêchent l'internalisation de la bactérie via l'Internaline dans l'épithélium intestinal. Le cobaye, par contre, possède une E-cadhérine proche de celle de l'homme avec une séquence en acides aminés qui permet l'interaction entre la E-cadhérine et l'Internaline. Cette interaction effective est le facteur qui, a priori, permet l'existence d'une relation dose-réponse avec ce modèle par voie orale.

Dernièrement, un modèle murin génétiquement modifié a été expérimenté (Lecuit *et al.*, 2001). Il synthétise localement une E-cadhérine humaine au niveau des entérocytes de l'épithélium intestinal et permet donc d'outrepasser les problèmes liés à l'inoculation de la souris par voie orale. Cependant, compte tenu du tropisme de *L. monocytogenes* pour le placenta et le cerveau chez l'homme, il serait aussi souhaitable de pouvoir disposer d'un modèle transgénique exprimant la E-cadhérine humaine à ces niveaux pour savoir si

l'Internaline joue un rôle dans le passage de ces deux barrières hématoencéphalique et hématoplacentaire.

Ces spécificités d'hôte montrent bien la limite des modèles animaux car même le cobaye ou la souris transgénique ne constituent pas forcément des modèles valables pour l'étude de la listériose humaine dans son intégralité. En effet, d'autres incompatibilités liées à des spécificités de ligands bactériens pour leurs récepteurs eucaryotes ne sont pas à exclure.

Des modèles moins courants ont été testés : l'œuf embryonné de poulet ou encore le poisson zèbre (Menudier *et al.*, 1996). Le modèle poisson ne semble pas être un modèle approprié. En effet, les espèces pathogènes comme les non pathogènes du genre *Listeria* sont virulentes chez ce poisson après injection par voie intrapéritonéale et les doses léthales 50% seraient élevées comparées à celles observées pour la souris. Enfin, les poissons appartiennent à un groupe zoologique très distant de celui des mammifères.

Par contre, les résultats obtenus avec le modèle de l'œuf embryonné seraient comparables à ceux obtenus avec des souris inoculées par voie intraveineuse (Terplan & Steinmeyer, 1989 ; Notermans *et al.*, 1991b). Compte tenu de la séquence en acides aminés de la E-cadhérine du poulet, les étapes nécessitant une interaction entre l'Internaline de *L. monocytogenes* et la E-cadhérine du poulet devraient être effectives. Bien que peu de cas de listérioses chez l'oiseaux soit décrit, la bactérie inoculée par voie orale aurait un tropisme proche de celui de l'homme, à savoir le foie, la rate et le cerveau du poussin (Basher *et al.*, 1984).

Parmi les voies d'inoculation possibles (voie intraveineuse, intravitelline ou amniotique), l'inoculation de la cavité chorioallantoïdienne semble la plus appropriée pour se rapprocher d'une infection initiée au niveau du tractus gastrointestinal (notamment pour des souches comme les souches cliniques d'origine alimentaire et les souches de portage fécal). En effet, cette cavité est à l'origine d'une excroissance du tube digestif initiée à la 60<sup>ème</sup> heure d'incubation de l'embryon. Cette vésicule qui ne cesse de croître en dehors du corps embryonnaire reste en contact avec l'intestin durant toute la durée d'incubation et assure des échanges respiratoires et le stockage des déchets du métabolisme. Compte tenu des nécroses observés sur la membrane chorioallantoïdienne après inoculation du pathogène, il est probable que même si la bactérie n'arrive pas à atteindre l'intestin via cette cavité, l'épithélium intestinal est probablement infecté par la propagation de l'infection au sein de la membrane chorioallantoïdienne.

L'œuf embryonné de poulet a déjà fait ses preuves chez *Listeria*, mais aussi chez d'autres pathogènes intracellulaires à l'origine de septicémies ou de méningites comme *Neisseria meningitidis* (Pine *et al.*, 1995), *Legionella pneumophila* (Krinos *et al.*, 1999). L'œuf embryonné a aussi été utilisé pour *Campylobacter jejuni*, un pathogène de l'intestin chez l'homme. En effet, la bactérie colonise la membrane chorioallantoïdienne, survit et prolifère dans l'embryon (Field *et al.*, 1986).

Le choix du modèle découle finalement d'un compromis entre le modèle le moins contestable parmi les modèles faciles d'accès. La souris transgénique étant un modèle trop récent et encore peu accessible, ce sont des questions pratiques liées à l'utilisation de l'œuf embryonné de poulet (gain de temps, de coûts et absence de contraintes liées au maintien d'une animalerie classique de type P2) qui ont principalement déterminées notre choix.

#### 242. Mode opératoire

Les œufs embryonnés de poulet proviennent des laboratoires Charles River (IFFA-CREDO, L'Arbresle, France). L'absence de 23 agents pathogènes est garantie (œufs SPF). Dès leur réception, les œufs embryonnés (Jour 0) sont désinfectés à l'alcool 70%, préadaptés à la température de la pièce puis incubés horizontalement à 37,5°C. Le pourcentage d'humidité de l'incubateur est maintenu à 60%, l'air y circule constamment et les œufs sont retournés automatiquement toutes les 6 heures. Le développement des embryons est suivi par mirage de l'œuf et les œufs non embryonnés (œufs clairs) sont retirés de l'incubateur (Jour 2).

Les œufs sont inoculés par *Listeria* au jour J14. A ce stade, tous les organes du futur poussin sont formés. L'annexe embryonnaire délimitée par la membrane chorioallantoïdienne occupe tout l'espace disponible sous la coquille.

Cinq œufs sont inoculés par une même souche et en parallèle 5 œufs sont inoculés par du tampon phosphate par voie allantoïdienne pour valider l'innocuité de l'acte d'inoculation. Un dénombrement est réalisé à partir des doses inoculées. La vitalité de l'embryon est suivie quotidiennement par mirage de l'œuf. L'absence totale de mouvement, la perte du réseau sanguin autour de l'allantoïde ainsi que la gélification des liquides sont des signes attestant de la mort de l'embryon. La durée moyenne de vie des 5 embryons ainsi que le pourcentage de mortalité sont calculés selon la méthode de Norrung & Andersen (2000).

243. Validation du modèle

La validation du modèle a été réalisée initialement par deux souches de *L. monocytogenes* de référence (Scott A et LO28), deux souches de portage (H1 et H2) et une espèce non pathogène du genre *Listeria* (*L. welshimeri*). Pour ces premières souches, 3 séries de 5 œufs embryonnés ont été inoculées avec une dose comprise entre 30 et 300 bactéries.

**Tableau 10** : Durée de vie moyenne et pourcentage de mortalité d'œufs embryonnés inoculés par des souches de *Listeria* à leur 14<sup>ème</sup> jour d'incubation.

<b>Souche</b>	<b>Durée moyenne de vie (en jours)</b>	<b>Pourcentage de mortalité (%)</b>
Scott A	2,9 (± 0,96)	100
LO28	3,5 (± 1,46)	80
H1	5,8 (± 0,44)	20
H2	2,1 (± 0,42)	100
<i>L. welshimeri</i>	6 (± 0)	0

Comme décrit par Norrung & Andersen, il faut au minimum 2 jours pour tuer l'embryon. Tous les œufs inoculés par *L. welshimeri* restent vivants et prêts à éclore au 20<sup>ème</sup> jour d'incubation.

Compte tenu des variations obtenues en fonction des souches, la relation entre la dose inoculée (5 doses différentes), la durée de vie et le pourcentage de mortalité a été évaluée. A cet effet, les doses létales 50 ou 100 ont été déterminées selon la méthode de Reed & Muench (1938) :

**Tableau 11** : Doses létales (DL) 50 et/ou 100 (en Log) de souches de *L. monocytogenes* inoculées au 14<sup>ème</sup> jour d'incubation des œufs embryonnés.

<b>Souches</b>	<b>DL50</b>	<b>DL100</b>
H2		≤ 1,3
Scott A		≤ 1,8
LO28	0,5	2,02
H1	3,5	

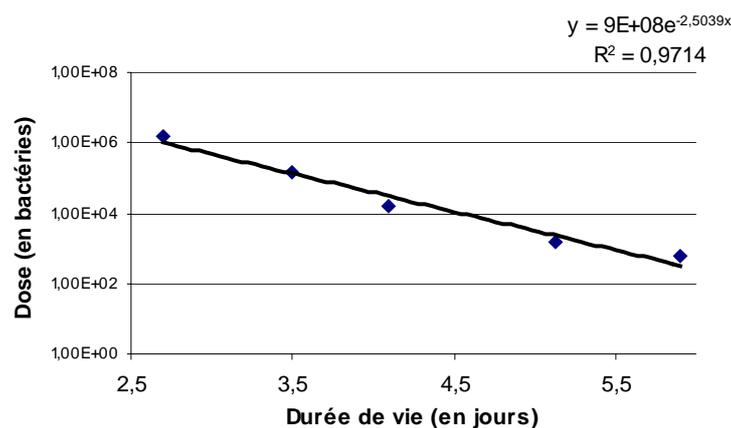
Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par Notermans *et al.* (1991b, 1998) pour d'autres souches de *L. monocytogenes*. Pour les souches les plus virulentes (H2), la dose nécessaire pour provoquer 50% de mort est trop faible pour obtenir une DL50. Les DL100 estimées des souches de ce niveau de virulence sont donc inférieures à 1,3. Pour des souches de type LO28, la dose inoculée est comprise entre la DL50 et la DL100, ce qui explique que les déviations standard soient assez élevées dans le tableau 10.

Pour les souches les moins virulentes comme H1, l'inoculation de fortes doses (jusqu'à  $1,5 \cdot 10^6$ ) entraîne une incapacité de l'éclosion due à une paralysie. La DL50 (correspondant à 3200 bactéries) est supérieure à la dose maximale choisie pour l'inoculation du reste du soucier (entre 30 et 300 bactéries).

En conséquence, une dose comprise entre 30 et 300 bactéries nous permet d'établir une classification discriminant clairement des souches virulentes dont la DL50 est inférieure à la dose administrée, des souches à virulence fortement atténuée (DL50 supérieure à la dose inoculée). Un troisième groupe comprend des souches faiblement atténuées pour lesquelles la dose inoculée est proche de la DL50.

En parallèle, il a été observé que la durée de vie de l'embryon était d'autant plus longue que la dose inoculée était faible (figure 26).

**Figure 26** : Effet de la dose inoculée (souche H1) sur la durée de vie de l'embryon.



# Résultats

## **1. Caractérisation du potentiel invasif des souches humaines de *Listeria monocytogenes***

### **ARTICLES 1 ET 2 :**

**“Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates”**

**“Expression of truncated Internalin A is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans”**

Les grands mécanismes permettant l'infection de l'hôte par *L. monocytogenes* sont maintenant bien établis (Vazquez-Boland *et al.*, 2001b). En effet, les nouvelles approches dérivant de la microbiologie cellulaire permettent d'établir les types de relations entretenues entre la bactérie et l'hôte, et plus particulièrement la manière dont *L. monocytogenes* exploite les fonctions cellulaires de l'hôte. Par comparaison, les données obtenues grâce au séquençage des génomes du pathogène *L. monocytogenes* et de son homologue non pathogène, *L. innocua*, permettent de cibler plus rapidement les spécificités du pathogène et de mettre en évidence de nouvelles pistes, qui déjà donnent un nouvel essor à l'étude de la virulence de *L. monocytogenes* (Buchrieser *et al.*, 2003).

Alors que la souche EGD-e compte parmi les pathogènes intracellulaires les mieux connus, il apparaît cependant évident aujourd'hui qu'il existe au sein de l'espèce *L. monocytogenes* une hétérogénéité dans l'expression du pouvoir pathogène (Chakraborty *et al.*, 1994 ; Wiedmann *et al.*, 1997 ; Van Langendonck *et al.*, 1998 ; Norrung & Andersen, 2000). En vue de pouvoir prédire le risque potentiel associé à une souche détectée dans un aliment, il semble donc important de connaître le potentiel invasif d'un ensemble de souches. Cependant, cette étude requiert un choix préalable judicieux des souches à étudier.

Compte tenu que la majorité des cas de listériose est due à des souches de sérotype 4b et que les isollements effectués dans l'environnement sont de sérotype 1/2, beaucoup d'études se sont focalisées sur la comparaison des souches environnementales et des souches cliniques (Del Corral *et al.*, 1990 ; Tabouret *et al.*, 1992 ; Brosch *et al.*, 1993 ; Tabouret *et al.*, 1992). Quelle que soit l'approche (tests de virulence *in vivo*, *in vitro*, approches moléculaires), aucune corrélation claire n'a pu encore être mise en évidence entre l'origine de la souche et son potentiel invasif.

L'étude du pouvoir pathogène des souches de *L. monocytogenes* isolées à l'état de portage chez des personnes en bonne santé est une approche particulière et originale. Les données actuellement disponibles sur le portage sont uniquement des données épidémiologiques destinées à évaluer leur incidence. Ainsi, l'objectif poursuivi fut dans un premier temps de caractériser le potentiel invasif de 14 souches de portage. De manière à comparer les résultats obtenus, 20 souches cliniques (3 souches épidémiques et 17 souches sporadiques) ont été ajoutées.

Les résultats obtenus sont présentés au sein de deux articles. Le premier article nous a permis de mettre à l'épreuve les techniques mises au point avec l'étude de 2 souches de portage, H1 et H2 (LO28 servant de référence). Suite à cette première étude, le potentiel invasif des 11 souches de portage supplémentaires est présenté dans le deuxième article.

Alors que le modèle de l'œuf embryonné de poulet nous a permis de constater la variabilité de pouvoir invasif des souches testées, ce sont surtout les tests d'invasion réalisés sur les cellules Caco-2 qui nous ont permis de cibler l'étape responsable de l'absence de pouvoir invasif sur le modèle animal pour 5 des 15 souches testées (LO28, H1, H17, H32, H34). Pour ces souches, de la même manière que pour la souche LO28, la production de InlA, de masse moléculaire inférieure à celle décrite comme fonctionnelle (80kDa), induit une diminution de l'efficacité de l'internalisation de la bactérie dans la couche cellulaire. Ainsi, l'analyse par Western blot de la production de InlA montre que toutes les souches qui produisent une Internaline A de 80 kDa ont des pourcentages d'adhésion aux Caco-2 voisins de 5% et des pourcentages d'entrée situés entre 10 et 20%. A l'inverse, les souches LO28, H1, H17, H32, H34 produisent des formes tronquées, de 63 kDa pour LO28 (Jonquieres *et al.*, 1998) et de 47 kDa pour H1, H17, H32 et H34, et les pourcentages d'adhésion sont inférieurs à 1% et les pourcentages d'entrée sont inférieurs à 1,75%. Par contre, une fois internalisées dans la cellule Caco-2, toutes les souches sont capables de se disséminer dans le tapis cellulaire (tableau 12).

Les séquences nucléotidiques situées aux abords de la mutation responsable de l'apparition de codons stop sont identiques pour les souches H1, H32 et H34. Une seule mutation supplémentaire est observée sur la séquence de H17. La comparaison des pourcentages d'identité entre ces souches, LO28, EGD-e et Scott A pour cette portion du gène *inlA* montrent que d'une part, la séquence de EGD-e est identique à celle de LO28, et que ensuite ces séquences pour les souches de portage sont plus proches de LO28 et EGD-e que de la séquence de Scott A.

Parmi les souches les moins virulentes, 2 souches, H6 et H11, sont capables de réaliser le cycle infectieux complet au niveau de la cellule Caco-2 avec autant d'efficacité que les souches virulentes sur l'embryon de poulet. Le pourcentage d'adhésion de H11 se révèle d'ailleurs être le plus élevé (9%). A l'inverse, le faible pourcentage d'adhésion de H6 peut laisser penser qu'un facteur d'adhésion pourrait ne pas être fonctionnel (2,8%). L'analyse par western blot nous a montré qu'il ne s'agissait pas d'un dysfonctionnement de InlB. Des tests complémentaires sur diverses lignées cellulaires nous auraient peut-être permis de constater des comportements variables nous mettant sur la piste des interactions régissant l'adhésion de ces souches.

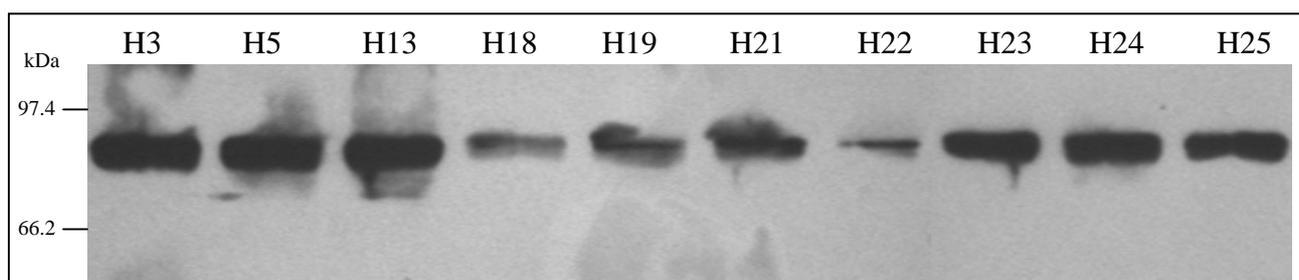
Les facteurs responsables d'une diminution modérée (groupe B) de la virulence sur le modèle de l'œuf embryonné de poulet n'ont pas été identifiés.

Les données apportées par cette étude révèlent un pourcentage relativement important de souches à virulence atténuée sur le modèle de l'œuf embryonné. Ces souches sont uniquement des souches de portage fécal. Compte tenu notamment de l'importance du tropisme d'hôte, il faut cependant rester prudent quant à prétendre que ces souches n'auraient pas pu infecter la personne qui les a hébergées. A l'inverse, le portage asymptomatique de souches de *L. monocytogenes* n'est a priori pas réservé à des souches non virulentes mais par contre la production de InlA de masse moléculaire inférieure à 80kDa leur est réservée. En effet, la recherche de InlA chez 10 souches responsables de listériose (autres que Scott A ou EGD-e) a montré qu'elles produisaient toutes une protéine de 80kDa (figure 27).

**Tableau 12** : Formation de plaques de dissémination de *Listeria monocytogenes* au sein de la monocouche de cellules Caco-2. Les groupes de souches A, B et C représentent les niveaux de virulence observés sur l'œuf embryonné de poulet.

Souches	Nombre de plaques de dissémination pour 10 <sup>4</sup> bactéries déposées
<b>Groupe A</b>	
H2	952
H38	1600
H12	1446
H27	1090
Scott A	1190
<b>Groupe B</b>	
H28	1030
H31	700
H35	827
LO28 *	68
<b>Groupe C</b>	
H6	600
H32 *	21
H11	1615
H17 *	2,7
H34 *	44
H1 *	50

\* Souches produisant une internaline tronquée



**Figure 27** : Analyse de la production de l'Internaline par Western blot pour 10 souches de *L. monocytogenes* responsables de listérioses sporadiques. Les protéines ont été extraites à partir de 25 mL de culture (MCDB) en phase stationnaire. L'Internaline a été détectée à partir des anticorps monoclonaux L7.7.

# Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates

Maiwenn Olier,<sup>1</sup> Fabrice Pierre,<sup>1†</sup> Jean-Paul Lemaître,<sup>1,2</sup> Charles Divies,<sup>1</sup> André Rousset<sup>1,2</sup> and Jean Guzzo<sup>1</sup>

Author for correspondence: Jean-Paul Lemaître. Tel: +33 3 80 39 66 79. Fax: +33 3 80 39 66 40.  
e-mail: jplemait@u-bourgogne.fr

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie, ENSBANA, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon Cedex, France

**Two human faeces carriage isolates of *Listeria monocytogenes* (H1 and H2) were compared to reference strains (ScottA and LO28) with regard to their lethality in 14-day-old chick embryos, their haemolytic and phospholipase (phosphatidylcholine-phospholipase C and phosphatidylinositol-phospholipase C) activities and their invasiveness towards Caco-2 cells. Experimental infection of chick embryos allowed discrimination of the strains into those exhibiting high virulence (ScottA and H2), those exhibiting slightly attenuated virulence (LO28) and those exhibiting low virulence (H1). A similar percentage mortality and time to death for embryos was observed when they were infected with H2 as was seen with infection by the reference strain ScottA. Therefore, human carriage strain H2 was considered potentially pathogenic. In contrast to H2 and ScottA, H1 exhibited low virulence. Using the tissue-culture cell-line model, it was found that carriage strain H1 was unable to enter Caco-2 cells efficiently, even though it was similar to the virulent strains in terms of the enzymic activities involved in pathogenicity. Detection of the internalins InIA and InIB, involved in the internalization of *L. monocytogenes* in the host cells, by immunoblot indicated that a truncated form of InIA was produced by H1. Taken together, these data provide a starting point for the study of the behaviour of two types of human faeces carriage strains and their characterization.**

Keywords: virulence, internalin, chick-embryo assay, Caco-2 cell-culture assay

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a ubiquitous Gram-positive rod that causes serious infections in humans and animals. The most common route of infection by *L. monocytogenes* is via the gastrointestinal tract (Schlech, 1984), as evidenced by several outbreaks of listeriosis caused by the ingestion of contaminated food materials (Schlech *et al.*, 1983). Numerous reports have been published dealing with the prevalence of *L. monocytogenes* in food products (Ryser & Marth, 1999). Despite

frequent exposure of the population to this bacterium (Notermans *et al.*, 1998), the probability of contracting listeriosis is low, since the incidence of the disease ranges from 1·6 to 6 cases per million population (Rocourt *et al.*, 2000).

One explanation for the relatively low incidence of the disease may be the limitation of listeriosis cases to high-risk groups, which include pregnant women, neonates and immunocompromised adults. However, a few cases of listeriosis have been identified in immunocompetent patients (Schlech *et al.*, 1983; Goulet *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1999), indicating that (i) *L. monocytogenes* has the potential to infect immunocompetent individuals, and (ii) the immunocompetent status of an individual alone can not explain the low risk of infection.

Differences in the human-pathogenic potentials of *L. monocytogenes* isolates may also be involved in their ability to infect individuals. Most of our knowledge

.....  
† Present address: Equipe Aliment et Cancer UMR INRA-ENVT 1089, Toulouse, France.

**Abbreviations:** ACA, acriflavine-ceftazidime agar; Pc-PLC, phosphatidylcholine-specific phospholipase C; Pi-PLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C.

The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF468816.

about the pathogenicity of *L. monocytogenes* comes from the many studies that have been carried out using mouse models. The molecular and cellular mechanisms involved in the intracellular life of *L. monocytogenes* have been identified using complementary *in vitro* tests such as tissue-culture assays (Gaillard *et al.*, 1987) and mutagenesis strategies. Virulence of *L. monocytogenes* is due to the expression of several genes (Braun & Cossart, 2000) responsible for the ability of the pathogen to penetrate cells, to proliferate in them and to spread in them. The entry process involves the expression of two proteins, InlA (internalin) and InlB, encoded by two genes, *inlA* and *inlB*, respectively, which are organized as an operon. These surface proteins are both necessary and sufficient for entry of the bacterium into various culture cell lines (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1995). A second genetic locus is involved in the functions essential for intracellular survival of the bacterium. This locus encodes listeriolysin O, phospholipases [phosphatidylinositol-specific phospholipase C (Pi-PLC) and phosphatidylcholine-specific phospholipase C (Pc-PLC)] and ActA. All of these cell-surface and secreted proteins are co-ordinately regulated by the pleiotropic transcriptional activator PrfA.

Several studies have shown heterogeneity within the virulence of *L. monocytogenes* isolates (Del Corral *et al.*, 1990; Brosch *et al.*, 1993; Wiedmann *et al.*, 1997; Van Langendonck *et al.*, 1998; Norrung & Andersen, 2000; Barbour *et al.*, 2001), without any systematic correlation between the level of virulence and the type characteristics (i.e. serovars, phagovars, ribovars and DNA macrorestriction patterns) or the origin (i.e. human, animal, category of food or environment) of the strains. These studies dealt generally with the comparison of strains isolated from clinical and food environments. However, little attention has been paid to the potential virulence of human carriage strains of *L. monocytogenes*.

The detection of *L. monocytogenes* carriage strains has been demonstrated, particularly in human faeces. The majority of epidemiological investigations have focused only on the rate of faecal carriage of *L. monocytogenes* strains, and it has been estimated that between 1 and 6% of the general population carry this bacterium (Durst & Zimanyi, 1976; Kampelmacher & van Noorle Jansen, 1972; Schuchat *et al.*, 1993). To better understand their occurrence, the characterization of human faecal carriage strains of *L. monocytogenes* is needed. The well-characterized LO28 strain was recovered from the faeces of healthy pregnant women. Analysis of this strain has shown that a mutation in *inlA* results in a truncated protein being released into the culture medium (Jonquères *et al.*, 1998). Surprisingly, this human carriage strain has shown a high level of virulence in the mouse model.

In this work, the virulence of two human faecal carriage strains of *L. monocytogenes*, H1 and H2, was compared to that of the well-known reference strains ScottA and LO28, to try to explain the lack of listeriosis symptoms in immunocompetent individuals.

Three different approaches were considered to try to explain the differences observed in the degrees of virulence between the human faecal carriage strains and the reference strains. First, the pathogenicity of the strains was characterized by inoculating 14-day-old chick embryos via the chorioallantoic route, as this test appears to be a reliable alternative to the mouse bioassay for the assessment of the pathogenicity of *Listeria* spp. (Terplan & Steinmayer, 1989; Notermans *et al.*, 1998). Second, the virulence-associated determinants, including haemolytic and phospholipase (Pc-PLC and Pi-PLC) activities, were analysed and compared among the isolates. Third, the efficiency of the isolates for adhesion to, invasion of, and growth within human Caco-2 intestinal cells was investigated and evaluated. At the same time, we analysed the production of InlA and InlB proteins, to further characterize the internalization process of these human faecal carriage strains.

## METHODS

**Listerial strains.** All *L. monocytogenes* strains, except ScottA, were isolated from human faeces. *L. monocytogenes* strains Scott A (CIP 103575, serotype 4b), a strain isolated from a human outbreak in an epidemic in Massachusetts (USA) in 1983, and LO28 (serotype 1/2c), a carriage strain recovered from the faeces of a healthy pregnant woman, were chosen as reference strains. In our laboratory, two faecal carriage *L. monocytogenes* strains, H1 (serogroup 1) and H2 (serogroup 4), were originally isolated from two human patients without listeriosis. H1 was isolated from a healthy pregnant carrier, whose twins were born healthy; H2 was isolated from a three-year-old infant carrier (Rousset *et al.*, 1994).

A strain of *Listeria welshimeri* was used as a negative control in the virulence assays – it was also isolated in our laboratory from the faeces of a healthy human (Rousset *et al.*, 1994).

**Culture medium and growth conditions.** Overnight static cultures of *Listeria* cells grown at 37 °C in brain heart infusion (BHI) broth (Biomérieux) were used for the chicken-embryo bioassays and cell-culture assays. For Western-blot analysis, protein samples were derived from cultures grown to stationary phase at 37 °C in MCDB 202 (Cryo Bio Systems) supplemented with 50 mg glucose l<sup>-1</sup>, 10% yeast nitrogen base without amino acids (YNB; Difco) and 1% trace elements (Cryo Bio Systems).

Viable counts were performed on acriflavine-ceftazidime agar (ACA; 10 mg acriflavine l<sup>-1</sup>, Sigma; 50 mg ceftazidime l<sup>-1</sup>, Glaxo Wellcome) plates incubated for 48 h at 37 °C.

### Chicken embryo methodology

**Chicken embryos.** Fertile eggs were purchased from IFFA-CREDO. Eggs were incubated for 14 days, as described by Buncic & Avery (1996), at 37.5 °C in a rotary egg incubator (Grumbach S84 model).

**Chorioallantoic inoculation of embryos.** This procedure was carried out using the technique of Buncic & Avery (1996). Strains of *L. monocytogenes* were grown in BHI at 37 °C to an OD<sub>560</sub> of 1.0 and were harvested by centrifugation at 6000 g for 10 min at room temperature. The cell pellets were gently suspended in PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline with 1 mg glucose ml<sup>-1</sup> and 36 mg sodium pyruvate l<sup>-1</sup>; Life Technologies) at pH 7.2, to obtain an initial cell density of 3 × 10<sup>7</sup> to 3 × 10<sup>8</sup> c.f.u. ml<sup>-1</sup>. Serial dilutions of the cell suspensions were prepared in PBS, and embryos were inocu-

lated with 0.1 ml of a  $10^{-5}$  dilution via the chorioallantoic membrane, after boring an artificial hole through the shell. The inoculum dose was confirmed by enumeration of the viable count on ACA plates. At least five embryos were used per strain tested. For each strain tested, controls were performed in which eggs were inoculated with sterile PBS. This was to test the viability of the chick embryos.

Inoculated eggs were incubated in a horizontal position at 37.5 °C, and the vitality of the embryos was monitored daily for 6 days by using transillumination (CL TH model); death was recognized by a loss of all visible blood vessel structure, a gelling of the suspending liquids and an absence of any reflexive movement of the embryo. The calculation of the mean time to death was made on the basis of the mean date of death of the five eggs (Norrung & Andersen, 2000). Calculation of the mortality rate completed the appreciation of the level of virulence for each strain tested.

**Strain characterization.** The test strains of *L. monocytogenes* were spot-inoculated ( $10^9$  bacteria spot<sup>-1</sup>) onto appropriate agar plates for the observation of three distinct enzymic activities.

Haemolytic activity was tested on Bacto Colombia blood agar base EH medium (mBAP; Difco) supplemented with 5% (v/v) saline-washed horse red blood cells. Plates were incubated for 48 h at 37 °C after inoculation and were observed for the development of zones of haemolysis around the colonies (Fujisawa & Mori, 1994).

Pc-PLC activity was tested by inoculating bacteria onto BHI agar supplemented with 5% (v/v) fresh egg yolk (Coffey *et al.*, 1996). Plates were incubated for 48 h at 37 °C and were observed for the development of zones of opacity, due to degraded egg-yolk lecithin, around the colonies.

Pi-PLC activity was determined as described by Notermans *et al.* (1991). After growth at 37 °C on TY agar (1% tryptone; 0.5% yeast extract; 1% NaCl; 1% agar), plates were covered with the substrate 1% L- $\alpha$ -phosphatidylinositol (Sigma) in 0.7% agarose. Plates were re-incubated at 37 °C and were observed for 6 days for the development of turbid haloes (the insoluble diacylglycerol) around the colonies.

**Cells.** The human colon carcinoma cell-line Caco-2 (ECACC no. 86010202) was used between passages 36 and 42. The cells were routinely grown in 25 cm<sup>2</sup> plastic tissue-culture flasks (Greiner) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO<sub>2</sub> air. The culture medium used for growth of the cell line was Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) non-essential amino acids and antibiotics (100 U penicillin ml<sup>-1</sup>; 100 µg streptomycin ml<sup>-1</sup>). All reagents were purchased from Invitrogen (Life Technologies).

**Infection of Caco-2 cells.** Confluent cell monolayers were trypsinized and adjusted in 24-well tissue-culture plates (Greiner), to obtain almost semi-confluent monolayers of Caco-2 cells after 3 days of incubation at 37 °C ( $10^6$  cells well<sup>-1</sup>). Cells were incubated in medium without antibiotics for 12 h and were washed with fresh medium just before use. After overnight growth in BHI, the listerial cells were centrifuged (6000 g for 10 min at room temperature) and resuspended in DMEM before infection of the Caco-2 monolayers. The Caco-2 monolayers were infected with 300 µl of the bacterial suspension (m.o.i. of 100 bacteria cell<sup>-1</sup>), according to the method of Van Langendonck *et al.* (1998).

Adhesion of the *L. monocytogenes* cells to the Caco-2 cells was allowed to occur for 30 min at 37 °C (Santiago *et al.*,

1999). The cell monolayers were then washed five times to remove non-adherent bacteria. Adherent bacteria were harvested, after lysis of the cell monolayers with 0.5 ml Triton X-100 (0.1% in cold PBS) for 10 min. The c.f.u. values for viable bacteria were determined by plating suitable dilutions of the lysates onto ACA plates. The plates were subsequently incubated for 48 h at 37 °C.

For entry and intracellular growth assays, monolayers were infected with bacteria for 2 h at 37 °C. After incubation, non-adherent bacteria were removed from the monolayers by washing them three times with PBS. Cell monolayers were then covered with fresh DMEM containing gentamicin at a bactericidal concentration (100 µg ml<sup>-1</sup>), to kill extracellular adherent bacteria. After a contact time of 1.5 h at 37 °C, the rate of bacterial entry into the Caco-2 cells was determined by plate counts, following washing of the Caco-2 cells with 0.5 ml Triton X-100 (0.1% in cold PBS) to lyse the cells. It was considered that counts obtained 3.5 h after the onset of infection represented the number of bacteria that had been internalized. To determine the rate of intracellular growth, DMEM supplemented with 5 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> was used as the growth medium, and the incubation time was increased to 19.5 h (Van Langendonck *et al.*, 1998). The rate of replication was calculated as the ratio of the number of bacteria internalized after 21.5 h of infection (i.e. the intracellular growth rate) to the number of bacteria internalized after 3.5 h of infection (i.e. the rate of entry).

**Preparation of culture supernatants and extraction of bacterial surface proteins.** The technique of Kocks *et al.* (1992) was used for these procedures. Following the growth of cultures in MCDB 202 supplemented with 50 mg glucose l<sup>-1</sup>, 10% YNB and 1% trace elements, bacteria were removed by two centrifugations (each at 6000 g for 10 min at room temperature), to obtain the culture supernatant proteins. Supernatant proteins were precipitated overnight by the addition of 16% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) at 4 °C.

For SDS extracts, the cell pellets were washed in 10 mM Tris/HCl (pH 8), centrifuged and immediately resuspended in 1% (v/v) SDS in 10 mM Tris/HCl (pH 8). They were then incubated for 15 min with gentle shaking (1000 r.p.m.). The suspensions were then centrifuged, and the bacterial surface proteins in the supernatants were precipitated with 16% (v/v) TCA and allowed to stand at 4 °C overnight.

All precipitated protein fractions were washed twice in 90% acetone, suspended in Laemmli sample buffer (Laemmli, 1970) and heated at 95 °C for 7 min, prior to SDS-PAGE and Western-blotting analyses.

**SDS-PAGE and immunoblotting.** SDS-PAGE was done by the method of Laemmli (1970) with 12.5% polyacrylamide gels. Equal amounts (10 µg) of the samples were loaded into each lane of the gel. After electrophoresis (90 min at 20 mA), the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (PROTEAN; Schleicher and Schuell) using the semi-dry electroblotting method. The membrane was stained with 0.2% Ponceau red, to confirm the transfer efficiency. Membrane hybridizations were performed with diluted (1:1000) mouse mAbs directed against InlA (mAb L7.7) or InlB (mAb B4-6) (Braun *et al.*, 1997, 1999; Mengaud *et al.*, 1996a). For immunodetection of the hybridized proteins, bound primary antibodies were revealed with an anti-mouse-immunoglobulin-horseradish-peroxidase conjugate (diluted 1:1000; Sigma). Peroxidase activity was detected using the ECL kit (Amersham Pharmacia).

**DNA sequencing.** For *inlA* from *L. monocytogenes* strain H1, sequencing was performed on DNA fragments generated by

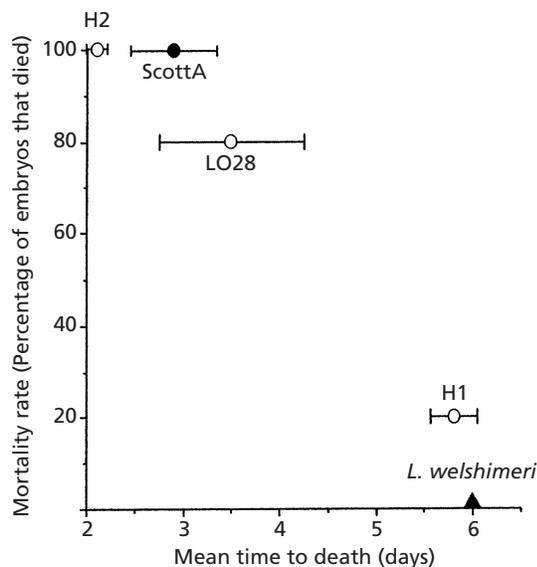
PCR. The primers used for PCR were seq01 (5'-AATCTAG-CACCACGTTTCGGG-3') and seq02 (5'-TGTGACCTTCTT-TTACGGGC-3'), and they generated a 733 bp gene fragment. The PCR product was sequenced in both orientations by Genome Express. The nucleotide sequence was deposited in the GenBank database and has been assigned accession number AF468816. This sequence was compared to the internalin (*inlA* and *inlB*) gene sequence of Gaillard *et al.* (1991) (accession no. M67471).

## RESULTS

### Virulence of *L. monocytogenes* strains towards chick embryos

The chick embryo model was chosen to study the virulence of *Listeria* strains from various origins. The inoculum dose, determined by plate count, ranged from 1.5 to 2.5 log<sub>10</sub> c.f.u. egg<sup>-1</sup>. Inoculation of 14-day-old chick embryos via the chorioallantoic fluids distinguished highly virulent strains (100% mortality rate with a mean time to death ranging from 2 to 3 days) from strains producing a lower mortality rate [higher mean time to death (>3.5 days)] (Fig. 1).

As expected, the epidemic strain ScottA was fully pathogenic in 14-day-old chick embryos (mortality 100%), whereas the asymptomatic carriage reference strain LO28 was less pathogenic (mortality 80%). *L. welshimeri*, a species avirulent in humans, was avirulent



**Fig. 1.** Mortality rate and mean time to death of chick embryos inoculated with the human *L. monocytogenes* reference epidemic strain ScottA (●), the *L. monocytogenes* carriage strains (○) and the *L. welshimeri* strain (control) (▲). For each strain, approximately 1.5–2.5 log<sub>10</sub> c.f.u. were inoculated into five 14-day-old chick embryos, for which the vitality was monitored daily for 6 days. Error bars depict standard deviations resulting from the mean time after which each of the five embryos died. The mortality rate was expressed as a percentage of the number of embryos that died, out of a total of five. Mean time to death was calculated for the five embryos.

in chick embryos (mortality 0%) and was used as a control strain.

When compared to the reference strains, H2, a carriage strain, was found to be highly virulent, showing the same level of virulence as ScottA. In contrast, the virulence of strain H1 was strongly attenuated, since four out of the five chick embryos inoculated with this strain were still alive after 6 days.

### Enzymic potential for virulence of carriage strains

Table 1 summarizes the characteristics of the five cultures studied, with respect to their serogroups, their haemolytic activities on horse-blood agar and their Pc-PLC and Pi-PLC activities.

As expected, *L. welshimeri* tested negative in the three enzymic assays, since this non-pathogenic *Listeria* species does not possess the genes necessary for these activities. All of the *L. monocytogenes* strains tested showed clear haemolysis on Colombia blood agar base supplemented with horse blood. Carriage strains H1 and H2 supported similar high levels of haemolytic activity, whereas ScottA demonstrated the lowest haemolytic activity.

In the same way, *L. monocytogenes* carriage strains H1 and H2 exhibited lecithin degradation (Pc-PLC activity) and were also positive for Pi-PLC activity. Surprisingly, ScottA gave the lowest activity for these two phospholipase activities, when compared to the other *L. monocytogenes* strains.

### Efficiency of human *L. monocytogenes* carriage strains in infecting Caco-2 cells

The ability of *L. monocytogenes* strains to adhere to, enter into and multiply in intestinal epithelial cells was evaluated using an *in vitro* model with human enterocyte-like Caco-2 cells. The results of kinetic studies for ScottA, LO28, H1, H2 and *L. welshimeri* are summarized in Fig. 2. Results are expressed as the percentage of listerial adhesion to Caco-2 cells, the percentage of listerial entry into Caco-2 cells or the percentage of intracellular growth of *Listeria* isolates within Caco-2 cells, to take into account the differences in the initial cell numbers between strains (between  $3 \times 10^6$  and  $5 \times 10^7$  bacteria well<sup>-1</sup>). The rate of replication was calculated from the percentages of entry and intracellular growth.

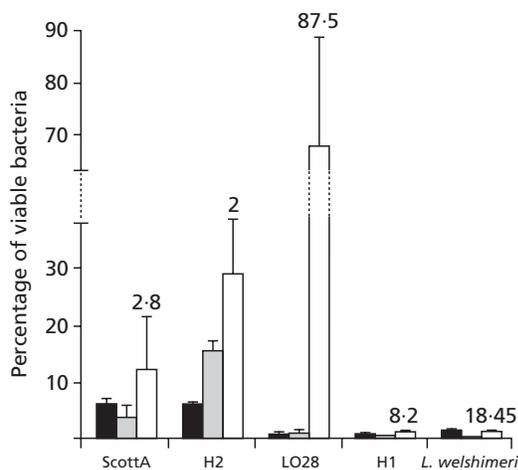
Under the test conditions, the kinetics of Caco-2 cell infection by ScottA and H2 (i.e. the most virulent strains) were similar. These two strains were the most efficient in entering Caco-2 cells, but had the lowest rate of replication. After 3.5 h of contact with Caco-2 cells, the rate of entry was 3.7 and 15.2% for ScottA and H2, respectively; 21.5 h post-infection, the rate of replication was 2.8 and 2.0 for ScottA and H2, respectively.

In contrast, *L. welshimeri* showed low adhesion values (1.3% of deposited bacteria) and extremely low entry values (0.06% of deposited bacteria), even though its

**Table 1.** Strains of *Listeria* used in this study, and their characteristics

Species/category of isolate	Serogroup	Activity		
		Haemolytic	Pc-PLC	Pi-PLC
<i>L. monocytogenes</i> reference epidemic strain				
ScottA	4b	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> carriage strains				
LO28	1/2c	+++	+++	+++
H1	1	+++	+++	+++
H2	4	+++	++	++
<i>L. welshimeri</i>				
	4	-	-	-

\* + + +, Strong activity; + +, moderate activity; +, weak activity; -, no activity.



**Fig. 2.** Listerial adhesion to, entry into and intracellular growth in Caco-2 cells, and rate of replication of listerial cells in Caco-2 cells. For adhesion (solid bars), entry (grey bars) and intracellular growth (open bars) rates, the number of viable bacteria was determined after different times of infection, by cell lysis and inoculation onto ACA plates using appropriate dilutions. Results are expressed as the mean percentage (of initial inoculum) of viable recovered bacteria per well from two experiments analysed in duplicate. Values above the intracellular growth columns (open bars) represent the rate of replication. The rate of replication was calculated by dividing the intracellular growth rate by the entry rate. Vertical bars depict SD.

intracellular growth ability inside the Caco-2 cells was higher than that of ScottA and H2 (rate of replication of 18.45, 21.5 h post-infection).

Among the carriage strains with attenuated virulence towards chick embryos, the weakly attenuated strain LO28 and the strongly attenuated strain H1 showed results that were closer to the behaviour of *L. welshimeri* than to the behaviour of *L. monocytogenes* ScottA. These strains were characterized by extremely low adhesion values (<1% of deposited bacteria) and, consequently, low entry levels, which were about 0.8% for LO28 and 0.11% for H1 3.5 h post-infection.

However, bacteria that reached the Caco-2 cytoplasm had a high rate of replication (87.5 for LO28 and 8.2 for H1 21.5 h post-infection). The relatively high intracellular replication levels observed for LO28, H1 and *L. welshimeri* within Caco-2 cells might be related to the relatively low entry level. However, cell infection performed with a higher m.o.i. showed that these strains exhibited the same intracellular rate of replication (data not shown). Therefore, the high rate of replication for LO28 in Caco-2 cells (rate of multiplication > 80) might be the reason why the mortality rate for chick embryos reached 80%, compared to 20% for H1, whose rate of replication was ten times lower than that of LO28.

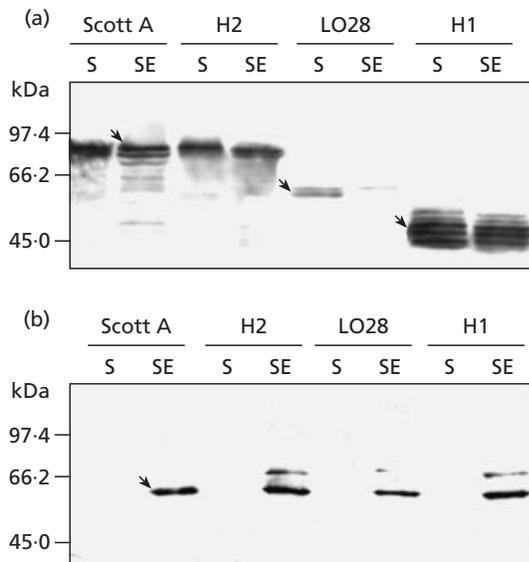
The lower levels of invasion and dissemination of strains LO28 and H1 compared to those of ScottA and H2 could be due, at least partly, to an impaired ability to adhere to Caco-2 cells. This led us to examine the synthesis of two surface proteins, InlA and InlB, in LO28 and H1, which have been implicated in adhesion mechanisms.

#### Analyses of *L. monocytogenes* human carriage strains surface proteins (internalin InlA and InlB) required for entry into epithelial cells

The presence of the surface proteins InlA and InlB in H1, H2, ScottA and LO28 was analysed in culture supernatants and SDS-extracts by using two distinct specific mAbs, L7.7 for the production of InlA (Mengaud *et al.*, 1996a) and B4-6 for the production of InlB (Braun *et al.*, 1997) (Fig. 3).

As expected, InlB was produced by the carriage strains H1 and H2 and the reference strains ScottA and LO28, and had an apparent estimated molecular mass of 60 kDa in the SDS-extract fractions.

In culture supernatants and SDS-extract fractions from H2 and ScottA, InlA was produced with a molecular mass of 80 kDa. In contrast, InlA from strains H1 and LO28 had an apparent molecular mass of approximately 47 and 60 kDa, respectively; these two proteins were therefore considered truncated. A higher amount of InlA was detected in the LO28 culture supernatant than in its SDS-extract fraction. Surprisingly, compared to the



**Fig. 3.** Western-blot analyses of supernatant proteins (S) and SDS-extract proteins (SE) from strains ScottA, H2, LO28 and H1. (a) Identification of the InlA polypeptide, analysed by immunoblotting with mAb L7.7 (Mengaud *et al.*, 1996a). (b) Identification of the InlB polypeptide, analysed by immunoblotting with mAb B4-6 (Braun *et al.*, 1997). Molecular mass standards are indicated on the left of each image.

amounts of InlA detected for the other strains, the amounts of InlA detected from LO28 were lower.

Therefore, the human carriage strain H2 seems to be potentially as pathogenic as the known pathogenic strain ScottA, producing InlA with a molecular mass of 80 kDa, whereas the other carriage strain, H1, produced a truncated form of InlA (molecular mass of approximately 47 kDa) and was less virulent. The truncated InlA of H1 (and also of LO28) could explain its reduced ability for adhesion to Caco-2 cells and, consequently, probably reduces its ability to be fully pathogenic towards chick embryos.

### DNA sequencing

DNA sequencing of *inlA* from strain H1 showed 12 silent mutations. One supplementary single point mutation was detected, consisting of the substitution of a cytosine for a thymidine at position 1414 (this position is based on the first translated codon). This point mutation created a nonsense codon (TAG) in the coding sequence, which could lead to the production of a protein with a theoretical molecular mass of 47 kDa.

### DISCUSSION

The present study focused on the characterization of the entry mechanisms of two *L. monocytogenes* human faeces carriage strains, to determine if their lack of virulence in humans could be linked to one or more components implicated in their internalization into host cells, the first step of infection.

First, we assessed the ability of the chick-embryo test to classify our isolates according to their level of virulence. Our results confirmed the occurrence of *L. monocytogenes* strains with attenuated virulence. To the best of our knowledge the present investigation demonstrated, for the first time, attenuated virulence of *L. monocytogenes* LO28. This highlights the importance of the choice of the *in vivo* model used for the study of pathogenicity. In fact, the chick-embryo assay could be a better model than the mouse or rat models, which are not considered appropriate for evaluating the virulence of *L. monocytogenes* strains such as LO28. Indeed, as noted by Lecuit *et al.* (1999), cells expressing mouse or rat E-cadherin (mEcad) do not allow InlA-dependent entry, whereas cells expressing human E-cadherin (hEcad), guinea pig or chicken E-cadherin (LCAM) are totally permissive to invasion by InlA-producing bacteria.

Furthermore, although H1 and H2 seem to be avirulent in humans, H2 was fully virulent in chick embryos, with its level of virulence similar to that of the epidemic strain ScottA. For H2, the differences in virulence against human cells and chick-embryo cells may be due to a low dose of ingested bacteria for the human and/or to the performance of the human immune system. In comparison, H1 seems to have a reduced capacity to invade both human and chick-embryo cells. This led us to examine more precisely the virulence-associated enzymic properties of the strains, to determine if the differences in pathogenicity between H1 and H2 could be correlated with differences in enzymic activities (i.e. haemolytic and phospholipases activities).

Our results demonstrate that, on the basis of three enzymic assays (for haemolytic, Pi-PLC and Pc-PLC activities), human carriage strains H1 and H2 have the enzymic potential necessary that contributes towards pathogenicity, since levels of the three enzymic activities observed for the two strains were higher than those of epidemic reference strain ScottA. These results suggested that either the production or the activity of virulence factors in the host is different from that observed *in vitro*, or that other putative virulence factors are responsible for the differences observed in the degrees of virulence produced by the different strains.

Consequently, we decided to use an *in vitro* approach to follow the steps of infection of host epithelial cells, to discover what impaired function could be responsible for the differences in pathogenicity observed between the strains. Strains virulent in the chick embryos, i.e. ScottA and H2, entered Caco-2 cells with great penetration efficiency, whereas strains with attenuated virulence towards the chick embryos, i.e. LO28 and H1, showed low entry levels.

On the one hand, our results demonstrated significant differences in the behaviour of the two carriage strains (H1 and H2) with regard to their kinetics within Caco-2 cells. On the other hand, when compared to *in vivo* tests, human enterocyte-like cell-line Caco-2 seems to be a reliable alternative model to the rat and mouse models,

allowing the elucidation of altered function(s) in the progress of bacteria through the host cell. Using the human model it was shown that H1 entered Caco-2 cells poorly, as did LO28, with levels of entry as low as those observed for *L. welshimeri*. The low level of entry of *L. monocytogenes* LO28 into mouse cells has been reported previously (Mengaud *et al.*, 1996b), and this low level of cell entry has already been attributed to a truncated form of InlA – and to the resulting soluble form of InlA (Jonquière *et al.*, 1998) – but this truncated protein did not affect the virulence of LO28 in the mouse model.

Western-blot analysis showed that H1 had a truncated InlA protein (as was the case for LO28), with an apparent molecular mass of 47 kDa, whereas the InlA protein of H2 was entire, with a molecular mass of 80 kDa. An mAb (B4-6) raised against InlB allowed us to confirm that there were no problems concerning the production of InlB from the locus *inlAB*.

It was found that a nonsense mutation was responsible for the truncated form of the H1 InlA. Taking into account that mAb L7.7 is specific for the N-terminal part of InlA, the absence of its C-terminal part, and consequently the absence of the C-terminal part of the inter-repeat region, could lead to impaired folding of the leucine-rich repeat (LRR) region. Both the inter-repeat region and the LRR region are necessary for internalin-mediated entry into host cells (Lecuit *et al.*, 1997). The two strains with apparently attenuated virulence towards chick embryos (H1 and LO28) produced truncated forms of InlA, which could be responsible for the low level of entry into Caco-2 cells. Therefore, our preliminary results support the hypothesis that InlA has a more critical role in clinical forms of listeriosis than previously thought.

Our finding of single point mutations within the InlA sequence clearly confirms the hypothesis of Chakraborty *et al.* (1994), who worked with environmental strains of *L. monocytogenes*. These authors showed that naturally occurring virulence-attenuated isolates were detected in hosts for only short periods of time, as a result of mutations occurring within virulence genes. They suggested that carriage strains, similar to strain H1 described in this study, could induce protection to subsequent infection by more pathogenic variants, such as H2. Manohar *et al.* (2001) reinforced this point of view by showing that gut colonization of mice with *actA*-negative mutants of *L. monocytogenes* could stimulate a humoral mucosal immune response. These findings could be a partial explanation for the widespread resistance to listeriosis seen in humans exposed to *L. monocytogenes*. Another reason for the absence of listeriosis in carrier H2 could be due either to the presence of additional physiological factors or to conditions that are required for the proliferation and implantation of *L. monocytogenes* in the mucosa of the human intestine, such as the presence of compounds that are not involved in its internalization or its growth within cells but which are still linked to its ability to colonize the host, or which affect its survival upon penetration of the intestinal mucosa (Barbour *et al.*,

2001; Cotter *et al.*, 2001). Moreover, the microbial interactions between *L. monocytogenes* and enteric commensal bacteria could explain the absence of listeriosis, as suggested by Zachar & Savage (1979) and Cebra (1999).

Finally, this study allowed us to characterize the two opposite behaviours of two human faecal carriage strains, H1 and H2. H1 has attenuated virulence towards chick embryos and can not be translocated through the intestinal wall. This phenotype could be due, in part, to a mutation in *inlA*. H2 should be considered potentially pathogenic with regard to its virulence in chick embryos, its abilities to express virulence-associated determinants and its invasion efficiency within Caco-2 cells. Indeed, this strain may have encountered particular circumstances within the host's intestinal tract that prevented the development of listeriosis. Whether the truncation of internalin within human carriage *L. monocytogenes* strains is a rare event remains to be investigated.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr P. Cossart (Institut Pasteur, Paris, France) for the kind gift of mouse mAbs directed against InlA (Mengaud *et al.*, 1996a) and InlB (Braun *et al.*, 1997). We also thank Professor Philippe Besnard (Physiologie de la Nutrition, ENSBANA, France) for the use of his cell-culture laboratory.

## REFERENCES

- Barbour, A. H., Rampling, A. & Hormaeche, C. E. (2001). Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun* **69**, 4657–4660.
- Braun, L. & Cossart, P. (2000). Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* **2**, 803–811.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G. & Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* **25**, 285–294.
- Braun, L., Nato, F., Payrastra, B., Mazie, J. C. & Cossart, P. (1999). The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol* **34**, 10–23.
- Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, E., Vindel, E. & Rocourt, J. (1993). Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J Food Protect* **56**, 296–301.
- Buncic, S. & Avery, S. M. (1996). Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37 °C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 °C. *Lett Appl Microbiol* **23**, 18–22.
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* **69**, 1046S–1051S.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Wehland, J., Dufrenne, J. & Notermans, S. (1994). Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **10**, 1–9.
- Coffey, A., Rombouts, F. M. & Abee, T. (1996). Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase

- C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1252–1256.
- Cotter, P. D., Gahan, C. G. M. & Hill, C. (2001).** A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluids. *Mol Microbiol* **40**, 465–475.
- Del Corral, F., Buchanan, R. L., Bencivengo, M. M. & Cooke, P. H. (1990).** Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *J Food Protect* **53**, 1003–1009.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. & Cossart, P. (1995).** Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**, 251–261.
- Durst, J. & Zimanyi, M. (1976).** *Listeria monocytogenes* – trägertum von an geburthilflichen arbeitlungen tätigen in epidemiefreien perioden. *Zentbl Bakteriol (Orig A)* **234**, 281–283.
- Fujisawa, T. & Mori, M. (1994).** Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **32**, 1127–1129.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P. (1987).** *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55**, 2822–2829.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991).** Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**, 1127–1141.
- Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, P., Dehaumont, P. & Veit, P. (1993).** Epidémie de listériose en France. Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull Epidémiol Hebdom* **4**, 13–14.
- Jonquières, R., Bierne, H., Mengaud, J. & Cossart, P. (1998).** The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect Immun* **66**, 3420–3422.
- Kampelmacher, E. H. & van Noorle Jansen, L. M. (1972).** Über die isolierung von *L. monocytogenes* bei klinisch gesunden personen. *Zentbl Bakteriol (Orig A)* **221**, 70–77.
- Kelly, J., Barnass, S., Sawicka, E. & Dean, A. (1999).** *Listeria meningitis* presenting in an immunocompetent adult patient. *Hosp Med* **60**, 140–141.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992).** *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**, 521–531.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of a structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. & Cossart, P. (1997).** Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* **65**, 5309–5319.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaikin, M., Gumbiner, B. & Cossart, P. (1999).** A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* **18**, 3956–3963.
- Manohar, M., Baumann, D. O., Bos, N. A. & Cebra, J. J. (2001).** Gut colonization of mice with *actA*-negative mutant of *Listeria monocytogenes* can stimulate a humoral mucosal immune response. *Infect Immun* **69**, 3542–3549.
- Mengaud, J., Lecuit, M., Lebrun, M., Nato, F., Mazie, J. C. & Cossart, P. (1996a).** Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun* **64**, 5430–5433.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. & Cossart, P. (1996b).** E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**, 923–932.
- Norrung, B. & Andersen, J. K. (2000).** Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 228–232.
- Notermans, S. H., 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.
- Notermans, S. H., Dufrenne, J., Teunis, P. & Chakraborty, T. (1998).** Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J Food Protein* **61**, 244–248.
- Rocourt, J., Jacquet, C. & Reilly, A. (2000).** Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int J Food Microbiol* **62**, 197–209.
- Rousset, A., Lemaître, J. P. & Delcourt, A. (1994).** Recherche de *Listeria monocytogenes* au niveau de différents sites (selles, sécrétions génitales et rhino-pharyngés). *Med Mal Infect*, 1174–1179.
- Ryser, E. T. S. & Marth, E. H. (1999).** *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd edn. New York, NY: Marcel Dekker.
- Santiago, N. I., Zipf, A. & Bhunia, A. K. (1999).** Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2765–2769.
- Schlech, W. F., III (1984).** New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. *Clin Invest Med* **7**, 321–324.
- Schlech, W. F., III, Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A. & 8 other authors (1983).** Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N Engl J Med* **308**, 203–206.
- Schuchat, A., Deaver, K., Hayes, P. S., Graves, L., Mascola, L. & Wenger, J. D. (1993).** Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *J Infect Dis* **167**, 1261–1262.
- Terplan, G. & Steinmeyer, S. (1989).** Investigations on the pathogenicity of *Listeria* spp. by experimental infection of the chick embryo. *Int J Food Microbiol* **8**, 277–280.
- Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P. & Velge, P. (1998).** Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J Appl Microbiol* **85**, 337–346.
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L. & Batt, C. A. (1997).** Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* **65**, 2707–2716.
- Zachar, Z. & Savage, D. C. (1979).** Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **23**, 168–174.

Received 16 November 2001; revised 18 December 2001; accepted 30 January 2002.

## Expression of Truncated Internalin A Is Involved in Impaired Internalization of Some *Listeria monocytogenes* Isolates Carried Asymptomatically by Humans

Maiwenn Olier,<sup>1</sup> Fabrice Pierre,<sup>1†</sup> Sandrine Rousseaux,<sup>1</sup> Jean-Paul Lemaître,<sup>1\*</sup>  
André Rousset,<sup>1,2</sup> Pascal Piveteau,<sup>1</sup> and Jean Guzzo<sup>1</sup>

Laboratoire de Microbiologie Equipe PG2MA, UMR INRA 1082, ENSBANA, 21000 Dijon,<sup>1</sup> and  
Service Biologie, Centre Hospitalier Général de Beaune, 21200 Beaune,<sup>2</sup> France

Received 29 July 2002/Returned for modification 24 September 2002/Accepted 8 November 2002

**Fourteen human carriage *Listeria monocytogenes* isolates were compared to sporadic and epidemic-associated human strains in order to ascertain the pathogenic behavior of these unrecognized asymptomatic strains. Experimental infection of 14-day-old chick embryos revealed that the majority of the carriage strains were attenuated for virulence. Of the 10 attenuated carriage strains, 5 were affected in their invasion capacities in vitro. Western blot analysis with antibody directed against InlA, the surface protein implicated in the internalization in host cells, allowed correlation between the ability of the carriage strains to enter Caco-2 cells and InlA expression. Indeed, these five carriage strains produced truncated forms of InlA. Four of the five truncated forms of InlA had an apparent molecular mass of 47 kDa. In order to assess the existence of a genetic lineage, partial sequences of *inlA* gene of these four strains were compared and revealed that they had a high degree of sequence conservation at the gene (99.86%) and amino acid (100%) levels. Comparison of their nucleotide sequences with that of the corresponding segment of *inlA* from EGD-e and Scott A strains, taken as epidemic references, showed more divergence. Taken together, these observations suggest the presence of specific traits that characterize *L. monocytogenes* strains isolated during asymptomatic carriage. Some of these traits could provide some explanations about the determinants that make them unable to cause systemic human infection.**

Infections of humans with the gram-positive facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* may cause severe diseases, such as sepsis or meningitis, mainly in newborn children, in the elderly, and in immunocompromised persons (54). It is one of the most well-studied bacterial pathogens. There is a fairly good understanding of the pathways followed by *Listeria* that lead to the infection of the different cell types. After the ingestion of contaminated food, *Listeria* disseminates from the intestinal lumen to the central nervous system and the fetoplacental unit. *L. monocytogenes* induces its own uptake even by normally nonphagocytic host cells, especially with the help of the cell surface proteins, internalin A (InlA) and InlB. InlA promotes the infection of human enterocyte-like cell lines through interaction with the human cellular receptor E-cadherin (hEcad) (36). The nature of the amino acid at position 16 of E-cadherin is crucial for the InlA–E-cadherin interaction and is species specific (30). For example, the chicken hEcad homolog but not the mouse E-cadherin (mEcad) is a receptor for InlA (31). InlB shows a much broader host cell spectrum and promotes invasion by activation of phosphatidylinositol 3-kinase (19). Two other proteins, gC1q-R/p32 and a Met receptor tyrosine kinase, have been identified as host cell receptors recognized by InlB (1, 50). After the uptake stage, other virulence factors, including the proteins listeriolysin O

and Pi-PLC (for phosphatidylinositol-specific phospholipase C), are necessary to escape from the phagocytic vacuole, and the proteins ActA and Pc-PLC (for phosphatidylcholine-specific phospholipase C), which are necessary for intracellular actin-based mobility and cell-to-cell spread (8).

Despite the fact that molecular and cellular biology studies defined a series of virulence factors involved in the bacterial pathogenesis, some aspects of the human listeriosis have not been elucidated. For example, *L. monocytogenes* is sometimes able to infect immunocompetent adults, and these listeriosis cases were reported particularly during epidemic outbreaks (16, 26, 48). Conversely, the pathogen can be carried in the intestine of between 1 and 6% of the general population, without declaration of any symptoms (17, 44). Heterogeneity in the virulence potential of the *L. monocytogenes* strains could explain these occurrences of epidemic or sporadic forms of listeriosis and the occurrence of both fecal and oral carriage states. Concerning the first cited example, some especially virulent strains, referred to as epidemic-associated strains, could be responsible for a high infection rate even in healthy persons. Herd and Kocks (18) considered the possibility of genetic loci encoding additional pathogenic traits into epidemic-associated strains in contrast to sporadic strains. In the same way, we hypothesize that the human carriage strains could be enclosed in a group with specific traits influencing, for example, the course or the outcome of an infection.

Most of our knowledge about the *L. monocytogenes* carriage strains comes from epidemiologic investigations and so concern human standards rather than bacterial features. These studies have focused only on the rate of healthy human or animal carriers. Factors such as sex (49) and categories of

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie Equipe PG2MA, UMR INRA 1082, ENSBANA, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. Phone: 33-3-80-39-66-79. Fax: 33-3-80-39-39-55. E-mail: jplemait@u-bourgogne.fr.

† Present address: Equipe Aliment et Cancer UMR INRA-ENVT 1089, Toulouse, France.

TABLE 1. Characteristics of *L. monocytogenes* strains used in this study

<i>L. monocytogenes</i> human isolate	Origin (city, country, yr)	Serogroup	Activity <sup>a</sup>		
			Hemolytic	Pi-PLC	Pc-PLC
<b>Fecal isolates</b>					
H1	Healthy pregnant carrier (Beaune, France, 1991)	1	+++	+++	+++
H2	Healthy 3-year-old child (Beaune, France, 1992)	4	+++	++	++
H6	Healthy 30-year-old woman (Beaune, France, 1991)		++	++	++
H11	Healthy 35-year-old man (Beaune, France, 1992)	1	+++	+++	+++
H17	Healthy 10-year-old child (Beaune, France, 1992)		+	PA	++
H27	Healthy 2-year-old child (Beaune, France, 1994)	4	+++	+++	++
H28	Healthy 7-year-old child (Beaune, France, 1994)	1	++	++	++
H31	Healthy 55-year-old man (Beaune, France, 1995)	1	++	+++	+++
H32	Healthy 19-year-old woman (Beaune, France, 1996)	1	++	++	+++
H34	Healthy 8-year-old child (Beaune, France, 1997)	1	+++	+	+++
H35	Healthy 11-year-old child (Beaune, France, 1997)	1	+	++	++
H38	Healthy carrier (Beaune, France, date not communicated)		+	++	++
LO28	Healthy pregnant carrier (Spain)	1/2c	+++	+++	+++
Oral isolate H12	Healthy 39-year-old man (Beaune, France, 1991)	4	+	++	++
<b>Sporadic patient isolates</b>					
H3	Blood culture (Chalon/Saône, France, 1991)	1	++	+++	++
H5	Cephalorachid liquids (Chalon/Saône, France, 1991)	1	+	+++	++
H7	Genital swab (Beaune, France, 1992)	1	++	+	+
H8	Blood culture (Chalon/Saône, France, 1992)	1	++	+++	+
H9	Blood culture (Dijon, France, 1992)	1	++	++	+
H10	Peripheral swab (Chalon/Saône, France, 1991)	4	++	+++	++
H13	Blood culture and cephalorachid liquids (Chalon/Saône, France, 1991)	4	++	+++	++
H14	Cephalorachid liquids (Rennes, France, 1992)	4	++	+	+
H15	Blood culture (Rennes, France, 1992)	1	+++	+++	+++
H16	Blood culture (Rennes, France, 1992)	1	+++	++	+++
H18	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	1/2b	++	+++	++
H19	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4b	+	PA	++
H21	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4	+	++	++
H22	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4b	++	++	+
H23	Liver (Strasbourg, France, 1992)	1	++	++	++
H24	Placenta (Strasbourg, France, 1992)	4b	+	PA	+
H25	Placenta (Strasbourg, France, 1992)	1/2a	+	+++	++
<b>Epidemic-associated strains</b>					
Scott A	Massachusetts milk outbreak (United States, 1983)	4b	+	+	++
EGD-e	Rabbit outbreak (England, 1924)	1/2a	+	++	++
H36	Epoisse cheese outbreak (Epoisses, France, 1999)	4b	++	++	++

<sup>a</sup> Symbols: +++, strong activity; ++, moderate activity; +, weak activity. PA, positive activity on ALOA agar plates.

people such as pregnant women (23, 33), patients with diarrhea (37), workers handling or not handling *L. monocytogenes* (12, 25, 43), or those who have contact with animals (24, 34) may have no impact on the rate of asymptomatic fecal carriage. However, some of these data are the subject of debate since, in contrast, in some environments (e.g., slaughterhouses and the surroundings of patients with listeriosis) more people are found to carry *L. monocytogenes* in their intestinal tracts (49). Periods in which *L. monocytogenes* is excreted in the feces appear to be rather short (24, 25, 45). Usually, excretion is not accompanied by gastrointestinal or other clinical symptoms (49).

Few studies have been focused on the characteristics of carriage strains, but recently, in a previous study, we reported the pathogenic behavior of two human fecal carriage strains, H1 and H2 (41). Strain H2 should be considered pathogenic with regard to its virulence in chick embryos and its invasion efficiency within Caco-2 cells. In contrast, strain H1 showed attenuated virulence toward chick embryos and could not be

translocated through the intestinal wall. This phenotype could be explained, in part, by a mutation in *inlA* of strain H1. A similar mutation was previously reported by Jonquieres et al. (22) for the human reference carriage strain LO28. We report here on the pathogenic behavior of 14 carriage *L. monocytogenes* strains, which were compared to the levels of virulence of 20 sporadic and epidemic-associated *L. monocytogenes* strains in order to determine a "carriage phenotype."

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth media.** *L. monocytogenes* strains used are listed in Table 1. Prior to initiation of the present study, a total of 2,500 oral, genital, or fecal samples from healthy patients free of signs or symptoms of listeriosis were collected between January 1991 and November 1997 in Philippe le Bon Hospital (Beaune, France). From these 2,500 samples, 14 asymptomatic carriage *L. monocytogenes* strains were recovered by conventional techniques (45). Among these carriage strains, the virulence potential of two of these carriage strains, isolates H1 and H2, was assessed (41). Among isolates collected from patients with listeriosis, all sporadic strains and H36 epidemic strain were provided by hospitals in Dijon, Beaune, Chalon/Saône, Strasbourg, and Rennes

(France). *L. monocytogenes* strain Scott A (obtained by the Institut Pasteur Collection, Paris, France), LO28 and EGD-e (kindly provided by P. Cossart, Institut Pasteur, Paris, France) were added as reference strains for comparative analysis.

Overnight static cultures of *Listeria* cells grown at 37°C in brain heart infusion (BHI) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were used for the chicken embryo bioassays and cell culture assays. For Western blot analysis, protein samples were derived from cultures grown at 37°C in MCDB 202 (Cryo Bio-Systems, l'Aigle, France) supplemented with glucose at 50 mg liter<sup>-1</sup>, 10% yeast nitrogen base without amino acids (YNB; Difco Laboratories, Detroit, Mich.), and 1% trace elements (Cryo Bio-Systems). Viable counts were performed on acriflavine (10 mg liter<sup>-1</sup>; Sigma)-ceftazidime (50 mg liter<sup>-1</sup>; Glaxo-Wellcome, Marly Le Roi, France) BHI agar (ACA) plates incubated 48 h at 37°C.

**Biochemical and physiological methods.** The test strains were spot inoculated (10<sup>9</sup> bacteria/spot) onto appropriate agar plates for the observation of three distinct enzymatic activities: the ability to induce zones of hemolysis around the colonies (hemolytic activity) was tested on Bacto Columbia blood agar base EH medium (mBAP; Difco Laboratories) supplemented with 5% (vol/vol) saline-washed horse red blood cells, as described elsewhere (14). Pc-PLC activity characterized by the development of zones of opacity due to degraded egg yolk lecithin around the colonies was evaluated by a standard procedure by inoculating bacteria onto BHI agar supplemented with 5% (vol/vol) fresh egg yolk (7). The test strains were examined for Pi-PLC activity as described by Notermans et al. (40): a turbid halo (the insoluble diacylglycerol) around the colonies was obtained after the colonies grown on TY agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% agar) at 37°C had been covered with 1% L- $\alpha$ -phosphatidylinositol substrate (Sigma) in 0.7% agarose. ALOA agar plates (AES Laboratoires) were used for the detection of Pi-PLC activity of strains that were negative on TY agar.

**Virulence in chick embryos.** Fertile hens eggs were purchased from IFFA-CREDO (l'Arbresles, France). Eggs were incubated for 14 days as described by Buncic and Avery (3) at 37.5°C in a rotary egg incubator (S84 model; Grumbach, Amboise, France). Strains of *L. monocytogenes* were grown in BHI at 37°C to an optical density at 560 nm of 1.0 and were harvested by centrifugation at 6,000  $\times$  g for 10 min at room temperature. The cell pellets were gently suspended in phosphate-buffered saline (PBS; Dulbecco phosphate-buffered saline with 1 mg of glucose ml<sup>-1</sup> and 36 mg of sodium pyruvate liter<sup>-1</sup>; Invitrogen, Life Technologies, Ltd., Paisley, Scotland) at pH 7.2 to obtain an initial cell density of 3  $\times$  10<sup>7</sup> to 3  $\times$  10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>. Serial dilutions of the cell suspensions were prepared in PBS, and embryos were inoculated with 0.1 ml of a 10<sup>-5</sup> dilution via the chorioallantoic membrane after an artificial hole was bored through the shell as described previously by Buncic et al. (4). The inoculum dose was confirmed by enumeration of the viable count on ACA plates. At least five embryos were used per strain tested. Negative controls consisting of eggs inoculated with sterile PBS were added in each experiment to verify the viability of the chick embryos.

Inoculated eggs were incubated at 37.5°C horizontally, and the vitality of the embryos was monitored daily for 6 days by using transillumination (CL TH model; Grumbach, Amboise, France); death was recognized by a loss of all visible blood vessel structure, a gelling of the suspending liquids, and an absence of any reflexive movement of the embryo. The calculation of the mean time to death (MTD) was made on the basis of the mean date of death of the five eggs (38). Calculation of the mortality rate completed the appreciation of the level of virulence for each strain tested.

**Culture cell line.** The human colon carcinoma cell line Caco-2 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC no. 86010202, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom). The Caco-2 cell monolayers were used between passages 40 and 50. The cells were routinely grown in 25-cm<sup>2</sup> plastic tissue culture flasks (Greiner) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% (vol/vol) CO<sub>2</sub> air. The culture medium used for growth of the cell line was Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1% (vol/vol) nonessential amino acids, and antibiotics (100 U of penicillin ml<sup>-1</sup> and 100  $\mu$ g of streptomycin ml<sup>-1</sup>). All reagents were purchased from Invitrogen (Life Technologies).

**Adhesion and invasion assays.** The ability of *L. monocytogenes* test strains to adhere to and invade Caco-2 cells was determined by a previously described procedure (47, 53). Semiconfluent cell monolayers were treated with trypsin and adjusted on 24-well tissue-culture plates (Greiner) to obtain almost early confluent monolayers after 3 days of incubation at 37°C (10<sup>6</sup> cells well<sup>-1</sup>). Cells were incubated in medium without antibiotics for 12 h and were washed with fresh medium just before use. After overnight growth in BHI, the listerial cells were centrifuged (6,000  $\times$  g for 10 min at room temperature) and resuspended in DMEM before infection of the Caco-2 monolayers. The Caco-2 monolayers were infected with 300  $\mu$ l of the bacterial suspension (multiplicity of infection of 10

bacteria cell<sup>-1</sup>). Adhesion of *L. monocytogenes* cells to Caco-2 cells was allowed to occur for 30 min at 37°C. The cell monolayers were then washed five times with PBS to remove nonadherent bacteria. Adherent bacteria were harvested after lysis of the cell monolayers with 0.5 ml of Triton X-100 (1% in cold PBS) for 10 min at 4°C. The CFU values for viable bacteria were determined by plating suitable dilutions of the lysates onto ACA plates. The plates were subsequently incubated for 48 h at 37°C. For invasion assay, monolayers were infected with bacteria for 2 h at 37°C. After incubation, nonadherent bacteria were removed from the monolayers by washing them three times with PBS. Cell monolayers were then covered with fresh DMEM containing gentamicin at a bactericidal concentration (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) to kill extracellular bacteria. After a 1.5-h contact time at 37°C, the rate of bacterial entry into the Caco-2 cells was determined by plate count, after washing of the Caco-2 cells with 0.5 ml of Triton X-100 (1% in cold PBS) to lyse the cells. It was considered that counts obtained 3.5 h after onset of infection represented the number of bacteria that had been internalized. Adhesion and invasion assays were done in duplicate in three independent experiments ( $n = 6$ ).

**Plaque forming in Caco-2 cells.** The plaque formation assay was performed as described by Sokolovic et al. (51) with the following modifications. The early confluent cell monolayers were prepared as outlined above in six-well tissue culture plates (Greiner). After overnight growth in BHI, the listerial cells were centrifuged (6,000  $\times$  g for 10 min at room temperature) and serially diluted in PBS. Caco-2 cells were infected with 0.1 ml of the 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, and 10<sup>-5</sup> dilutions, respectively, in three distinct wells. After a 2-h contact time at 37°C, nonadherent bacteria were removed from the monolayers by washing them three times with PBS and by overlaying them with 2 ml of DMEM containing 0.8% agarose, 20% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 10  $\mu$ g of gentamicin ml<sup>-1</sup>. After 24 h of incubation at 37°C, a second overlay containing 0.8% agarose in DMEM, 0.01% neutral red, and 15  $\mu$ g of gentamicin ml<sup>-1</sup> was added to each well, and plaque formation was observed 24 h later.

**SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot analysis.** Proteins from sodium dodecyl sulfate (SDS) extracts were prepared by using the technique of Kocks et al. (27). Bacterial cultures were harvested by centrifugation (6,000  $\times$  g, 10 min at room temperature). The cell pellets were washed in 10 mM Tris-HCl (pH 8), centrifuged, and immediately resuspended in 1% (vol/vol) SDS in 10 mM Tris-HCl (pH 8). They were then incubated for 15 min with gentle shaking (1,000 rotations min<sup>-1</sup>). The suspensions were then centrifuged, and the bacterial surface proteins in the supernatants were precipitated with 16% (vol/vol) trichloroacetic acid and allowed to stand at 4°C overnight.

All precipitated protein fractions were washed twice in 90% acetone, suspended in Laemmli sample buffer (28), and heated at 95°C for 7 min prior to SDS-PAGE and Western blot analysis. SDS-PAGE was done by the method of Laemmli with 12.5% polyacrylamide gels (28). After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose sheets (Protean; Schleicher & Schuell) by using the semidry electroblotting method. Membrane hybridizations were performed with diluted (1:1,000) mouse antibodies directed against InlA (L7.7) (35). For immunodetection of the hybridized proteins, bound primary antibodies were revealed with an anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugate (diluted at 1:1,000; Sigma). Peroxidase activity was detected by using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia).

**DNA sequencing.** For *inlA* from *L. monocytogenes* strains that produced truncated forms of InlA (LO28, H17, H32, and H34) and from reference strain Scott A, sequencing was performed on DNA fragments generated by PCR (positions 799 to 1531 of the 2,400 bp of *inlA*). The primers were seq01 (5'-AATCTAGC ACCACGTTCCGGG-3') and seq02 (5'-TGTGACCTTCTTTTACGGGC-3'), and they generated a 733-bp gene fragment. Genome Express sequenced the PCR products in both orientations. The nucleotide sequences were deposited in the GenBank database. Accession numbers for partial sequences for *inlA* gene for strains LO28, H17, H32, and H34 and Scott A are AY166686, AY126441, AY126442, AY126443, and AY166685, respectively. These sequences were compared to the corresponding segment of *inlA* from the strain H1 (AF468816 [41]) and EGD-e (LMO00433 [15]).

## RESULTS

### Virulence of *L. monocytogenes* strains toward chick embryos.

The chicken embryo model was chosen to study the virulence of *L. monocytogenes* strains isolated from epidemic or sporadic cases of listeriosis and from healthy patients free of signs or symptoms of listeriosis (carriage isolates) (Table 1). The inoculum dose, determined by plate count, ranged from 1.5 to 2.5

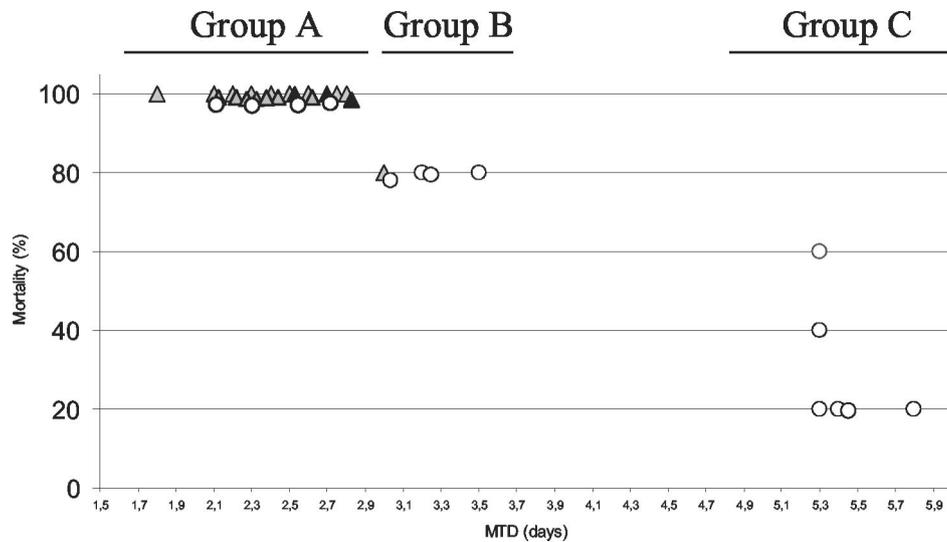


FIG. 1. Dot blot of mortality rate and MTD of chick embryos inoculated with 14 human asymptomatic carriage strains (○), 17 human sporadic strains (shaded triangle), and 3 epidemic-associated strains of *L. monocytogenes* (▲). For each strain, ca. 1.5 to 2.5 log<sub>10</sub> CFU were inoculated into five 14-day-old chick embryos, for which the mortality was monitored daily for 6 days. Groups A, B, and C represent the three levels of virulence obtained from the chick embryos assay.

log<sub>10</sub> CFU per egg. Inoculation of 14-day-old chick embryos via the chorioallantoic fluids distinguished highly virulent strains (group A), weakly attenuated virulent strains (group B) and strongly attenuated virulent strains (group C) (Fig. 1). Each strain was characterized by the percent mortality and the MTD.

The most virulent strains against chick embryos were characterized by a 100% mortality rate with an MTD of <3 days. This group, group A, included all three epidemic strains tested (EGD-e [100%, 2.5 days], H36 [100%, 2.7 days], and Scott A [100%, 2.8 days]) and most of the sporadic strains. Four human asymptomatic carriage strains (H2 [100%, 2.1 days], H38 [100%, 2.3 days], H12 [100%, 2.6 days], and H27 [100%, 2.7 days]) showing levels of virulence similar to those of the epidemic and sporadic strains in the 14-day-old chick embryos also belonged to group A.

Group B isolates induced death in 80% of the embryos by 3 days after inoculation. The sporadic strain H5 and four human asymptomatic carriage strains (H28 [80%, 3 days], H31 [80%, 3.2 days], H35 [80%, 3.2 days], and LO28 [80%, 3.5 days]) belong to this weakly attenuated virulent group.

The last group, group C, was characterized by mortality rates ranging from 20 to 60% with the highest MTD values (>5 days). On the 14 human asymptomatic carriage strains, 6 belong to this least-virulent group of *L. monocytogenes* strains (H6 [60%, 5.3 days], H32 [40%, 5.3 days], H11 [20%, 5.3 days], H17 [20%, 5.4 days], H34 [20%, 5.4 days], and H1 [20%, 5.8 days]). Considering the high occurrence of human asymptomatic carriage strains exhibiting low virulence for the chicken embryo, we studied the behavior of these carriage strains in *in vitro* assays in an attempt to clarify the reasons behind the lack of infection in chicken embryos and in humans.

**Enzymatic potential for virulence of asymptomatic carriage strains.** Virulence-associated enzymatic activities (hemolytic and phospholipase activities) (Table 1) demonstrated that all human carriage *L. monocytogenes* strains had activities similar

to those of sporadic or epidemic-associated strains. No Pi-PLC activity was detected for H17, H19, and H24 strains with TY agar. However, additional tests for these three human sporadic and carriage strains performed with ALOA agar plates allowed the detection of Pi-PLC activity. Then, on the basis of all of these levels of enzymatic activities, the human carriage strain had the potential to be as virulent than sporadic and epidemic-associated strains.

**Efficiency of human *L. monocytogenes* asymptomatic carriage strains in infecting Caco-2 cells.** The ability of *L. monocytogenes* carriage strains to adhere to and enter into intestinal epithelial cells was evaluated by using an *in vitro* model with human enterocyte-like Caco-2 cells. The results obtained for each strain are summarized in Fig. 2. The kinetics of Caco-2 cell infection by Scott A was added as a reference epidemic strain. To take into account the differences in the initial listerial cell numbers between strains, the results are expressed as percentages of listerial adhesion to Caco-2 cells and of listerial entry into Caco-2 cells.

The most-virulent strains for chick embryos (group A) were efficient in infecting Caco-2 cells and developed higher levels of adhesion and entry than the epidemic strain Scott A. The rates of adhesion for H2, H38, H12, and H27 ranged from 5.4 to 7.3%, and the rates of entry ranged from 15.3 to 20.4%. The rates of adhesion and entry were 5 and 11.3%, respectively, for Scott A.

In group B, the kinetics of H28, H31, and H35 were similar to those of group A strains, with efficient capacities of adhesion and entry. In contrast, strain LO28 showed low adhesion and entry values (1 and 0.75%, respectively, of deposited bacteria).

Among the carriage strains with strongly attenuated virulence toward chick embryos (group C) two strains, H6 and H11, showed results similar to those of group A strains, and the four other attenuated virulence strains (H32, H17, H34, and H1) showed results that were closer to the behavior of strain LO28 than to the behavior of *L. monocytogenes* Scott A.

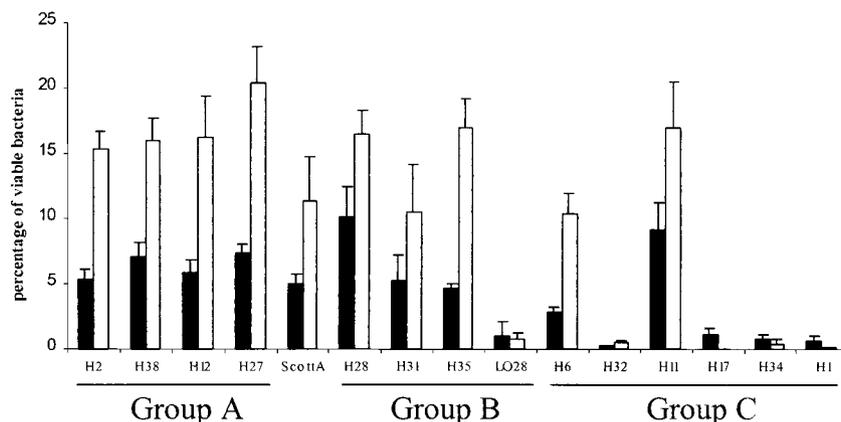


FIG. 2. Listerial adhesion to and entry into Caco-2 cells. For adhesion (■) and entry (□) rates, the number of viable bacteria was determined after 30 min and 3.5 h of infection, respectively, by cell lysis and inoculation onto ACA plates by using appropriate dilutions. Groups A, B, and C represent the three levels of virulence obtained from the chick embryos. The results are expressed as the mean percentage (of initial inoculum) of viable recovered bacteria per well from two experiments analyzed in duplicate. Vertical bars depict the standard deviation.

Furthermore, the plaque-forming assay allowed us to verify that there was no problem concerning the efficiency of the human carriage strains in the cell-to-cell spread process. Indeed, all *L. monocytogenes* tested were able to continue the infectious cycle and to form plaque of dissemination in the Caco-2 monolayers (data not shown).

We had previously observed that both LO28 and H1 were unable to enter Caco-2 efficiently and that they produced a truncated form of InlA (41), a surface protein that has been implicated in adhesion mechanisms. Considering that some other carriage strains seem to have similar behaviors toward chick embryos and Caco-2 cells, this led us to examine the synthesis of the surface protein InlA in the human asymptomatic carriage strains.

**Analyses of *L. monocytogenes* human asymptomatic carriage strains surface protein InlA required for entry into epithelial cells.** The presence of the surface protein InlA in the human asymptomatic carriage strains was analyzed in SDS extracts by using specific monoclonal antibodies L7.7 (35) (Fig. 3). In the same way, the results obtained for each strain are summarized in Fig. 3. Although InlA was produced with the expected molecular mass of 80 kDa in the strains that were efficient in entering Caco-2 cells, strains that showed low adhesion and entry values produced truncated forms of InlA with apparent

molecular masses of 63 kDa for LO28 and of 47 kDa for H17, H32, H34, and H1. Western blots performed with 10 randomly selected sporadic and epidemic virulent strains allowed us to verify that these virulent strains produced the functional 80-kDa protein InlA (data not shown).

**Comparative sequence analysis of *inlA* gene for the *L. monocytogenes* strains that produced truncated InlA.** Nucleotide sequence analysis of the partial sequence of *inlA* gene from strains LO28, H17, H32, H34, Scott A, and the previously published sequences for H1, EGD-e showed significant conservation (>95%) among these strains (Table 2).

First of all, the mutation detected for strain H1 in a previous study consisting in the substitution of a cytosine for a thymidine at position 1414 was also found for strains H17, H32, and H34. This point mutation created a nonsense codon in the coding sequence, resulting in the production of proteins with a theoretical molecular mass of 47 kDa. The *inlA* gene partial sequence was identical for strains H1, H32, and H34. One additional nucleotide difference was observed between strains H1, H32, H34, and strain H17, but it did not affect the amino acid sequence of the InlA protein. *inlA* partial sequence (positions 799 to 1531) was identical for strains EGD-e and LO28 but, according to the results of Jonquieres et al. (22), an additional deletion of an adenine at position 1637 led to the

**Human carriage *Listeria monocytogenes* strains**

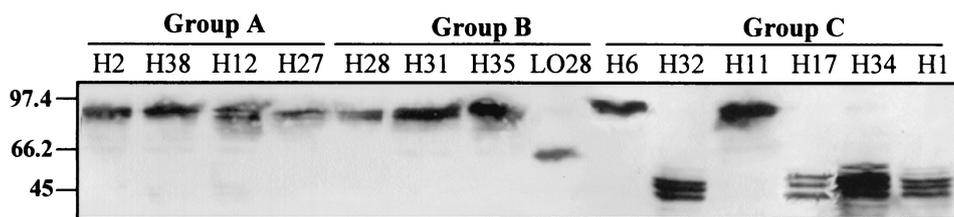


FIG. 3. Western blot analysis of Internalin in SDS-extract fraction of MCDB-grown cells from human carriage *L. monocytogenes* strains. Proteins were harvested at early stationary phase. Groups A, B, and C represent the three levels of virulence obtained from the chick embryos assay. Loadings correspond to 25 ml of initial bacterial culture. Internalin was detected with MAb L7.7 at a final dilution of 1/1,000. Molecular mass markers are indicated in kilodaltons to the left of the panel.

TABLE 2. Nucleotide sequence identities between partial sequences of *inlA* genes ( positions 799 to 1531 bp) and deduced theoretical molecular masses of InlA of *L. monocytogenes* strains H1, H17, H32, H34, and LO28 and the epidemic reference strains Scott A (serotype 4b) and EGD-e (serotype 1/2a)

Strain (serotype)	% Nucleotide sequence identity (no. of nucleotide differences) ( <i>n</i> = 733)			Theoretical molecular mass (kDa) of InlA <sup>a</sup>
	Scott A	EGD-e LO28	H1, H32, and H34	
Scott A (4b)				80
EGD-e (1/2a)	95.91 (30)	100.00		80
LO28	95.91 (30)	100.00		63 (1636 <sup>Δ</sup> 1637insA) <sup>b</sup>
H1, H32, and H34	97.27 (20)	98.23 (13)	100.00	47 (1414 C→T)
H17	97.14 (21)	98.09 (14)	99.86 (1)	47 (1414 C→T)

<sup>a</sup> The nucleotide change implicated in synthesis of a truncated form of InlA is given in parentheses. The position of the first translated codon is denoted as +1.

<sup>b</sup> Results are from the partial sequences of *inlA* from Jonquieres et al. (22).

creation of a nonsense codon for position 1729. This nonsense codon generated an open reading frame encoding the 63-kDa protein. The sequence of the *inlA* gene of *L. monocytogenes* strain Scott A indicated a greater divergence with identity percentages that were lower than those observed for the other strains. Most of the changes in nucleotides were silent mutations, but this polymorphism was sometimes responsible for changes in the deduced InlA amino-acid partial sequence. Finally, seven amino acids differed in the coding sequences obtained from the partial sequences of *inlA* of strains Scott A and EGD-e, three amino acids differed between those of Scott A and strains H1, H17, H32, and H34, and three amino acids differed between those of EGD-e and carriage strains unable to produce an InlA of 80 kDa.

## DISCUSSION

This study was designed to evaluate whether some of the *L. monocytogenes* strains isolated from healthy patients free of signs or symptoms of listeriosis could have an attenuated ability to infect the host cells. We tested this hypothesis by using the following approaches: (i) we compared the level of virulence of 14 human carriage strains, 17 sporadic strains, and 3 epidemic-associated strains; (ii) we evaluated, for the 14 human asymptomatic carriage strains, both the adhesion and entry abilities into Caco-2 cells; and (iii) we evaluated the production of the surface protein InlA that was found to mediate invasion of enterocytes and crossing of the intestinal barrier (32).

Considering the critical role of the polymorphism identified between species in the E-cadherin amino acid sequence for InlA-mediated entry (30), the choice of the *in vivo* model is important to reproduce some aspects of the human listeriosis. Whereas in the mouse and in the rat bacterial translocation across the intestinal barrier is low because their E-cadherin is not a receptor for InlA (32), previous reports from our laboratory and other investigators have demonstrated that the chicken embryo model appears to be a reliable alternative for the assessment of the pathogenicity of *Listeria* spp. (39, 41, 52). Inoculation of 14-day-old chick embryos via the chorioallantoic membrane was also used to evaluate the pathogenic potential of 14 human asymptomatic carriage strains in comparison to those of sporadic or epidemic-associated strains of *L. monocytogenes*.

Interestingly, most of the human asymptomatic carriage strains were attenuated for virulence toward the chicken em-

bryo. Indeed, 10 of the 14 human carriage strains belong to the less-virulent groups of strains (groups B and C). These findings suggest that, according to their virulent phenotype, this type of human carriage strain could constitute a particular population of *L. monocytogenes* strains with specific traits.

In order to characterize further these human asymptomatic carriage strains, we assessed their ability to infect human epithelial cells *in vitro* by using the Caco-2 cell line. As previously described for strains H1 and LO28 (22, 41), some of the strains that exhibited the lowest virulence for chicken embryo (H17, H32, and H34) seemed to have a reduced capacity to invade Caco-2 cells, and these same three strains with reduced capacity to invade Caco-2 cells produced a truncated form of InlA. For all of the strains tested, there was a good relationship between their invasiveness into Caco-2 cells and the production of truncated forms of the surface internalization protein InlA, suggesting that the production of a truncated form of InlA affects its functions *in vitro*. Whether or not the truncated form of InlA could be one of the factors that sentences some strains to the carriage state *in vivo* is a challenging issue.

Similar production of truncated forms of virulence factors has been already described in particular for ActA by Chakraborty et al. (5), Sokolovic et al. (51), and Jacquet et al. (20). By comparing the molecular mass of the proteins ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O between strains isolated from clinical human cases or food, Jacquet et al. (20) observed that attenuated or nonvirulent strains could be associated with truncated forms of ActA, which could be considered as a good marker of *L. monocytogenes* virulence in humans. Considering the critical role of InlA in crossing the intestinal barrier *in vivo* (32) and the inability of strains with strongly truncated forms of InlA to enter host cells, we could suggest in the same way that analysis of InlA could be useful to identify virulence attenuated *L. monocytogenes* strains.

The *inlA* genes in strains H1, H32, and H34 had identical nucleotide sequences, and strain H17 had one additional nucleotide change. Taking into account that these partial sequences showed between 13 and 22 nucleotide differences in comparison to that of the corresponding segment of *inlA* from EGD-e and Scott A strains, these results suggest that H1, H17, H32, and H34 could be descended from a common ancestor and may maintain their identities over the years (these strains were isolated independently between 1991 and 1997). Polymorphisms in virulent genes and in the deduced amino acid sequence have been already observed, notably by Jeffers et al.

(21) by using ribotyping and PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the genes *actA* and *hly*. These studies have shown that distinct clonal groups obtained from this typing appeared to differ in their pathogenic potential. Considering the differences observed in the deduced amino acid sequences of InlA between strains Scott A and EGD-e, it would be interesting to determine whether these changes are silent or influence the pathogenic process.

Carriage strains that produced the entire form of InlA but that belong to groups B and C (H6, H11, H28, H31, and H35) were able to enter and to disseminate within Caco-2 cells efficiently. Similarly, in comparison with the sporadic and epidemic *L. monocytogenes* strains, these carriage strains had the virulence-associated enzymatic activities (i.e., hemolytic and phospholipase activities) required for pathogenicity. Taken together, these results suggest that thus far such carriage strains should be considered potentially pathogenic until some other factor(s) involved in the reduction of virulence in other steps of listeriosis is discovered.

The strains isolated at the carriage status and belonging to the most-virulent group A, group A (i.e., H2, H38, H12, and H27), seem to be at least as virulent as the sporadic or epidemic strains for the chicken embryo. Moreover, our results confirmed the absence of correlation between epidemic prevalence and increased virulence as has been previously described with other animal models or cell culture tests (2, 11, 18, 29, 51). Indeed, no significant differences of level of virulence were observed between the sporadic and epidemic-associated strains.

The reason why no symptoms of human listeriosis were observed with these four human carriage strains is unclear. Considering the inoculation of *L. monocytogenes* via chorioallantoic fluids in the present study, we can propose that these carriage strains are better equipped to survive and multiply within the chorioallantoic fluids of the chicken embryo than within the gastrointestinal tract. Furthermore, the initial dose of ingested bacteria and factors that diminished the dose in the human tract could be implicated. Resistance of the carriage strains to several sources of stress (i.e., the low-pH environment of the stomach, the antimicrobial environment of the mucosal surfaces, and the presence of bile and enzymes in the gastric fluids) has to be evaluated since significantly different behaviors have been already described for strains of clinical or meat origin (9, 10, 13).

Factors extrinsic to the bacterium could explain the discrepancies between human and chicken embryo virulence for these four human asymptomatic carriage strains. First, resident microbiota of human gastrointestinal tract exert a barrier effect against invasion of enteropathogens, whereas this microbial interference did not exist in chick embryos. The nature of the receptor, E-cadherin, is also critical. In fact, oral inoculation of mice results in poor *L. monocytogenes* infection because the nature of the sixteenth amino acid of murine E-cadherin is different from that of human E-cadherin and results in low interaction with internalin (32). In the same way, human carriers with the germ line E-cadherin mutation could be protected from infection, resulting in an abrogation of InlA-dependent entry into human cells. Indeed, several authors have already described the existence of germ line E-cadherin mutations in general population as in families fulfilling the criteria

for gastric and colon cancer (6, 42, 46). To date, 28 truncating and missense mutations have been characterized along the protein and, notably, around the calcium-binding site considered to be potentially involved in the interaction with InlA (32, 36).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge P. Cossart (Institut Pasteur, Paris, France) for kindly providing antibodies directed against InlA (35).

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement.

#### REFERENCES

- Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart. 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **19**:1458–1466.
- Brosch, R., B. Catimel, G. Milon, E. Buchrieser, E. Vindel, and J. Rocourt. 1993. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J. Food Prot.* **56**:296–301.
- Buncic, S., and S. M. Avery. 1996. Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37°C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**:18–22.
- Buncic, S., S. M. Avery, and A. R. Rogers. 1996. Listeriolysin O production and pathogenicity of non-growing *Listeria monocytogenes* stored at refrigeration temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **31**:133–147.
- Chakraborty, T., F. Ebel, J. Wehland, J. Dufrenne, and S. Notermans. 1994. Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long-term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**:1–10.
- Chun, Y. S., N. M. Lindor, T. C. Smyrk, B. T. Petersen, L. J. Burgart, P. J. Guilford, and J. H. Donohue. 2001. Germline E-cadherin gene mutations. *Cancer* **92**:181–187.
- Coffey, A., F. M. Rombouts, and T. Abee. 1996. Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1252–1256.
- Cossart, P., and M. Lecuit. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands, and signaling. *EMBO J.* **17**:3797–3806.
- Cotter, P. D., C. G. Gahan, and C. Hill. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol. Microbiol.* **40**:465–475.
- Czuprynski, C. J., N. G. Faith, and H. Steinberg. 2002. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2893–2900.
- Del Corral, F., R. L. Buchanan, M. M. Bencivengo, and P. H. Cooke. 1990. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *J. Food Prot.* **53**:1003–1009.
- Durst, J., and M. Zimanyi. 1976. The *Listeria monocytogenes* carrier state of the staff of maternity centres in non-epidemic periods. *Zentbl. Bakteriol. Orig. A* **234**:281–283. (In German.)
- Dykes, G. A., and S. M. Moorhead. 2000. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int. J. Food Microbiol.* **56**:161–166.
- Fujisawa, T., and M. Mori. 1994. Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1127–1129.
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couvé, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K.-D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-Del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.-M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurupkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. Mata Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.-C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Rammel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.-A. Vasquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849–852.
- Goulet, V., A. Lepoutre, J. Rocourt, P. Courtieu, P. Dehaumont, and P. Veit. 1993. Epidémie de listériose en France: bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **4**:13–14.
- Grif, K., I. Hein, M. Wagner, E. Brandl, O. Mpamugo, J. McLauchlin, M. P. Dierich, and F. Allerberger. 2001. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in the feces of healthy Austrians. *Wien Klin. Wochenschr.* **113**:737–742.
- Herd, M., and C. Kocks. 2001. Gene fragments distinguishing an epidemic-

- associated strain from a virulent prototype strain of *Listeria monocytogenes* belong to a distinct functional subset of genes and partially cross-hybridize with other *Listeria* species. *Infect. Immun.* **69**:3972–3979.
19. Ireton, K., B. Payrastra, and P. Cossart. 1999. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**:17025–17032.
  20. Jacquet, C., E. Gouin, D. Jeannel, P. Cossart, and J. Rocourt. 2002. Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:616–622.
  21. Jeffers, G. T., J. L. Bruce, P. L. McDonough, J. Scarlett, K. J. Boor, and M. Wiedmann. 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* **147**:1095–1104.
  22. Jonquieres, R., H. Bierre, J. Mengaud, and P. Cossart. 1998. The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect. Immun.* **66**:3420–3422.
  23. Kampelmacher, E. H., W. T. Huysinga, and L. M. van Noorle Jansen. 1972. The presence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women and neonates. *Zentbl. Bakteriolog. Orig. A* **222**:258–262.
  24. Kampelmacher, E. H., D. E. Maas, and L. M. van Noorle Jansen. 1976. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women with and without direct animal contact. *Zentbl. Bakteriolog. Orig. A* **234**:238–242.
  25. Kampelmacher, E. H., and L. M. van Noorle Jansen. 1972. Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zentbl. Bakteriolog. Orig. A* **221**:70–77. (In German.)
  26. Kelly, J., S. Barnass, E. Sawicka, and A. Dean. 1999. *Listeria* meningitis presenting in an immunocompetent adult patient. *Hosp. Med.* **60**:140–141.
  27. Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**:521–531.
  28. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of a structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
  29. Lammerding, A. M., K. A. Glass, A. Gendron-Fitzpatrick, and M. P. Doyle. 1992. Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3991–4000.
  30. Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **18**:3956–3963.
  31. Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart. 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* **65**:5309–5319.
  32. Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**:1722–1725.
  33. Lwin, M. M., J. De Louvois, and D. R. Hurley. 1991. Carriage of *Listeria monocytogenes* in pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol.* **11**:41–42.
  34. MacGowan, A. P., R. J. Marshall, I. M. MacKay, and D. S. Reeves. 1991. *Listeria* faecal carriage by renal transplant recipients, haemodialysis patients and patients in general practice: its relation to season, drug therapy, foreign travel, animal exposure and diet. *Epidemiol. Infect.* **106**:157–166.
  35. Mengaud, J., M. Lecuit, M. Lebrun, F. Nato, J. C. Mazie, and P. Cossart. 1996. Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect. Immun.* **64**:5430–5433.
  36. Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mege, and P. Cossart. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**:923–932.
  37. Muller, H. E. 1990. *Listeria* isolations from feces of patients with diarrhea and from healthy food handlers. *Infection* **18**:97–99.
  38. Norrung, B., and J. K. Andersen. 2000. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:228–232.
  39. Notermans, S., J. Dufrenne, P. Teunis, and T. Chackraborty. 1998. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **61**:244–248.
  40. Notermans, S. H., J. Dufrenne, M. Leimeister-Wachter, E. Domann, and T. Chakraborty. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2666–2670.
  41. Olier, M., F. Pierre, J. P. Lemaitre, C. Divies, A. Rousset, and J. Guzzo. 2002. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology* **148**(Pt. 6):1855–1862.
  42. Oliveira, C., M. C. Bordin, N. Grehan, D. Huntsman, G. Suriano, J. C. Machado, T. Kiviluoto, L. Aaltonen, E. J. Jackson, R. Seruca, and C. Caldas. 2002. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum. Mutat.* **19**:510–517.
  43. Ortel, S. 1971. Excretion of *Listeria monocytogenes* in the stools of healthy persons. *Zentbl. Bakteriolog. Orig. A* **217**:41–46. (In German.)
  44. Rocourt, J., C. Jacquet, and A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* **62**:197–209.
  45. Rousset, A., J. P. Lemaitre, and A. Delcourt. 1994. Research of *Listeria monocytogenes* from different sites (faecal, genital, and oropharyngeal secretions). *Med. Mal. Infect.* **1994**:1174–1179.
  46. Salahshor, S., H. Hou, C. B. Diep, A. Loukola, H. Zhang, T. Liu, J. Chen, L. Iselius, C. Ru, R. A. Lothe, L. Aaltonen, X. F. Sun, and A. Lindblom. 2001. A germline E-cadherin mutation in a family gastric and colon cancer. *Int. J. Mol. Med.* **8**:439–443.
  47. Santiago, N. I., A. Zipf, and A. K. Bhunia. 1999. Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2765–2769.
  48. Schlech, W. F., III, P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**:203–206.
  49. Schuchat, A., K. Deaver, P. S. Hayes, L. Graves, L. Mascola, and J. D. Wenger. 1993. Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *J. Infect. Dis.* **167**:1261–1262.
  50. Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton. 2000. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**:501–510.
  51. Sokolovic, Z., S. Schuller, J. Bohne, A. Baur, U. Rdest, C. Dickneite, T. Nichterlein, and W. Goebel. 1996. Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4. *Infect. Immun.* **64**:4008–4019.
  52. Terplan, G., and S. Steinmeyer. 1989. Investigations on the pathogenicity of *Listeria* spp. by experimental infection of the chick embryo. *Int. J. Food Microbiol.* **8**:277–280.
  53. Van Langendonck, N., E. Bottreau, S. Bailly, M. Tabouret, J. Marly, P. Pardon, and P. Velge. 1998. Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J. Appl. Microbiol.* **85**:337–346.
  54. Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:584–640.

## **2. Production d'une forme tronquée de l'Internaline A : incidence de ce phénotype dans les niches écologiques de *Listeria monocytogenes***

**ARTICLE 3** : “Use of PCR-RFLP for the rapid detection of non invasive *Listeria monocytogene*”

L'Internaline A est un facteur de virulence qui permet à lui seul de déterminer si la souche est invasive ou non (Lecuit *et al.*, 1997). Les résultats obtenus précédemment vont complètement dans ce sens et renforcent le poids de ce facteur dans le processus infectieux.

Cette Internaline paraît fonctionnelle chez toutes les souches sporadiques et épidémiques testées, mais 5 souches parmi les 13 souches isolées dans les fèces de porteurs sains humains produisent une forme tronquée de InlA. Il paraît indispensable de comprendre l'origine des souches de portage produisant ces Internalines et de savoir s'il s'agit d'une spécificité de ce type de souche. S'il s'agit d'un caractère qui leur est spécifique, alors cela pourrait laisser penser que la lumière intestinale tolère plus particulièrement ce type de souches, alors que les souches invasives seraient plutôt internalisées et éliminées par le système immunitaire dans leur parcours. Ce système peut être cependant biaisé par le fait que ces souches sont peut-être plus facilement retrouvées dans les fèces car elles adhèrent peu à l'épithélium intestinal.

Partant sur la base que la présence des souches de *L. monocytogenes* au niveau fécal chez des porteurs sains résulte de l'ingestion d'aliments contaminés, nous avons voulu comparer le taux de souches produisant une forme tronquée de InlA parmi des souches de l'environnement comprenant des souches isolées d'aliments ou d'industries agroalimentaires.

De manière à détecter plus simplement et plus rapidement des souches produisant une forme tronquée de InlA au sein d'une population de souches, une méthode PCR-RFLP basée sur le polymorphisme d'une séquence partielle du gène *inlA* a été mise au point en collaboration avec S. Rousseaux. Cette portion de gène comprend la région contenant notamment les mutations responsables de l'apparition du codon stop chez H1, H17, H32, H34. Pour chaque souche, 2 profils électrophorétiques sont obtenus après la digestion du produit PCR par 2 enzymes de restriction (*AluI* et *Tsp509I*). Un profil composite résultant de la combinaison de ces 2 profils est arbitrairement défini.

L'analyse PCR-RFLP des souches isolées chez des porteurs sains permet de regrouper celles qui produisent une forme tronquée de InlA au sein de 2 profils composites (A et D) parmi les 5 obtenus. Concernant les souches environnementales, elles se répartissent au sein des 5 profils obtenus.

L'analyse de la production de InlA par Western-blot ainsi que les taux d'invasion observés sur la lignée Caco-2 révèlent la présence de 10 souches supplémentaires arborant une protéine InlA de masse moléculaire inférieure à 80 kDa. Ces souches sont toutes des souches isolées d'aliment (viande, carcasse de viande, saumure ou fromage) et sont aussi retrouvées au sein des profils A et D. Au sein de ces mêmes profils A et D, 3 souches possèdent par contre une protéine InlA a priori fonctionnelle de 80 kDa. Il s'agit d'une souche de portage fécal humain (H38) et de 2 souches de portage fécal chez la corneille (38 et 81). La recherche de ces 2 profils ne permet donc pas à 100% de garantir l'absence du pouvoir invasif des souches qui y sont regroupées.

A l'inverse, toutes les souches regroupées au sein des profils B, C et E sont invasives. Cette technique pourrait donc être utile pour identifier à grande échelle les souches invasives.

Les souches isolées sur les surfaces d'une usine produisant du fromage (sérotypage 1/2b) ne sont pas celles retrouvées sur l'aliment (sérotypes 1/2a et 3b). L'analyse du polymorphisme du gène *inlA* va dans ce sens puisque les profils PCR-RFLP sont différents et seules les souches isolées dans le fromage produisent une forme tronquée de InlA. Enfin, ni la souche isolée du compost, ni les 4 souches de portage fécal isolées chez la corneille ne produisent une forme tronquée de InlA.

La production de protéines InlA de masse moléculaire inférieure à 80 kDa ne serait donc pas une caractéristique des souches de portage fécal chez l'Homme, mais plutôt la conséquence d'ingestion d'aliments contaminés par ce type de souches. La mise à l'épreuve de cette technique sur un plus grand nombre de souches alimentaires serait cependant intéressante.

1           **Use of PCR-RFLP for the rapid detection of non invasive *Listeria monocytogenes***

2  
3 Article : AEM 989-03

4  
5  
6 Running title: PCR-RFLP profiles of *inlA* gene

7  
8                   S. Rousseaux, M. Olier, P. Piveteau, J.P. Lemaître and J. Guzzo\*

9 *Laboratoire de Microbiologie Equipe PG2MA, UMR INRA/UB 1232, ENSBANA,*  
10 *1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.*

11 **\*Corresponding author: Jean Guzzo Tel : +33 3 80 39 66 75. Fax : + 33 3 80 39 39.55**

12  
13 **E-mail : [jguzzo@u-bourgogne.fr](mailto:jguzzo@u-bourgogne.fr)**

14  
15  
16 **ABSTRACT**

17  
18 Polymorphism of *inlA* gene was analyzed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-  
19 Restriction Fragment Length Polymorphism) in order to correlate *inlA* gene PCR-RFLP  
20 profiles and production of truncated protein InlA. Thirty-seven *Listeria monocytogenes*  
21 isolated from various sources were screened. Strains producing truncated InlA were grouped  
22 within 2 specific PCR-RFLP profiles. Fifteen out of thirty-seven strains harbored these two  
23 specific profiles. Sequencing of *inlA* gene and Western blot analysis confirmed the presence  
24 of truncated InlA. Ten of these strains originating from food showed decreased invasive  
25 capacities toward human epithelial Caco-2 cells in comparison to strains equipped with  
26 complete protein InlA.

---

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes*, a facultative intracellular pathogen, is widespread in the environment (1, 22, 23). This bacterium can contaminate processed foods and several studies have established listeriosis as an important food-borne infection (13, 19). Moreover, *Listeria monocytogenes* can be frequently isolated from the gastrointestinal tract of healthy persons (8, 21). It has been estimated that between 1 to 6 % of the general population carry this bacterium (4, 10, 20). The majority of epidemiological investigations have focused on the rate of faecal carriage of *Listeria monocytogenes* and so concern human standards rather than bacterial features. (8, 10, 12). Little attention has been paid to the characteristics of strains carried asymptotically by humans and no comparison has been made between human carriage strains and clinical/environmental strains. The occurrence of these strains, their origin and their pathogenic potential must be investigated. Recently, variable capacities of human carriage isolates of *Listeria monocytogenes* to invade monolayers cells were observed. In fact, Jonquières *et al.* (9) described that human carriage strain, *Listeria monocytogenes* LO28, entered poorly into fibroblast line expressing L-CAM (the chicken homolog of E-cadherin) and produced a truncated form of the protein InlA (63kDa), an internalin implicated in entry in host cells, while virulent and invasive strains of *Listeria monocytogenes* produced a 80 kDa InlA. In a recent study, Olier *et al.* (16, 17) reported that several *Listeria monocytogenes* human carriage strains were attenuated for virulence, were affected in their invasion capacities towards Caco-2 cells and also produced truncated protein InlA (47 kDa). Sequence analysis of *inlA* gene showed point mutations responsible of production of truncated protein InlA and demonstrated polymorphism of *inlA* gene (9; 17, 18). In order to assess distribution of such strains, we used PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method to study *inlA* gene polymorphism of *Listeria monocytogenes* strains from various sources.

---

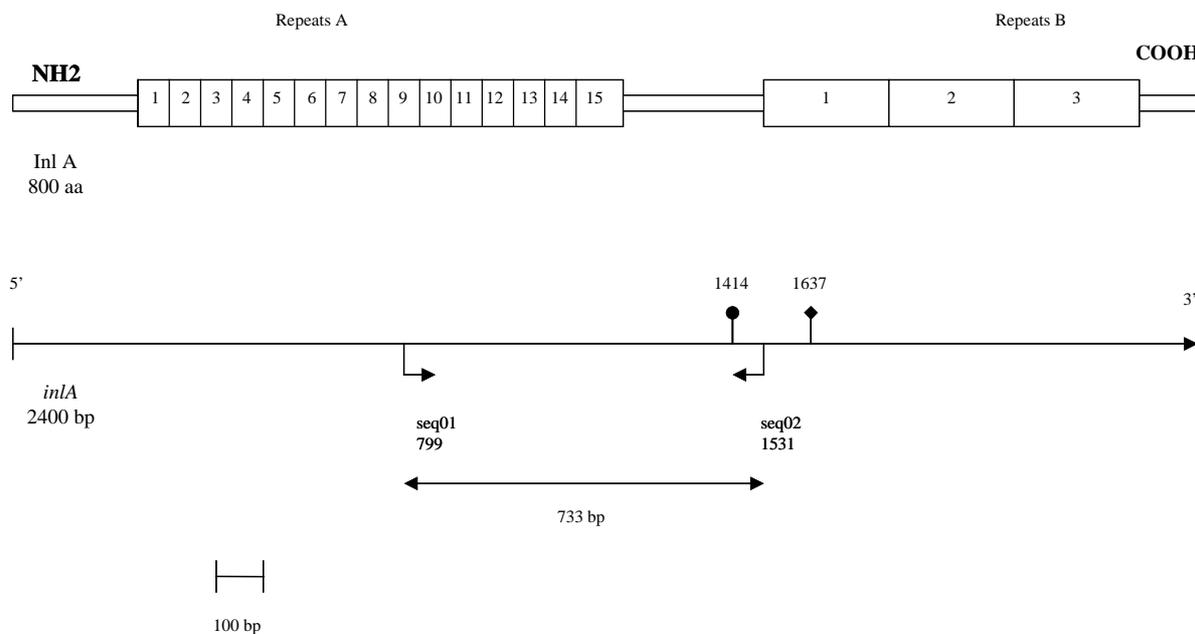
## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

*Listeria monocytogenes* strains used are listed in Table 1. Among them, thirteen asymptomatic carriage strains and two sporadic strains have been previously described by Olier *et al.* (17). Sporadic strain H4 and all environmental strains come from the strain collection of Laboratoire de Microbiologie UMR 1232, Dijon, France except strains NV4, NV5, NV7 and NV8, which have been provided by the “Laboratoire départemental de la Haute Vienne”, Limoges, France. Strain Scott A was obtained from the Institut Pasteur collection, Paris, France and strains LO28 and EGD-e were kindly provided by Pr Cossart, Institut Pasteur, Paris, France. These three strains were used as reference strains for comparative analysis.

### Restriction analysis (PCR-RFLP) of *inlA* gene

The *inlA* gene fragment (733 bp) amplified with primers seq01 (5'-AATCTAGCACCCACGTTTCGGG-3') and seq02 (5'-TGTGACCTTCTTTTACGGC-3') (16) encodes a region between repeats A10 and a part of repeat B1 of InlA (Figure 1). This *inlA* gene fragment was selected for polymorphism study because of its genetic heterogeneity due to point mutations (16, 17, 18). Restriction endonucleases *AluI* and *Tsp509I* were selected on the basis of partial sequence analysis of *inlA* gene for strain EGD-e (Accession number LMO00433), for human carriage strains H1, H17, H32, H34, LO28 (Accession numbers AF468816, AY126441, AY126442, AY126443, AY166686, respectively) and for strain ScottA (Accession number AY166685). Ten (strains EGD-e and LO28), 9 (strains H1, H17, H32, H34) and 7 (strain Scott A) *AluI* (ag/ct) restriction sites were detected. Ten (strain Scott A), 7 (strains EGD-e and LO28) or 6 (strains H1, H17, H32, H34) *Tsp509I* restriction sites were detected. These 2 restriction endonucleases were used independently. PCR-RFLP fragments were separated by electrophoresis on 3.5% Agarose gel type 05 DNA grade (Euromedex, France). Gels, stained with ethidium bromide were recorded with BioRAD gel doc 2000.



**FIG. 1:** Structural organization of internalin and partial map of *inlA* (18). Positions of the primers seq01 and seq02 used to amplify a heterogenous fragment of *inlA* gene are indicated by horizontal arrows. Black circle indicates the position of the mutation which created a nonsense codon on *inlA* gene of human carriage strains H1, H17, H32 and H34. Black diamond indicates the position of the deletion which created a nonsense codon on *inlA* gene of human carriage strain LO28.

### DNA sequencing

Sequencing was performed on DNA fragments generated by PCR using primers seq01 and seq 02. The PCR product was sequenced in single orientation (seq02) by Genome Express. Then obtained *inlA* gene sequences of studied strains were compared to EGD-e and Scott A *inlA* gene sequences to confirm presence of truncated InlA.

### SDS-PAGE and Western blot analysis

Bacterial surface proteins of studied strains were extracted, by the method of Koch *et al.* (11). SDS-PAGE and Western blot were done as previously described (16). Membrane hybridization was performed with mouse antibodies directed against InlA (L7.7) (14).

### Plaque forming in Caco-2 cells

The capacity of strains to invade and disseminate in the Caco-2 cells was evaluated in a plaque forming assay. The early-confluent cell monolayers were prepared as outlined above in 6-well tissue-culture plates. After overnight growth in Brain Heart Infusion broth (BHI), listerial cells were centrifuged (6000g for 10 min at room temperature) and serially diluted in PBS (Dulbecco's phosphate buffer saline with 1 mg glucose ml<sup>-1</sup> and 36 mg sodium pyruvate l<sup>-1</sup>; Life Technologies). Caco-2 cells were infected with 0.1 ml of the 10<sup>-4</sup> and 10<sup>-5</sup> dilutions and incubated 2 hours at 37°C. Three distinct wells were used by dilution. At the same time, the number of bacteria added was estimated by enumeration of the c.f.u. values by plating suitable dilutions. The plates were incubated for 24 to 48 h at 37°C. Initial entry percentage

was evaluated in function of the number of bacteria added. Duplicate assays were made for all strains. After 2 h of incubation at 37°C, non adherent bacteria were removed from monolayers by washing them three times with PBS and by overlaying them with 2 ml of DMEM medium containing 10 µg gentamicin ml<sup>-1</sup> to kill extracellular adherent bacteria. After 24 h of incubation at 37°C, 100 µl of trypan blue (0.4%) permitting the coloration of dead cells was added to each well and plaque formation of dead cells infected was observed 24 h later. Numbers of plaques obtained for each strain corresponded to initial entry percentage of strain after 2h of infection.

**Table 1** : RFLP profiles of *Listeria monocytogenes* strains and entry percentage in Caco-2 cells.

Strains	origin	serogroup	Profile <sup>a</sup> <i>AluI</i>	Profile <sup>a</sup> <i>Tsp509I</i>	Composite profile <sup>b</sup>	Internalin* (kDa)	Entry percentage
H1	healthy pregnant carrier (Beaune, France, 1991)	1	1	3	A	47	0.5
H2	healthy 3-year child (Beaune, France, 1992)	4	2	1	B	80	9.5
H4	sporadic strain, blood culture (Beaune, France, 1992)	nd	3	2	C	80	18.3
H6	healthy carrier (Beaune, France, 1991)	nd	2	1	B	80	6.0
H11	healthy carrier (Beaune, France, 1992)	1	3	2	C	80	16.1
H12	healthy, oral isolate (Beaune, France, 1992)	4	2	1	B	80	14.5
H17	healthy carrier (Beaune, France, 1992)	nd	1	3	A	47	0.03
H21	sporadic strain, blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4	2	1	B	80	20.1
H22	sporadic strain, blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4b	2	1	B	80	nd
H27	healthy 2-year child (Beaune, France, 1994)	4	2	1	B	80	10.1
H28	healthy 7-year child (Beaune, France, 1994)	1	2	1	B	80	10.3
H31	healthy 55-year man (Beaune, France, 1995)	1	3	2	C	80	7.0
H32	healthy 19-year women (Beaune, France, 1996)	1	1	3	A	47	0.2
H34	healthy 8-year infant (Beaune, France, 1997)	1	1	3	A	47	0.45
H35	healthy 11-year infant (Beaune, France, 1997)	1	2	1	B	80	8.3
H38	healthy carrier (Beaune, France, not ommunicated)	nd	1	3	A	80	16.0
NV4	minced beef	1/2a	4	2	D	50	0.01
NV5	minced beef	1/2c	4	2	D	65	0.01
NV7	bovine carcass	1/2c	4	2	D	50	0.3
NV8	bovine carcass	1/2a	4	2	D	43	0.5
1E	machine an industrial cheese-making plant (Dijon, France, 1990)	1/2b	2	1	B	80	6.6
3E	sink of an industrial cheese-making plant (Dijon, France, 1990)	1/2b	2	1	B	80	6.7
6E	wall of an industrial cheese-making plant (Dijon, France, 1990)	1/2a	5	3	E	80	24.0
1S	brine (Dijon, France, 1990)	1/2a	1	3	A	47	0.35
2S	brine (Dijon, France, 1990)	1/2a	1	3	A	47	0.5
3S	brine (Dijon, France, 1990)	1/2a	1	3	A	47	0.3
1F	cheese (Dijon, France, 1990)	1/2a	1	3	A	47	0.9
2F	cheese (Dijon, France, 1990)	1/2a	1	3	A	47	0.4
7F	cheese (Dijon, France, 1990)	3b	1	3	A	47	0.5
C9	compost (Dijon, France 2002)	nd	2	1	B	80	17.1
23	rook faeces (Besançon, France 1995)	4	2	1	B	80	24.8
38	rook faeces (Besançon, France 1995)	1	1	3	A	80	14.4
81	rook faeces (Besançon, France 1995)	1	4	2	D	80	15.8
97	rook faeces (Besançon, France 1995)	1	3	2	C	80	8.7
ScottA	Massachusetts milk outbreak (USA, 1983)	4b	2	1	B	80	11.9
EGD	laboratory strain	1/2a	4	2	D	80	10.0
LO28	healthy pregnant carrier (Spain)	1/2c	4	2	D	63	0.7

<sup>a</sup> Each different set of banding profiles for both restriction endonucleases was given an arbitrary number

<sup>b</sup> Reflects the total differences or similarities in the banding patterns with the two restriction endonucleases.

nd : not determined-\*molecular weights were determined approximately in reference to the molecular weight standard.

## RESULTS

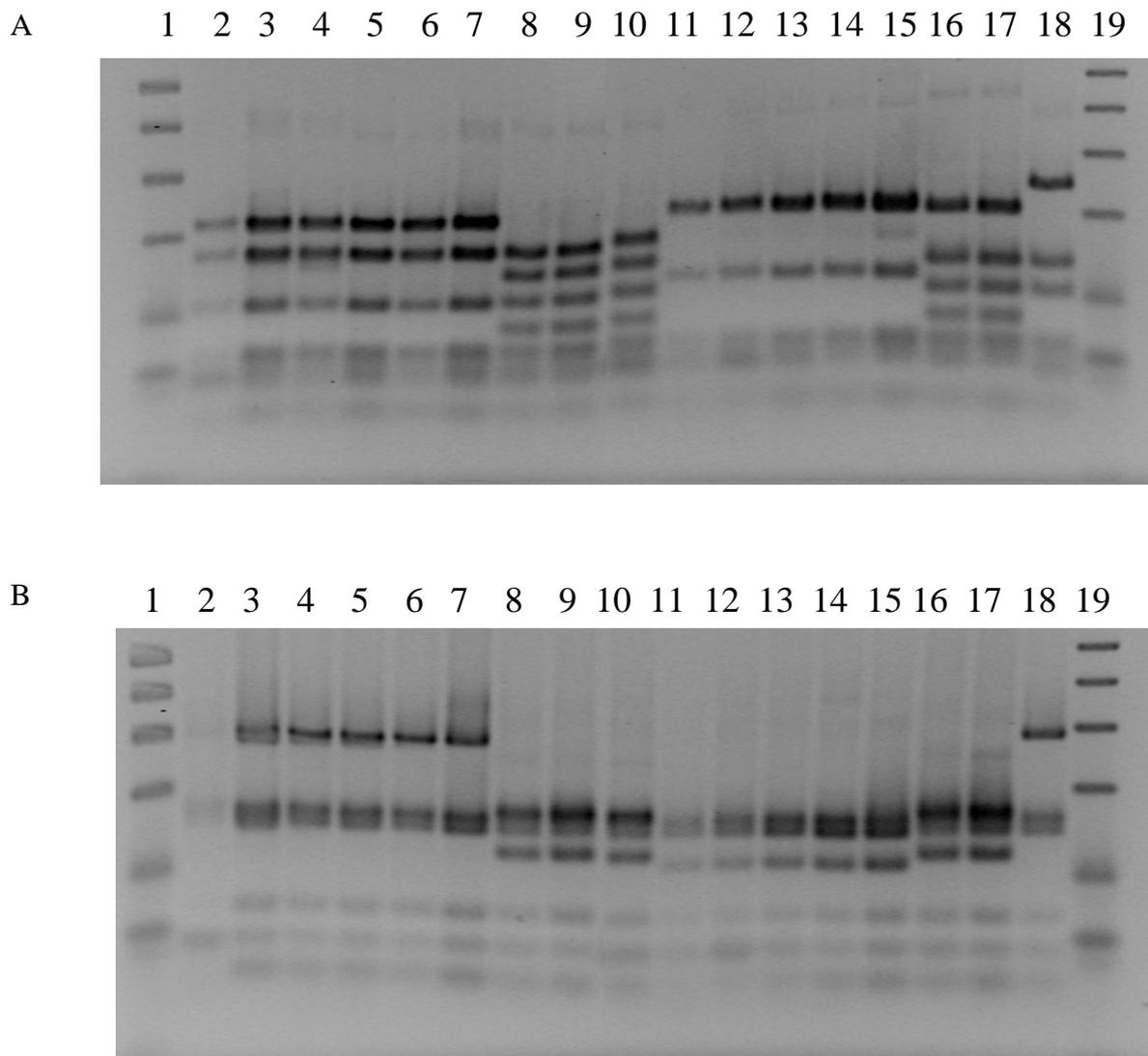
### Restriction analysis (PCR-RFLP) of *inlA* gene

Polymorphism of a region of *inlA* gene was studied by PCR-RFLP in 37 strains of *Listeria monocytogenes* (Table 1). With primers seq01 and seq02, single DNA fragments of the expected size were observed for all strains. PCR-RFLP profiles of different tested *L. monocytogenes* strains were shown on Figure 2.

Restriction of the amplified *inlA* gene fragment by endonuclease *AluI* (Figure 2a and Table 1) generated five different profiles with 8-11 bands ranging in size from 15 to 241 bp. Most of the 37 strains were associated with PCR-RFLP profile 1 (12 strains) or PCR-RFLP profile 2 (13 strains). Four strains were associated with PCR-RFLP profile 3 and 7 strains with PCR-RFLP 4. Only one strain (6E) had PCR-RFLP profile 5. Strains known to express a truncated protein InlA harbored profile 1 (strains H1, H17, H32, H34) and profile 4 (strain LO28).

Restriction endonuclease *Tsp509I* generated 3 different profiles (Figure 2b and Table 1) with 7-11 bands ranging in size from 8 to 281 bp. As with endonuclease *AluI*, *Tsp509I* grouped human carriage strains expressing a truncated protein InlA (H1, H17, H32, H34 and LO28) in two different profiles.

Five composite profiles were generated from the PCR-RFLP profiles obtained with the two restriction endonucleases (for example : composite profile A described strains characterized by PCR-RFLP 1 (*AluI*) and by PCR-RFLP 3 (*Tsp509I*)) (3) (Table 1). There was no correlation between composite profiles and strain origin. Twelve strains isolated from brine (1S, 2S and 3S), cheese (1F, 2F and 3F), human carriage strains (H1, H17, H32, H34 and H38) and faecal rook carriage strain 38 were grouped in composite profile A. Composite profile B grouped 13 different strains: sporadic (strains H21 and H22), epidemic (strain Scott A), environmental (strains 1E, 3E, C9), faecal rook carriage (strain 23) and human carriage strains (strains H2, H6, H12, H27, H28 and H35). Only four strains were distributed in composite profile C: strains H4, H11, H31 and faecal rook carriage strain 97. Strain EGD-e and human carriage strain LO28 were grouped in composite profile D with five other strains (strains NV4, NV5, NV7, NV8 isolated from meat and faecal rook carriage strain 81). Composite profile E was specific to environmental strain 6E.



**FIG. 2.:** PCR-RFLP profiles of different strains obtained after restriction with endonuclease *AluI* (A) and *Tsp509I* (B). Lines 1 and 19: molecular weight marker (molecular size of fragments in bp 450, 350, 300, 200, 100, 50); line 2: strain H1; line 3: strain H32; line 4: strain 1S; line 5: strain 2S; line 6: strain 1F; line 7: strain 2F; line 8: strain NV4; line 9: strain LO28; line 10: strain EGD-e; line 11: strain H2; line 12: strain H21; line 13: strain 1E; line 14: strain C9; line 15: strain Scott A; line 16: strain H4; line 17: strain 97; line 18: strain 6E.

## DNA sequencing

Composite profiles A and D characterized strains H1, H17, H32, H34 and LO28, strains known to express truncated InlA. In order to confirm that all strains belonging to composite profiles A and D also expressed truncated InlA, we sequenced seq01-seq02 *inlA* gene of all strains belonging to these composite profiles.

DNA sequencing of *inlA* gene from strains 1S, 2S, 3S, 1F, 2F and 7F belonging to composite profile A showed silent mutations. One supplementary single point mutation consisting of the substitution of a cytosine for a thymidine at position 1414 (this position is based on the first translated codon) was detected. This point mutation created a nonsense codon (TAG) in the coding sequence leading to the production of a protein with theoretical molecular masses of 47 kDa (Table 1). These six strains produced a truncated protein InlA (47 kDa) similar to InlA produced by strains H1, H17, H32 and H34.

DNA sequencing of *inlA* gene from NV4, NV5, NV7 NV8 belonging to composite profile D showed as well point mutations. For strain NV7, a deletion of an guanine at position 1480 was observed. This frameshift mutation leads to the creation of a nonsense codon, TGA, for position 1496 generating an open reading frame encoding a theoretical 50 kDa protein InlA. For strain NV8, a substitution of a guanine for an adenine at position 1320 (this position is based on the first translated codon) created a nonsense codon (TGA) in the coding sequence which could lead to the production of a protein with theoretical molecular masse of 43 kDa (Table 1).

Human carriage strain H38 and rook faecal carriage 38 of composite profile A and rook faecal carriage 81 of composite profile D exhibited a complete protein InlA (80 kDa) (Table 1).

These results are in complete accordance with the apparent molecular masses of proteins detected by Western blot (data not shown).

## Plaque forming in Caco-2 cells analysis

To correlate belonging of a composite profile and capacity to invade Caco-2 cells, plaque forming analysis was done for all studied strains. Strains 1F, 2F, 7F, 1S, 2S, 3S (composite profile A), NV4, NV5, NV7 and NV8 (composite profile D) produced a truncated InlA showed a weak capacity (lower than 1%) to invade Caco-2 cells compared to the other strains (6% to 24 %) (Table 1).

## DISCUSSION

In this work, analysis of *inlA* gene polymorphism was studied by PCR-RFLP method to detect *Listeria monocytogenes* strains expressing truncated InlA. Different PCR-RFLP profiles of *inlA* gene were observed, showing the spread of *inlA* gene polymorphism as previously described (5, 7, 18, 24). Although *inlA* gene was described as a conserved gene, from our results, *inlA* gene exhibited important genetic heterogeneity likely due to point mutations and particularly on region between repeats A10 and B1 of protein InlA (Figure 1).

Restriction endonucleases *AluI* and *Tsp509I* were good discriminating enzymes for this polymorphism analysis. Other studies have also reported the use of restriction endonuclease *AluI* in the study of virulence gene polymorphism (5, 7, 18). In this study, we observed that eight strains harbored the composite profile A as strains H1, H17, H32 and H34 and six of them produced a truncated InlA. Moreover, six strains were characterized by the composite profile D as strain L028. Four of them produced a truncated InlA. In total, 15 strains producing a truncated InlA were characterized by two specific composite profiles (A and D) and ten new *Listeria monocytogenes* strains expressing truncated forms of InlA were detected using this method. Although, all strains producing a truncated protein InlA were characterized by two specific composite profiles (A and D), four strains H38, 38, EGD-e and 81 with complete internalin, harbored same composite profiles (A and D) as strains with truncated InlA. We know that point mutations (position 1414 or 1637 on *inlA* gene) were responsible of the production of a truncated protein InlA for strains H1, H17, H32, H34 and L028, (9, 16, 17). Sequence analysis of *inlA* gene fragment showed that these point mutations did not correspond to restriction sites (point mutation 1414) of endonucleases *AluI* and *Tsp509I* or were on the outside of the amplified *inlA* gene fragment (799-1531 bp) and so were not detected (point mutation 1637). To optimize detection of strains expressing truncated InlA by this rapid method, it would be useful to amplify a longer fragment of *inlA* gene that may include a higher number of point mutations. We could also increase polymorphism analysis using other restriction endonucleases to detect numerous point mutations responsible to the production of different forms of internalin and to obtain more information about genetic heterogeneity of *inlA* gene.

Despite some exceptions, use of PCR-RFLP method permitted to characterize strains producing truncated InlA and ten new strains producing truncated protein InlA were thus detected.

From this study and previous studies (9, 16, 17), nineteen strains producing truncated internalin were detected: it appears that expression of truncated internalin may not be a rare event and not specific to human carriage. In fact, ten out of 15 strains of *Listeria*

*monocytogenes* with a truncated InlA were isolated from food (brine, cheese or meat). In a previous report, Jonquières *et al.* (9) reported that three out of five *Listeria monocytogenes* strains producing truncated internalin were isolated from meat, dairy and fish. Epidemiological studies reported that although exposure rate to *Listeria monocytogenes* is rather high, the probability to contract the disease is low (6, 15). Different hypothesis were suggested. All *Listeria monocytogenes* strains occurring in food may not be responsible for the development of the disease because of variable infection ability (15). Results obtained in this study are in accordance with this hypothesis. Alternatively, levels of strains with attenuated virulence may be higher than previously described. In our study, fifteen out of thirty-seven strains showed a weak capacity to invade Caco-2 cells. This high number of food isolated strains with low capacities to invade Caco-2 cells could be considered as an explanation of the low probability to contract the disease. Chakraborty *et al.*, (2) suggested that occasional contacts with attenuated virulence strains of *Listeria monocytogenes* may be responsible for high levels of human resistance to *Listeria* infections. So, ingestion of contaminated food by attenuated virulence strains could explain the high level of human resistance and the occurrence of asymptomatic human carriage strains. On an epidemiological point of view, it would be interesting to know if *Listeria monocytogenes* strains expressing truncated protein InlA in healthy carriers were identical to attenuated virulence strains producing truncated protein InlA isolated from food. Use of molecular typing methods as ribotyping or RAPD will be an interesting approach for epidemiological study to answer this hypothesis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Pr P. Cossart (Institut Pasteur, Paris, France) for kindly providing antibodies directed against InlA. This work was supported by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement.

#### REFERENCES

1. **Bouttefroy, A., J.P. Lemaitre, and A. Rousset.** 1997 Prevalence of *Listeria* sp. in droppings from urban rooks (*Corvus frugilegus*). J Appl. Microbiol. **82**: 641-647.
2. **Chackraborty, T., F. Ebel, J. Wehland, J. Dufrenne, and S. Notermans.** 1994 Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. FEMS Immunology and Medical Microbiology **10**: 1-10.

3. **Delgado da Silva, M.C., M.T. Destro, E. Hofer, and A. Tibana.** 2001 Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **63**: 275-280.
4. **Durst, J., and M. Zimanyi.** 1976 The *Listeria monocytogenes* carrier state of the staff of maternity centres in non epidemic periods. *Zentralbl. Bakteriol.* **234**: 281-283.
5. **Ericsson, H., P. Stalhandske, M.L. Danielsson-Tham, E. Bannerman, J. Bille, C. Jacquet, J. Rocourt, and W. Tham.** 1995 Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3872-3874.
6. **Gellin, B.C., and C.V. Broome.** 1989 Listeriosis. *JAMA* **261**: 1313-1320.
7. **Giovannacci, I., C. Ragimbeau, S. Queguiner, G. Salvat, J.L. Vendevre, V. Carlier, and G. Ermel.** 1999 *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int. J. Food Microbiol.* **53**: 127-140.
8. **Grif, K., I. Hein, M. Wagner, E. Bandl, O. Mпамugo, J. MacLauchlin, M.P. Dierich, and F. Allerberger.** 2001 Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in the faeces of healthy Austrians. *Wien Klin. Wochenschr* **113**: 737-742.
9. **Jonquière, R., H. Bierne, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1998 The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbours a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infection and Immunity* **66**: 3420-3422.
10. **Kampelmacher, E.H., and L.M. van Noorle Jansen.** 1972 Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zentralbl. Bakteriol.* **221** 70-77.
11. **Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1992 *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
12. **Macgowan, A.P., R.J. Marshall, I.M. Mackay, and D.S. Reeves.** 1991 *Listeria* faecal carriage by renal transplant recipients, haemodialysis patients and patients in general practice: its relation to season, drug therapy, foreign travel, animal exposure and diet. *Epidemiol. Infect.* **106**: 157-166.
13. **McLauchlin, J., N.A. Saunders, A.M. Ridley, and A.G. Taylor.** 1988 Listeriosis and food-borne transmission. *Lancet.* **1**: 177-178.

14. **Mengaud, J., M. Lecuit, M. Lebrun, F. Nato, J.C. Mazie, and P. Cossart.** 1996 Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect. Immun.* **64**: 5430-5433.
15. **Notermans, S., J. Dufrenne, P. Teunis, and T. Chackraborty.** 1998 Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **61**: 244-248.
16. **Olier, M., F. Pierre, J.P. Lemaître, C. Divies, A. Rousset, and J. Guzzo.** 2002 Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology* **148**:1855-1862.
17. **Olier, M., F. Pierre, S. Rousseaux, J.P. Lemaître, A. Rousset, P. Piveteau, and J. Guzzo.** Expression of truncated Internalin A is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* human carriage isolates. *Infection and Immunity.* *Infect. Immun.* **71**: 1217-1224.
18. **Poyart, C., P. Trieu-Cuot, and P. Berche.** 1996 The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **142**: 173-180.
19. **Schlech, W.F., 3rd P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and C.V. Broome.** 1983 Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**: 203-206.
20. **Schuchat, A., K. Deaver, P.S. Hayes, L. Graves, L. Mascola, and J.D. Wenger.** 1993 Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *J. Infect. Dis.* **167**: 1261-126.
21. **Slutsker, L., and A. Schuchat.** 1999 *In: Listeria, Listeriosis and Food Safety* by ET Ryser and EH Marth, Marcel Dekker, Inc, NY chap **4**: 75-95
22. **Watkins, J., and K.P. Sleath.** 1981 Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 1-9.
23. **Weis, J., and H.P. Seeliger.** 1975 Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* **30**: 29-32
24. **Wiedmann, M., J.L. Bruce, C. Keating, A.E. Johnson, P.L. McDonough, and C.A. Batt.** 1997 Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection Immunity* **65**: 2707-2716.

### **3. Comportement des souches de portage asymptomatique dans un environnement simulant celui rencontré dans le système digestif**

#### **ARTICLE 4 : “ Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage isolates, clinical isolates and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*”**

L'entrée dans la cellule hôte par *L. monocytogenes* est la première étape dans le processus infectieux. Cette étape nous est apparue comme la plus intéressante pour caractériser le potentiel invasif des souches isolées notamment chez des porteurs sains. En comparaison des comportements observés pour des souches d'origine diverse, il apparaît que le « pathotype » observé pour les souches de portage ne leur est pas exclusif. En conséquence, la question à laquelle nous avons voulu répondre est de savoir si ces souches avaient des capacités particulières à survivre dans des conditions mimant celles rencontrées dans l'appareil digestif humain.

Les études réalisées par le groupe de C. Hill (Cotter *et al.*, 2001a ; Cotter *et al.*, 2001b) ont montré que le système GAD (Glutamate décarboxylase) est l'un des systèmes les plus importants pour survivre en milieu acide. Celui-ci est activé à bas pH et même en présence de faibles concentrations de glutamate. Etant donné que le glutamate est naturellement retrouvé au sein de toutes les catégories d'aliments, et qu'il est même parfois ajouté, la contribution de ce système GAD doit être omniprésente au cours du passage de l'estomac et de l'iléon. Sa présence dans les intestins en tant que précurseur du métabolisme des cellules intestinales est d'ailleurs essentielle à la maintenance de l'intégrité de l'épithélium en constant renouvellement (Reeds *et al.*, 2000). En conséquence, nous avons évalué le niveau de l'activité GAD pour l'ensemble des souches à disposition.

Une étude réalisée par le groupe de P. Cossart (Dussurget *et al.*, 2002) a montré que l'un des mécanismes permettant à *L. monocytogenes* de résister aux sels biliaires consiste à hydrolyser les sels biliaires conjugués par l'intermédiaire de la BSH (Bile Salt Hydrolase). Le rôle de cette enzyme dans la persistance de la bactérie lors d'un portage fécal chez le cobaye a d'ailleurs été montré. Les capacités de résistance aux sels biliaires des souches à disposition ont donc été investies.

Une grande variabilité de comportements est observée en réponse à l'acidité, à la présence du glutamate ou à la présence de sels biliaries. Aucune relation entre les niveaux d'activité observés et l'origine de la souche considérée n'a été obtenue. La classification obtenue par l'intermédiaire du polymorphisme de la région promotrice du gène *bsh* rejoint d'avantage une loi basée sur le sérotype des souches, à savoir les sérotypes 4b et 1/2b contre les sérotypes 1/2a et 1/2c.

Par contre, parmi les souches environnementales, les souches isolées d'aliments et de surfaces d'industries agroalimentaires ont des activités GAD globalement plus faibles que la majorité des souches étudiées. Une activité GAD faible implique une résistance à l'acidité faible. Ces résultats suggèrent que l'estomac est la barrière qui limiterait le passage des souches ayant une activité GAD modérée vers l'intestin. Le fonctionnement de cette barrière n'est pourtant pas automatique puisque par exemple, certaines souches n'ayant pas d'activité GAD détectable ont été isolées au niveau fécal (H6, H27 et H31). Cependant, cette hypothèse expliquerait aussi le fait que les souches de portage fécal (animal et humain) comme les souches épidémiques et sporadiques ont des niveaux d'activité GAD globalement élevés.

La résistance aux sels biliaries semble être une caractéristique de l'espèce *L. monocytogenes* au-delà de l'origine des souches puisque toutes les souches sont capables de pousser sur un milieu contenant jusqu'à 5% de sels biliaries. Les sels biliaries sont habituellement réputés pour leurs propriétés antimicrobiennes. Cette adaptation est un élément qui rapproche cette espèce des bactéries entériques.

---

## Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*

Keywords: *Listeria monocytogenes*, bile salts, glutamate decarboxylase acid resistance system

Maïwenn Olier,<sup>1</sup> Sandrine Rousseaux,<sup>1</sup> Pascal Piveteau,<sup>1</sup> Jean-Paul Lemaître,<sup>1\*</sup> André Rousset,<sup>1,2</sup> and Jean Guzzo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie, UMR INRA/UB 1232, ENSBANA, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>2</sup>Service Biologie, Centre Hospitalier général de Beaune, Avenue Guigogne Salin, 21200 Beaune, France.

\*Corresponding author : Jean-Paul Lemaître Tel : +33 3 80 39 66 79. Fax : + 33 3 80 39 39 55

E-mail : [jplemait@u-bourgogne.fr](mailto:jplemait@u-bourgogne.fr)

### Abstract

Following consumption, stomach acidity is the first major barrier encountered by the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Analysis of low pH sensitivity and glutamate decarboxylase (GAD) acid resistance system of 14 isolates of *L. monocytogenes* carried asymptotically by humans showed that levels of GAD activity was subjected to strain variation. Similar variations were observed for strains responsible of 18 listeriosis, whereas in comparison, 13 strains isolated from food and from food-processing plant environment showed lower GAD activity. Following survival of the stomach barrier, *L. monocytogenes* also has to resist to bile salts encountered in the small intestine. Analysis revealed that all strains tested were able to grow in presence of bile salts with concentrations as high as those encountered in the small intestine and had the previously identified Bile Salt Hydrolase (BSH) activity. Strain variation was observed but there was no relationship between the origin of the strains and the ability to degrade bile salts.

## 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a Gram-positive facultative intracellular pathogen that has been recognized as a major food-borne pathogen since transmission of human listeriosis was first shown to be food borne (Schlech et al., 1983; Schlech, 1984). Based on present knowledge, any strain of *L. monocytogenes* detected in food should be considered as potentially pathogenic. However, assessment of their pathogenic process by *in vivo* and *in vitro* models suggest that *L. monocytogenes* virulence is heterogeneous (Del Corral et al., 1990; Brosch et al., 1993; Wiedmann et al., 1997; Van Langendonck et al., 1998; Norrung and Andersen, 2000; Barbour et al., 2001; Olier et al., 2003). Consequently, detection of markers that could predict their level of virulence in human are currently underway. Markers of virulence are generally studied using strains isolated from patients with listeriosis or from food or environment; in our laboratory isolates carried asymptotically by humans have been studied in order to ascertain their virulence levels (Olier et al., 2003): of the 14 human carriage strains studied, 10 were virulence attenuated toward 14-day-old chick embryos. Five of these 10 isolates were impaired in their internalization process in Caco-2 cells because they produced a truncated form of Internalin, a well-known virulence factor. For the other 5 strains, internalization into host cells was similar to sporadic or epidemic-associated strains (Olier et al., 2003). Consequently, these human carriage strains must be considered as potentially pathogenic.

Ability to resist to low pH and bile, two stresses encountered in stomach and intestine, could be important factors for survival and asymptomatic carriage of a *L. monocytogenes* strain. In response to low pH in gastric fluids, intracellular homeostasis of *L. monocytogenes* is partially dependent on the ability of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase to pump excess protons from cytoplasm (Cotter et al., 2000). In addition, *L. monocytogenes* apparently utilizes a glutamate decarboxylase system (GAD) homologous to that used by *E. coli* (Cotter et al., 2001). When the cell is exposed to low pH, the GAD system converts one molecule of extracellular glutamate to one extracellular  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA), while consuming an intracellular proton. The net effect of the GAD system is to reduce the proton concentration within the cell, thus alleviating acidification of the cytoplasm and alkalize the environment since  $\gamma$ -aminobutyrate is less acidic than glutamate (Small and Waterman, 1998). Variations in levels of GAD activity between strains of *L. monocytogenes* correlates significantly with levels of tolerance to gastric fluids in the presence of glutamate and suggests that its expression is an absolute requirement for survival in the stomach environment and for a subsequent colonization of the gut (Cotter et al., 2001). Deliberate addition of free glutamate

in a large variety of food for flavor enhancement or for adjustment of acidity contributes significantly to the survival of *L. monocytogenes* strains with GAD activity, even with low concentrations (0.22mM) (Cotter et al., 2001). The well-characterized LO28 strain, which was recovered from the feces of healthy pregnant women, possesses the highest GAD activity among strains tested by Cotter et al. (2001). So, one of our objectives was to evaluate GAD activity of human carriage strains in comparison to the GAD activity of food, environmental and clinical isolates of *L. monocytogenes*.

Similarly, in comparison to clinical isolates, *L. monocytogenes* LO28 strain was capable of growing in the presence of bovine, porcine, and human bile salts with concentrations higher than those encountered *in vivo* (Begley et al., 2002). Moreover, *L. monocytogenes* have been isolated from gallbladder, where bile salts are concentrated before they are released in the duodenum during digestion (Briones et al., 1992). Bile salts are amphipatic molecules, which can act as biological detergents by degrading lipid-containing bacterial membranes and have so antimicrobial properties. Several mechanisms to resist the detergent action of bile salts have been recently identified. Firstly, homologues of genes involved in maintenance of the cell envelope in species closely related to *L. monocytogenes* have been identified as putative genes involved in bile stress responses (Begley et al., 2002; Begley et al., 2003). Secondly, similarly to bacteria of numerous species isolated from the human gastrointestinal tract, Dussurget et al. (2002) found that the sequenced EGD-e *L. monocytogenes* strain was capable of hydrolysing the amide bond of conjugated bile salts, liberating free bile salts with markedly lower detergent properties in the emulsification of fat. Analysis of bile salt hydrolase (BSH) of EGD-e strain revealed that BSH was regulated by PrfA, the transcriptional activator of known virulence genes, and a PrfA DNA binding site was detected in the promoter of the *bsh* gene (Dussurget et al., 2002). Moreover, analysis of fecal carriage in guinea pig orally inoculated with EGD-e versus EGD-e $\Delta$ *bsh* showed that BSH activity was an adaptative advantage for intestinal persitence and colonization of this enteropathogen (Dussurget et al., 2002).

Despite the fact that *L. monocytogenes* is not considered as a normal inhabitant of the gastrointestinal tract, human beings and animals are known fecal carriers (Bojsen-Moller, 1972; Weber et al., 1995) and could have an important role in the transmission and spread of the bacteria. Therefore objectives of this study was to characterize further these human carriage strains by analysing their tolerance to low pH and bile, to evaluate their GAD and BSH activity in comparison to food, environmental and clinical isolates of *L. monocytogenes*.

## 2. Material and methods

### 2.1. *L. monocytogenes* strains and media

Fourteen human carriage strains, 4 animal carriage isolates, 18 human sporadic and epidemic clinical isolates and 14 food and environmental isolates were used (Table 1). Isolation methods, species identification (Rousset et al., 1994) and virulence potential of human isolates have been previously described (Olier et al., 2003). Strains Scott A (obtained from the Institut Pasteur Collection, Paris, France), strains LO28 and EGD-e (kindly provided by P. Cossart, Institut Pasteur, Paris, France) were added as reference strains for comparative analysis. Food and environmental strains came from the strain collection of “Laboratoire de Microbiologie UMR INRA/UB 1232” (Dijon, France) except strains NV4, NV5, NV7 and NV8, which have been provided by the “Laboratoire départemental de la Haute Vienne”(Limoges, France).

Stock cultures were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  in cryobank (AES Laboratoires, Combourg, France). All strains were resuscitated before use by inoculation onto Brain Heart Infusion (BHI, Biomérieux, Marcy l’Etoile, France) agar plates supplemented with acriflavine (Sigma, St Louis, MO, USA)  $10\text{ mg l}^{-1}$  and ceftazidime (GlaxoSmithkline, Marly-le Roi, France)  $50\text{ mg l}^{-1}$ , followed by incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ . Subculture and culture medium was BHI broth (Biomérieux).

### 2.2. Survival of *L. monocytogenes* strains in synthetic gastric fluid in vitro

Firstly, in order to detect GAD activity of human asymptomatic carriage strains of *L. monocytogenes*, a preliminary study was carried accordingly to the method of Cotter et al. (2001) with the well-studied LO28, Scott A and EGD-e strains considered as reference strains. Briefly, overnight cultures grown in BHI at  $37^{\circ}\text{C}$  were pelleted by centrifugation (Eppendorf, Hamburg, Germany), resuspended in equal volumes of synthetic gastric fluids (8.3 g Proteose Peptone (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), 3.5 g D-glucose (Prolabo, Fontenay sous Bois, France), 2.05 g NaCl (Prolabo), 0.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Prolabo), 0.4 g  $\text{CaCl}_2$  (Prolabo), 0.37 g KCl (Prolabo), 0.1 g lysozyme (Prolabo), 50 mg porcine bile salts (Sigma), and 13.3 mg pepsin (Sigma) per liter of distilled water adjusted to pH 2.5 with 1N HCl) prewarmed at  $37^{\circ}\text{C}$ . To assess protective effect of glutamate, 10 mM of monosodium glutamate (Sigma) were added to synthetic gastric fluid before pH adjustment. Sensitivity of the strains to synthetic gastric fluid with and without addition of monosodium glutamate was monitored by removing samples at 15-min intervals during 60 minutes. The CFU values for viable bacteria were determined by plating suitable dilutions of the samples onto BHI agar.

**Table 1.** Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains used in this study

<i>L.monocytogenes</i> isolates	Origin	Serogroup
<b>Human fecal isolates</b>		
H1	Healthy pregnant carrier (Beaune, France, 1991)	1
H2	Healthy 3-year infant (Beaune, France, 1992)	4
H6	Healthy 30-year women (Beaune, France, 1991)	
H11	Healthy 35-year man (Beaune, France, 1992)	1
H17	Healthy 10-year infant (Beaune, France, 1992)	
H27	Healthy 2-year infant (Beaune, France, 1994)	4
H28	Healthy 7 year infant (Beaune, France, 1994)	1
H31	Healthy 55-year man (Beaune, France, 1995)	1
H32	Healthy 19-year women (Beaune, France, 1996)	1
H34	Healthy 8-year infant (Beaune, France, 1997)	1
H35	Healthy 11-year infant (Beaune, France, 1997)	1
H38	Healthy carrier (Beaune, France, date not communicated)	
LO28	Healthy pregnant carrier (Spain)	1/2c
<b>Animal fecal isolates</b>		
23	Rook feces (Besançon, France, 1995)	4
38	Rook feces (Besançon, France, 1995)	1
81	Rook feces (Besançon, France, 1995)	1
97	Rook feces (Besançon, France, 1995)	1
<b>Human oral isolate</b>		
H12	Healthy 39-year man (Beaune, France, 1991)	4
<b>Sporadic patients isolates</b>		
H3	Blood culture (Chalon/Saône, France, 1991)	1
H4	Blood culture (Beaune, France, 1992)	1
H5	Cephalorachid liquids (Chalon/Saône, France, 1991)	1
H8	Blood culture (Chalon/Saône, France, 1992)	1
H10	Peripheral swab (Chalon/Saône, France, 1991)	4
H13	Blood culture and cephalorachid liquids (Chalon/Saône, France, 1991)	4
H15	Blood culture (Rennes, France, 1992)	1
H16	Blood culture (Rennes, France, 1992)	1
H18	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	1/2b
H19	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4b
H21	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4
H22	Blood culture (Strasbourg, France, 1992)	4b
H23	Liver (Strasbourg, France, 1992)	1
H24	Placenta (Strasbourg, France, 1992)	4b
H25	Placenta (Strasbourg, France, 1992)	1/2a
<b>Epidemic-associated strains</b>		
Scott A	Massachusetts milk outbreak (USA, 1983)	4b
H36	Epoisses cheese outbreak (France, 1999)	4b
EGD-e	Derivative strain of animal outbreak (England, 1924)	1/2a
<b>Food isolates</b>		
NV4	Minced beef (Limoges, France)	1/2a
NV5	Minced beef (Limoges, France)	1/2c
NV7	Bovine carcass (Limoges, France)	1/2c
NV8	Bovine carcass (Limoges, France)	1/2a
1 F	Cheese (Dijon, France, 1990)	1/2a
2 F	Cheese (Dijon, France, 1990)	1/2a
7 F	Cheese (Dijon, France, 1990)	3b
<b>Environmental isolates</b>		
1 E	Machine of an industrial cheese-making plant (Dijon, France, 1990)	1/2b
3 E	Sink of an industrial cheese-making plant (Dijon, France, 1990)	1/2b
6 E	Wall of an industrial cheese-making plant (Dijon, France, 1990)	1/2a
1 S	Brine (Dijon, France, 1990)	1/2a
2 S	Brine (Dijon, France, 1990)	1/2a
3 S	Brine (Dijon, France, 1990)	1/2a
C9	Compost (Dijon, France, 2002)	nd

Secondly, in order to ease the monitoring of differences between human asymptomatic carriage strains, survival was carried out for 120 min with gastric fluids adjusted to pH 3.5. Results are means of triplicate independent experiments.

### 2.3. Glutamate decarboxylase activity assay

All 50 strains were tested in a rapid colorimetric assay using bromocresol green as pH indicator as described by Cotter et al. (2001). Volumes (1 ml) of overnight culture in BHI were centrifuged (Eppendorf), washed in 0,9 % NaCl solution and resuspended in 0.5 ml of test solution (1 g L-glutamic acid (Sigma), 0.3 ml Triton X-100 (Prolabo), 90 g NaCl and 0.05 g bromocresol green (Sigma) in 1 l of distilled water adjusted to pH 4). No change in yellow color after 4 h incubation at 37°C was considered as a negative result for GAD activity. Development of a green or blue colour was considered as low or high activity respectively. Three independent experiments were done for each strain tested.

### 2.4. Porcine Bile Salts tolerance

Overnight cultures (carriage, clinical, food and environmental isolates) grown in BHI were patched onto BHI agar plates supplemented with 1% (wt/vol) of porcine bile salts (Sigma). Plates were incubated for 48 h at 37°C, observed for growth and for the development of zones of bile salts degradation around colonies. Isolates were grouped into 4 activity classes based on the diameter of the degradation zone: no detectable activity; low activity (zone of up to 8 mm); medium activity (zone of up to 10 mm); high activity (zone of up to 12 mm) according to activity classes described by Franz et al. (2001). Initial size of the colonies was 4.5 mm.

### 2.5. Bile salt hydrolase activity

*L. monocytogenes* strains were screened for BSH activity by adapting the methods of Franz et al. (2001) and Dussurget et al. (2002). Colonies grown on BHI agar plates were patched onto BSH screening medium which consisted of Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar medium (Difco) supplemented with 0.37 g l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (Sigma) and 0.5% (wt/vol) glycodeoxycholic acid (Larodan AB, Malmö, Sweden). Plates were incubated anaerobically at 37°C for 5 days. BSH activity was present when deoxycholic acid precipitated in the agar medium below and around a colony.

## 2.6. Extraction of genomic DNA

Overnight cultures of each strain grown in BHI broth were harvested in 0.4 ml buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8] [Euromedex, Mundolsheim, France], 25 mM EDTA [Euromedex], 2% [wt/vol] glucose, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  RNase [Eurogentec, Angers, France], 3  $\text{mg ml}^{-1}$  lysozyme [Euromedex]). The mixture was incubated for 60 min at 37°C. One hundred microliters of 10% (wt/vol) SDS solution (Euromedex) were added and the mixture was incubated for 10 min at 60°C. Before undergoing phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) (Sigma) extraction, 125  $\mu\text{l}$  of 5M NaClO<sub>4</sub> (Sigma) were added. After centrifugation, DNA was precipitated by addition of isopropanol (Sigma); samples were then centrifuged (Eppendorf), and the pellets resuspended in 30  $\mu\text{l}$  of ultrapure water (Fisher Scientific, Elancourt, France).

## 2.7. Analysis of sequence variation of the PrfA DNA binding site upstream of the *bsh* gene by PCR

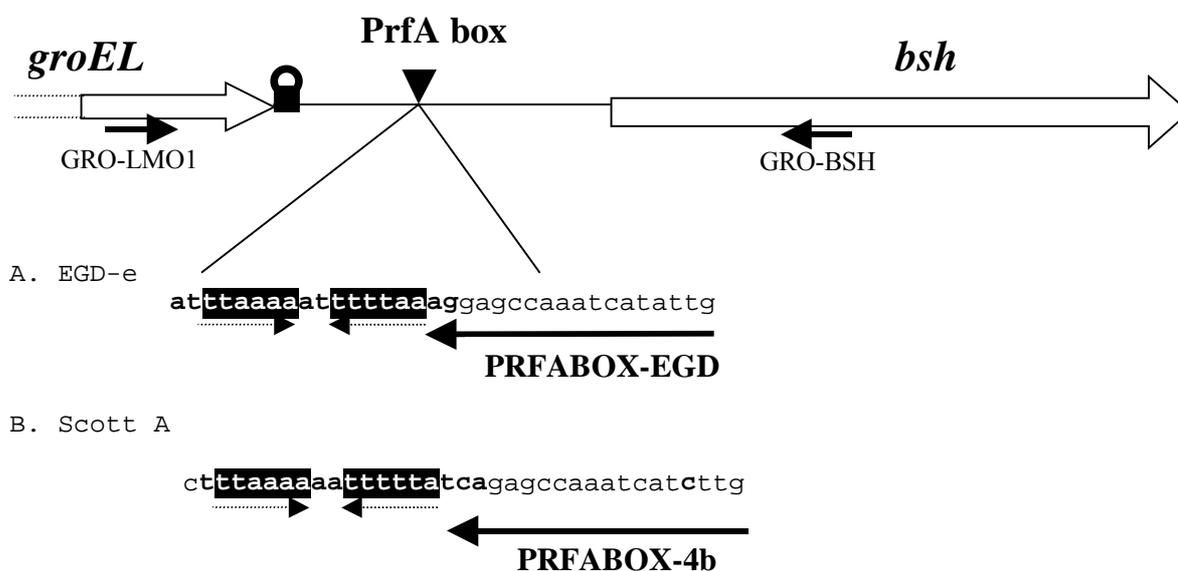
Presence of *bsh* gene was assessed in all strains by PCR amplification with primers GRO-LMO1 and GRO-BSH (Table 2). Comparison of the *bsh* promoter of the sequence of strains EGD-e (Imo2067, Glaser et al., 2001) and a representative strain of serotype 4b (Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org>) revealed differences in the PrfA box upstream *bsh* (Fig 1.). The sequence of the serotype 4b strains was found to be 5'-TAAAAAATTTTAA-3' whereas the perfect palindromic sequence identified by Dussurget et al. (2002) for EGD-e strain was 5'-TTAAAAATTTTAA-3'. The two different types of PrfA DNA binding site were screened by using GRO-LMO1 as universal forward primer and reverse primers PRFABOX-EGD or PRFABOX-4b (Table 2), which were able to amplify the PrfA DNA binding site of EGD-e or 4b sequenced strains, respectively. Amplification of *inlA* gene with primers seq01 and seq02 (Olier et al., 2002) was considered as positive control of amplification (Table 2).

PCR was performed in a reaction volume of 20  $\mu\text{l}$  containing 40 ng of *L. monocytogenes* target DNA; 1x Taq polymerase buffer (QBiogene, Illkirch, France); 10  $\mu\text{M}$  of each deoxynucleoside triphosphate (dATP, dTTP, dCTP, and dGTP; Qbiogene); 0.1  $\mu\text{M}$  of each primer; and 0.4 U of AmpliTaq polymerase (Qbiogene). PCR was carried out in a i-Cycler thermocycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) run for 30 cycles (94°C for 45 s, 57°C for 1 min, and 72°C for 1min 50 s with a final extension at 72°C for 7 min). After amplification, 10  $\mu\text{l}$  of each PCR product was analysed by agarose gel (2%) electrophoresis in Tris-Acetate-EDTA buffer, stained with ethidium bromure and examined by UV transillumination using Gel Doc 2000 system (Bio-Rad).

**Table 2.** PCR primers used in this study.

Primer	Sequence (5' to 3')	PCR product size
GRO-LMO1	TGAACGCTTGAAACACGAAG	832 bp with GRO-BSH
GRO-BSH	CAGTAGCGCATTGACCAAGA	832 bp with GRO-LMO1
PRFABOX-EGD	CAATATGATTTGGCTCCTT <sup>a</sup>	383 bp with GRO-LMO1
PRFABOX-4b	CAAGATGATTTGGCTCTGA <sup>a</sup>	383 bp with GRO-LMO1
Seq01	AATCTAGCACCCACGTTCTGGG	733 bp with Seq02
Seq02	TGTGACCTTCTTTTACGGGC	733 bp with Seq01

a. base changes between sequences of EGD-e and 4b strains (change in bold)



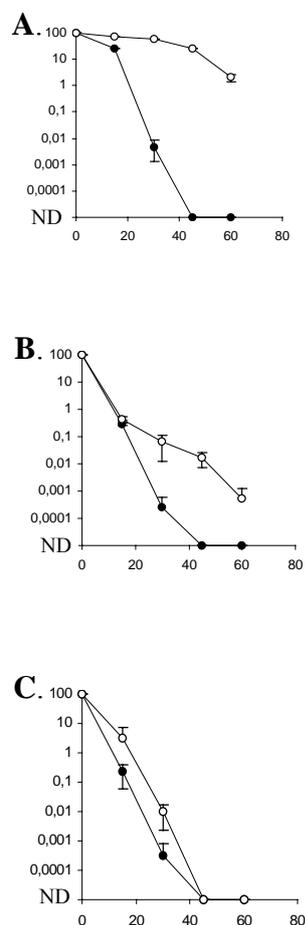
**Fig. 1.** Graphic representation of the genomic organisation of the *bsh* gene region. Hollow arrows indicate gene orientation, solid arrows indicate primers orientation and dotted arrows indicate palindromes of the putative PrfA box. Hairpins depict putative terminators. The black triangle shows the putative PrfA box. A. Promotor sequence regulated by PrfA activator of EGD-e strain and primer sequence (PRFABOX-EGD) used for amplification of this type of promotor. B. Promotor sequence regulated by PrfA activator of 4b strain and primer sequence (PRFABOX-4b) used for amplification of this type of promotor.

### 3. Results and discussion

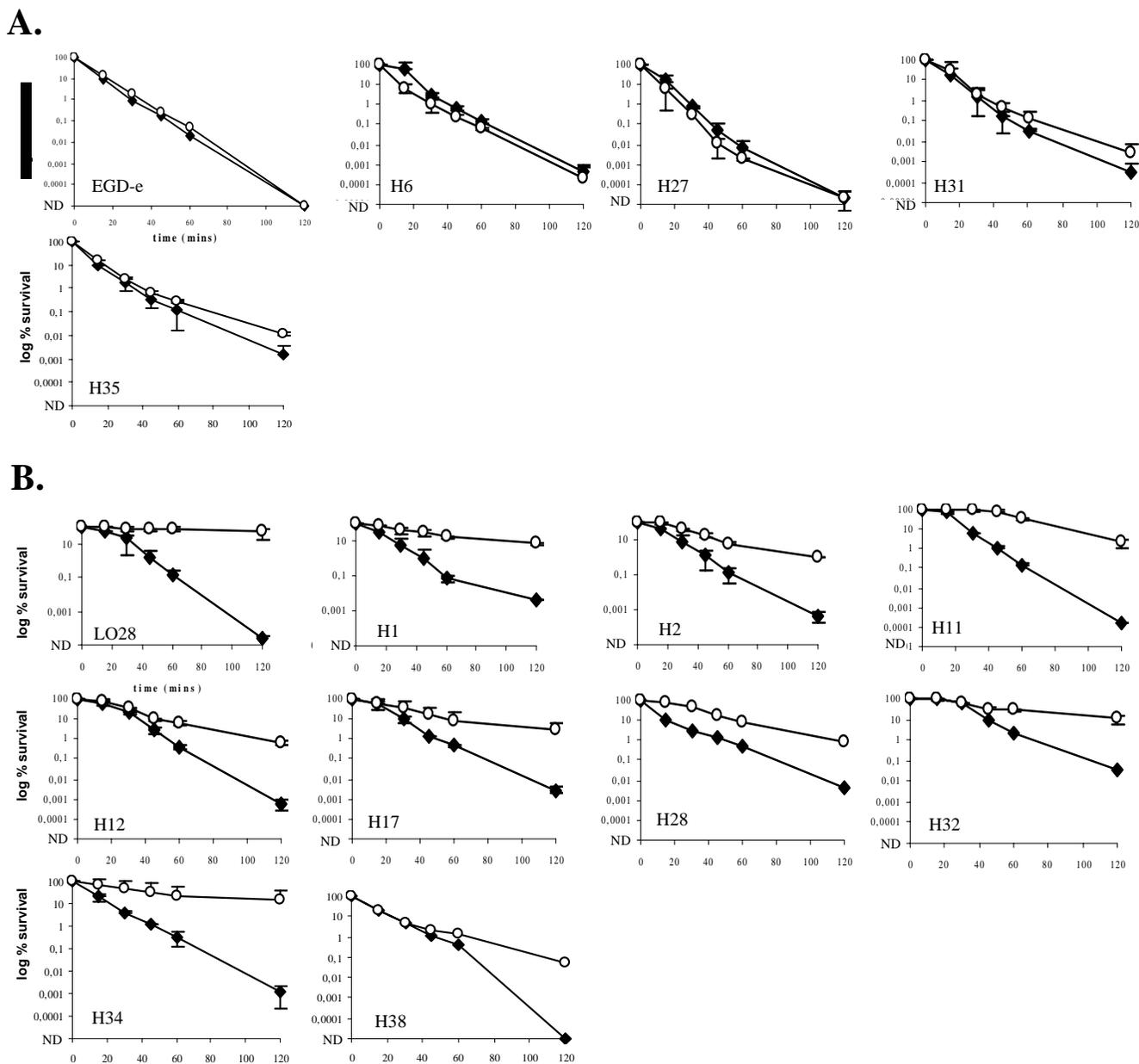
#### 3.1. Survival in synthetic gastric fluids in vitro

By using gastric fluids adjusted to pH 2.5 in the presence and the absence of 10 mM glutamate (Fig. 2), LO28 reference strain was inactivated within less than 50 min (kill of over 7 logs) without glutamate, whereas in the presence of glutamate (10 mM) less than 1 log decrease was observed within 50 min. This protection offered by glutamate reflects GAD activity (Cotter et al., 2001). Furthermore, we confirmed that GAD activity is subject to strain variation. Indeed, GAD activity of Scott A was moderate compared to LO28 pattern and acid resistance in presence of free glutamate did not occur for EGD-e strain. These levels of GAD activity are in accordance with those described by Cotter et al. (2001) but in our experiments, resistance towards synthetic gastric fluids in presence of glutamate was generally lower.

By increasing pH to 3.5 and time of exposition to 120 minutes, differences in survival kinetics between human asymptomatic carriage strains were improved (Fig. 3). Without addition of monosodium glutamate, EGD-e, LO28, H27 and H38 were the most gastric fluid-sensitive strains (kill of over 7 logs within 120 min), whereas H1, H17, H28, H32, H34 and H35 were the most gastric fluid-resistant strains (kill of approximately 3.5 to 4.5 logs within 120 min). Survival of 4 out of the 14 human carriage strains was not improved in presence of glutamate (Fig. 3A) while H1, H2, H11, H12, H17, H28, H32, H34 and H38 exhibited GAD activity (Fig. 3B). The highest protective effect of glutamate was observed with strains LO28 and H34. Considering that free glutamate is largely encountered in food and sometimes deliberately added in food manufacture for flavor enhancement (usually between 0,1 and 0,8%), Cotter et al. (2001) suggested that expression of GAD by *L. monocytogenes* could be critical to overcome the human stomach barrier leading to infection of the small intestine. Considering that fecal carriage by human may reflect intestinal persistence, it can be postulated that for the majority of fecal carriage strains efficient GAD system was a favoring factor for reaching the intestine. However, presence of human fecal carriage strains as strains H6, H27, H31 and H35 with no apparent GAD activity suggest that high GAD activity is not compulsory for overcoming the stomach barrier and remind us that presence of pathogens in the human gastrointestinal tract is probably multifactorial. Similarly, these GAD negative strains were average gastric juice-resistant strains.



**Fig. 2.** Survival of reference *L. monocytogenes* strains in synthetic human gastric fluids (pH 2.5) in the presence (open symbols) and absence (closed symbols) of 10 mM monosodium glutamate. A. LO28 strain with high GAD activity. B. Scott A strain with moderate GAD activity. C. EGD-e strain with low GAD activity. Error bars represent standard deviations from the mean of triplicate experiments. Data points on x-axis correspond to survival not being detected (ND).



**Fig. 3.** Survival of human carriage *L.monocytogenes* strains in synthetic human gastric fluids (pH 3.5) in the presence (open symbols) or absence (closed symbols) of 10 mM monosodium glutamate. A. Strains similar to EGD-e with low GAD activity. B. Strains with GAD activity (similar to LO28). Error bars represent standard deviations from the mean of triplicate experiments. Data points on x-axis correspond to survival not being detected (ND)

3.2. Assessment of the glutamate decarboxylase activity of human carriage isolates in comparison to clinical, food and environmental isolates of *L. monocytogenes*

pH increase associated with GAD activity was determined by color change of the bromocresol green indicator (Table 3). This qualitative assay confirmed results observed in gastric fluids with and without glutamate and 3 levels of GAD activity were found. Human carriage strains for which presence of glutamate had little or no effect on their acid-resistance in gastric fluids were grouped here in classes with no (H6, H27 and H31) or low GAD activity (H35). All human carriage strains that had enhance survival in synthetic gastric fluids in presence of glutamate also had GAD activity. Among these GAD positive strains, H28 and H32 exhibited the lowest GAD activities. Interestingly, the three strains showing low GAD activity belonged to the most gastric juice-resistant strains (without glutamate) at pH 3.5. The 4 animal carriage strains that had already encountered low pH of the bird's stomach, showed high GAD activity.

Using initial pH 4 in this qualitative assay, reference epidemic strain Scott A exhibited high GAD activity, whereas EGD-e, as previously observed at pH 2,5 and 3,5 in gastric fluids, was not able to raise the pH of its environment. High GAD activity was observed for most of the clinical strains (11 strains). However, 2 out of 18 strains had low activity and 5 out of 18 strains had no detectable activity. Epidemic episode with strains such as EGD-e (the derivative strain of animal outbreak) and H36 (isolated during Epoisses cheese human outbreak) in spite of the absence of GAD activity could be explained by consumption of foodstuff highly contaminated. In fact, mice infection has been observed following intragastric inoculation of EGD-e with doses of approximately  $10^9$  bacteria (Barbour et al., 1996; Marco et al., 1997; Barbour et al., 2001; Lecuit et al., 2001; Czuprynski and Faith, 2002) and the DL50 value was  $10^{11}$  bacteria after oral infection of guinea-pigs (Lecuit et al., 2001). Furthermore, infection with these strains that did not have detectable GAD activity, could be favored in patients with abnormally high gastric pH. Indeed, Czuprynski et al. (2002) showed that neutralization of gastric pH could enhance infectivity in mice. From these observations, it appears that strains carried asymptotically by humans and animal had similar ability to use monosodium glutamate as acid resistance system in comparison to clinical isolates.

**Table 3.** Glutamate decarboxylase activity of human carriage isolates, clinical isolates, food and environmental isolates of *L. monocytogenes*.

Origin of isolates	Activity class		
	No detectable activity (n=16)	Low activity (n=9)	High activity (n=25)
<b>Human carriage isolates</b> (n=14)	H6	H28	<b>LO28</b>
	H27	H32	H1
	H31	H35	H2
			H11
			H12
			H17
			H34
			H38
			23
			38
<b>Animal carriage isolates</b> (n=4)			81
			97
<b>Sporadic and outbreak isolates</b> (n=18)	<b>EGD-e</b>	H4	<b>Scott A</b>
	H18	H10	H3
	H23		H5
	H25		H8
	H36		H13
			H15
			H16
			H19
			H21
		H22	
		H24	
<b>Food isolates</b> (n=7)	NV4	1F	2F
	NV5	7F	
	NV7		
	NV8		
<b>Environmental isolates</b> (n=7)	1E	2S	C9
	3E	3S	
	6E		
	1S		

Conversely, among the 14 food and environmental isolates, 8 strains had no detectable GAD activity and 4 had low activity. Interestingly, strains with no or low GAD activities were isolated from food and food-processing plant, whereas only one strain from food origin (2F) showed high GAD activity. Proportion of food associated strains with high GAD activity (1 out 13) is low in comparison to strains isolated from human (19 out 31). This observation suggests that GAD acidity resistance system was also an adaptative advantage for growth within foods and particularly acidic foods, to overcome the stomach barrier and pass to the intestine. However, isolation of *L. monocytogenes* strains with no GAD activity from healthy human carrier suggest that some strains with no GAD activity could pass from environmental niches such as foodstuff and food plant environment to the human gut reservoir.

### 3.3. Bile salts tolerance

Bile salts resistance was determined by plating bacteria onto BHI agar plates supplemented with 1% porcine bile salts (Table 4). All strains tested grew even at high porcine bile salts concentration (2%). Colonies were surrounded by light zones of bile salts degradation. The degradation zone was strain dependent. No degradation was observed with strains H13, NV7 and 6E. *L. monocytogenes* Scott A produced the largest zone (12 mm), whereas the other epidemic reference strain EGD-e exhibited zone with diameter considered as low (5.5 mm). Similarly, growth of strain EGD-e was lower than Scott A in BHI broth supplemented with 1% bile salts. Compared to growth in BHI broth, final cell number in presence of bile salts was 1.18-log-unit lower for EGD-e strain, while the decrease was only 0.34-log-unit for strain Scott A. Growth was still observed in BHI broth supplemented with 5% bile salts even with strains with low zones of bile salts degradation (data not shown). Interestingly, while we observed an inherent ability to tolerate high concentrations of bile salts, King et al. (2003) recently observed that addition of only 0,3 % bile salts appeared to have a deleterious effect on the exponential and stationary cells of both Scott A strain and three other isolates of *L. monocytogenes* isolated from food and environment. These discrepancies between these results could be explained by experimental differences concerning growth conditions such as broth, atmosphere and pH used. For example, as observed by Begley et al. (2002), growth in the presence of some specific bile acids is strongly pH dependent; we observed that in BHI broth supplemented with 1% bile salts, growth was observed at pH 7.4 but at pH 6.5, the pH used in the bile broth system used by King et al. (2003), strain Scott A did not grow in our study.

Reference human carriage strain LO28 produced zones with intermediate size (9 mm). These levels reflected well bile tolerance observed by Begley et al. (2002) and suggested that size of the bile salts degradation zones reflected bile salts tolerance. Nineteen strains belonged to LO28 group of strain, 17 strains behaved similarly to *L. monocytogenes* EGD-e and 9 strains behaved similarly to *L. monocytogenes* Scott A. However no relationship was observed between level of activity and origin of isolates.

All strains isolated from feces of healthy humans in this study were able to growth in presence of bile salts concentrations relevant to concentrations encountered *in vivo* in human intestinal lumen (0.2 to 2%) but this was also true with all the other strains. Similarly, human and animal isolates (asymptomatic carriage and clinical) did not exhibit any particular bile salts degradation abilities in comparison to these observed for food and environmental isolates.

**Table 4.** Degradation of porcine bile salts on BHI agar plates containing 1% porcine bile salts by carriage, clinical and environmental isolates of *L. monocytogenes*. Classes are based on diameter of bile salts degradation zones.

Origin of isolates	Activity class			
	No detectable activity (n=2)	Low activity (n=17)	Medium activity (n=20)	High activity (n=10)
<b>Human carriage isolates</b> (n=14)		H1 H31 H34 H38	<b>LO28</b> H11 H17 H27 H28 H32	H2 H6 H12 H35
<b>Animal carriage isolates</b> (n=4)		38 81 97		23
<b>Clinical isolates</b> (n=18)	H13	<b>EGD-e</b> H3 H4 H5 H8 H15 H16	H10 H18 H19 H22 H23 H25 H36	<b>Scott A</b> H21 H24
<b>Food isolates</b> (n=7)	NV7	NV4 NV8	NV5 1F 2F 7F	
<b>Environmental isolates</b> (n=7)	6E	3S	1S 2S C9	1E 3E

### 3.4. Bile salt hydrolase activity

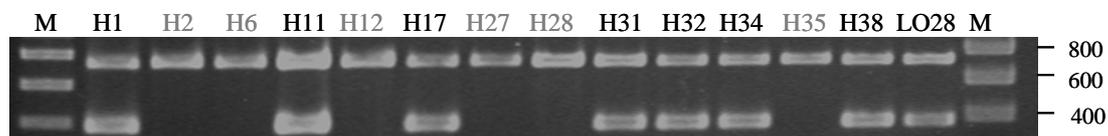
Considering that BSH activity is currently screened for commensal bacteria of the gastrointestinal tract (De Boever and Verstraete, 1999; Kociubinski et al., 1999; De Boever et al., 2000; Franz et al., 2001; Knarreborg et al., 2002), it was interesting to assess BSH activities of strains carried asymptotically by humans in comparison to BSH activities of clinical, food and environmental isolates. Unfortunately, growth of *L. monocytogenes* on MRS agar was subjected to strain variation and did not allow quantitative comparison of BSH activity between strains. Then, pH drop due to cell metabolism resulted in growth inhibition of the most pH sensitive strains in this medium thus preventing observation of any precipitate. Similarly use of agar medium (MRS or BHI) previously adjusted to pH 6.8 did not support growth in presence of glycodeoxycholic acid as previously observed by Begley et al. (2002). Nevertheless, all 50 strains tested were positive for BSH activity.

### 3.5. Analysis of sequence variation of the PrfA DNA binding site upstream *bsh* gene by PCR

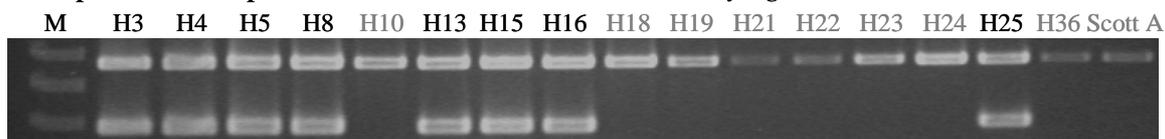
Comparative analysis of *bsh* gene of the sequenced strains EGD-e (Glaser et al., 2001) and Scott A (Institute for Genomic Research) showed that BSH proteins had 99% identity. However differences in putative PrfA DNA binding site upstream *bsh* was observed. Primers were designed in order to compare these variations (Fig 1.) and allowed classification of strains on the basis of their PCR products with primer sequence similar to EGD-e (Fig 4A, B and C) or similar to Scott A (Fig 4D). Among the 14 isolates carried asymptotically by humans, 8 strains were closely related to EGD-e and 6 similar to Scott A strain. Among the 16 other clinical strains, 8 were closely related to EGD-e and 8 were closely related to Scott A strain. Among the 18 food and environmental strains, 14 were closely related to EGD-e and 4 were closely related to Scott A strain. Based on the strains with known serotype, primer PRFABOX-4b allowed amplification of the target in serotype 1/2 b and 4b strains, and primer PRFABOX-EGD allowed amplification of the target in serotype 1/2a, 1/2c and 3b strains. There was no relation between origin of strains and type of putative PrfA boxes.

Several authors have already shown that variation in the PrfA box could determine the level of expression of some virulence genes such as *hly* and *mpl* (Sheehan et al., 1995; Williams et al., 2000). However, expression of some other genes of the PrfA regulon such as *inlA*, *actA* and *plcB* were only partially dependent on PrfA and could depend on additional factors. Taken into account that semi-quantitative analysis of the BSH activity was not possible in this study, comparison between sequences within putative PrfA binding sites and BSH activity for each strain was not possible. Interestingly, a recent transcriptome analysis revealed that upregulation of *bsh* gene by PrfA was twice higher for a serotype 4b strain (P14) and was 10,3 higher for EGD-e in BHI broth (Milohanic et al., 2003). In our experiments, strains that produced no or small zones in the presence of 1% bile salts on BHI-agar plates had putative PrfA binding site similar to those of EGD-e and strains that produced high zone of bile salts degradation had putative PrfA binding site similar to these of Scott A, suggesting effectively that promotor of the *bsh* gene of strains such as Scott A could allow higher activation than these of strains such as EGD-e. Nevertheless, the link between bile salt degradation and the level of BSH activity may not be straight forward because BSH is only the first identified factor involved in bile salts degradation and additional unknown activities could be involved. Relationship between ability in bile salts degradation and polymorphism of the promotor of *bsh* gene could correspond to general polymorphism between the genome of the two types of strains and so correspond to the relative polymorphism for the other putative genes involved in bile salts degradation.

A. Human carriage isolates of *L. monocytogenes*



B. Epidemic and sporadic associated isolates of *L. monocytogenes*



C. Environmental isolates of *L. monocytogenes*



D. Isolates of *L. monocytogenes* that tested negative for the PrfA box similar to EGD-e strain



**Fig. 4.** Agarose gel electrophoresis showing the distribution of PrfA box types (EGD-e type or 4b type; 383 bp) among *L.monocytogenes* strains from different sources and the amplification of their *inlA* gene (control; 733 bp). Gels A, B and C contained amplification products obtained from the primers GRO-LMO1, PRFABOX-EGD, Seq01 and Seq02. Gel D contained amplification products obtained from the primers GRO-LMO1, PRFABOX-4b, Seq01 and Seq02. M, molecular size marker.

The present study provides important data on the variations in response towards acid and bile salts stress among *L. monocytogenes* wild strains from different origins. Bile salts resistance is not specific to isolates carried asymptotically by humans, since all *L. monocytogenes* strains tested were able to grow in presence of 5% bile salts. Although the levels of response observed did not correlate with their origin (asymptomatic carriers, patients with listeriosis, food and environment), the higher levels of GAD activity were observed mainly for strains isolated from human or rook and suggested that these strains are acid resistant in presence of glutamate. These observations are consistent with those of Dykes and Moorhead (2000), who hypothesized that gut passage is likely to select for acid resistant strains from food origin. Some of these strains with high GAD activity had the higher bile salts degradation ability too (Scott A, H2, H12, H21, H24, 23). Interestingly, ability to tolerate low pH and bile salts, are properties that, in addition to adhesion to intestinal surfaces, relates to commensal and probiotic microorganisms (Jacobsen et al., 1999; Kimoto et al., 1999).

### Acknowledgements

We wish to thank Aurélie Demontrond for technical assistance. This work was supported by the french Ministère de la Recherche et de l'enseignement.

### References

- Barbour, A.H., Rampling, A., Hormaeche, C.E., 1996. Comparison of the infectivity of isolates of *Listeria monocytogenes* following intragastric and intravenous inoculation in mice. *Microbial Pathogenesis* 20, 247-253.
- Barbour, A.H., Rampling, A., Hormaeche, C.E., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity* 69, 4657-4660.
- Begley, M., C., H., Gahan, C.G.M., 2003. Identification and disruption of *btlA*, a locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 218, 31-38.
- Begley, M., Gahan, G.M., Hill, C., 2002. Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6005-6012.
- Bojsen-Moller, J., 1972. Human listeriosis. Dignostic, epidemiological and clinical studies. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica [B][Suppl.]* 229, 72-92.
- Briones, V., Blanco, M.M., Marco, A., Prats, N., Fernandez-Garayzabal, J.F., Suarez, G., Domingo, M., Dominguez, L., 1992. Biliary excretion as possible origin of *Listeria monocytogenes* in fecal carriers. *American Journal of Veterinary Research* 53, 191-193.
- Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, E., Vindel, E., Rocourt, J., 1993. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human,

- animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *Journal of Food Protection* 56, 296-301.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G., Hill, C., 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1 -AtPase operon in the acid tolerance response. *International Journal of Food Microbiology* 60, 137-146.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G., Hill, C., 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology* 40, 465-475.
- Cotter, P.D., O'reilly, K., Hill, C., 2001. Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH food. *Journal of Food Protection* 64, 1362-1368.
- Czuprynski, C.J., Faith, N.G., 2002. Sodium bicarbonate enhances the severity of infection in neutropenic mice orally inoculated with *Listeria monocytogenes* EGD. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 477-481.
- De Boever, P., Verstraete, W., 1999. Bile salt deconjugation by *Lactobacillus plantarum* 80 and its implication for bacterial toxicity. *Journal of Applied Bacteriology* 87, 345-352.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, L., Verstraete, W., 2000. Protective effect of bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53, 709-714.
- Del Corral, F., Buchanan, R.L., Bencivengo, M.M., Cooke, P.H., 1990. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *Journal of Food Protection* 53, 1003-1009.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., the European Listeria Genome, Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P., 2002. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular Microbiology* 45, 1095-1106.
- Dykes, G.A., Moorhead, S.M., 2000. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *International Journal of Food Microbiology* 56, 161-166.
- Franz, C.M.A.P., I, S., Haberer, P., Holzappel, H., 2001. Bile salt hydrolase activity of *Enterococci* isolated from food: screening and quantitative determination. *Journal of Food Protection* 64, 725-729.
- Glaser, P. *et al.*, 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849-852.
- Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen, M., 1999. Screening of probiotic activities for forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4949-4956.
- King, T., Ferenci, T., Szabo, E.A., 2003. The effect of growth atmosphere on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive exposure to acid, proteolytic enzymes and bile salts. *International Journal of Food Microbiology* 84, 133-143.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S., Okamoto, T., 1999. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology* 29, 313-316.
- Knarreborg, A., Engberg, R.M., Jensen, S.K., Jensen, B.B., 2002. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6425-6428.
- Kociubinski, G., Pérez, P., De Antoni, G., 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection* 62, 905-912.

- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., Cossart, P., 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292, 1722-1725.
- Marco, A.J., Altimira, J., Prats, N., Lopez, S., Dominguez, L., Domingo, M., Briones, V., 1997. Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microbial Pathogenesis* 23, 255-263.
- Milohanic, E., Glase, P., Coppee, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P., Buchrieser, C., 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology* 47, 1613-1625.
- Norrung, B., Andersen, J.K., 2000. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 30, 228-232.
- Olier, M., Pierre, F., Lemaître, J.P., Divies, C., Rousset, A., Guzzo, J., 2002. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology* 148, 1855-1862.
- Olier, M., Pierre, F., Rousseaux, S., Lemaitre, J.-P., Rousset, A., Piveteau, P., Guzzo, J., 2003. Expression of truncated Internalin is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans. *Infection and Immunity* 71, 1217-1224.
- Rousset, A., Lemaître, J. P., Delcourt, A., 1994. Research of *Listeria monocytogenes* from different sites (fecal, genital, and oropharyngeal secretions). *Médecine et Maladies Infectieuses* 1994, 1174-1179.
- Schlech, W.F., 3rd, 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 England Journal of Medicine* 308, 203-206.
- Schlech, W.F., 3rd, 1984. New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. *Clinical Investigation in Medicine* 7, 321-324.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., Cossart, P., 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *Journal of Bacteriology* 177, 6469-6476.
- Small, P.L.C. and Waterman, S.R., 1998. Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* 6, 214-216.
- Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P., Velge, P., 1998. Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Applied Microbiology* 85, 337-346.
- Weber, A., Potel, J., Schäfer-Schmidt, R., Prell, A., Datzmann, C., 1995. Investigation on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. *Zentralblatt und Hygiene* 198, 117-123.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L., Batt, C.A., 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity* 65, 2707-2716.
- Williams, J.R., Thayyullathil, C., Freitag, N.E., 2000. Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *Journal of Bacteriology* 182, 837-841.

## **Discussion et perspectives**

Personne n'est encore en mesure de prévoir précisément le risque lié à la contamination de l'aliment par *Listeria monocytogenes*. Deux raisons principales peuvent être avancées : premièrement, il est difficile pour les industriels de garantir l'absence de *L. monocytogenes* dans tous les produits alimentaires et la dose infectieuse, mal connue, demeure un des facteurs du déclenchement de l'infection. Ensuite, en fonction de l'hôte, l'ingestion du pathogène n'entraîne pas pour autant systématiquement l'infection. Certes le terrain rencontré chez l'hôte est un élément important puisque classiquement les personnes immunodéprimées sont considérées comme les personnes les plus exposées. Cependant, l'apparition de bouffées épidémiques liées à des souches principalement de sérotype 4b et 1/2b suggère que des clones particuliers sont plus virulents (Herd & Kocks, 2001).

L'analyse du risque lié au portage asymptomatique du pathogène chez l'hôte est à l'inverse restée peu étudiée. C'est dans ce contexte que nous avons voulu au cours de cette étude connaître le comportement de souches de portage asymptomatique isolées chez l'Homme, en comparaison de souches d'origine diverse, dans des situations où la souche peut exprimer ses capacités invasives, et sous l'influence de stress acides ou en présence de sels biliaires.

Lors de cette étude, il apparaît une grande diversité aussi bien au niveau du caractère invasif, de l'expression de InlA qu'au niveau de la capacité des souches à survivre en milieu acide ou en présence de sels biliaires. Cette variabilité de réponse face à l'hôte comme face au stress, a permis d'expliquer au moins en partie les raisons du portage et pourrait être une des premières explications de la fréquence relativement faible de cas de listériose en comparaison du nombre de bactéries ingérées quotidiennement (Notermans *et al.*, 1998). Ces caractères communs aux souches ayant peu de chance d'initier le cycle infectieux chez l'Homme ont été étudiés au cours de ces travaux de thèse :

## **1. Evaluation des capacités invasives des isolats de *Listeria monocytogenes***

### **1.1. L'incidence de InlA sur la virulence**

L'évaluation des capacités invasives des souches de portage asymptomatique a permis de mettre en évidence un premier marqueur responsable de la diminution de bactéries internalisées dans les cellules Caco-2 pour 5 souches de portage asymptomatique (LO28, H1, H17, H32 et H34) parmi les 14 souches étudiées. Ainsi, la production de InlA de masse moléculaire inférieure à 80 kDa serait responsable des capacités réduites de ces souches à

entrer dans la cellule hôte au niveau intestinal (articles 1 et 2). Compte tenu de la corrélation complète entre les masses moléculaires de InlA et les capacités invasives de l'ensemble des 37 souches testées *in vitro* (article 3), il est fort probable que les différences observées dans le modèle *in vivo* soient réellement liées à l'interaction entre InlA et la E-cadhérine du poulet. Cependant, de manière à montrer sans équivoque que la production d'une InlA tronquée est le facteur unique responsable de l'atténuation de la virulence observée *in vivo* et *in vitro*, il sera important de réaliser le remplacement du gène *inlA* déficient sur le chromosome, afin de vérifier le rétablissement du caractère invasif. Cette démarche est actuellement en cours.

Ces résultats peuvent être corrélés à ceux du groupe de D. E. Briles pour *Streptococcus pneumoniae* (Balachandran *et al.*, 2002). Ces auteurs ont montré que la délétion de 2 gènes impliqués dans le phénotype invasif de *S. pneumoniae* (*pspA* et *ply*) leur permettait d'obtenir une souche effectivement moins invasive et qui induisait un portage plus fréquent. Ces auteurs suggèrent que des souches fortement invasives stimulent davantage le système immunitaire et l'inflammation qui y est associée, ce qui entraînerait une élimination rapide du pathogène par le système immunitaire lorsque l'infection est maîtrisée.

De notre étude, nous n'avons cependant pas d'éléments permettant de montrer que la production d'une forme tronquée de InlA chez *L. monocytogenes* constitue un avantage adaptatif pour persister dans l'intestin. Le modèle œuf embryonné qui est adapté pour l'identification des souches InlA tronquées pourra être avantageusement associé à une inoculation orale d'un autre modèle animal (cobaye ou souris transgénique exprimant une E-cadhérine compatible) afin de statuer sur la colonisation, la persistance intestinale de ces souches en comparaison de souches les plus invasives.

Cependant pour l'étude de la persistance et la colonisation, l'estimation de la durée du portage intestinal par l'évaluation de la présence du microorganisme dans les fèces n'est pas suffisante. Elle reste en effet toujours problématique car nous ne savons pas dans quelle mesure le contenu des fèces reflète le contenu intestinal. Des méthodologies plus lourdes comme des prélèvements de contenus intestinaux à partir des différentes régions de l'intestin seraient intéressants pour suivre ce portage au cours du temps.

A l'inverse, les raisons expliquant la virulence atténuée des souches de portage produisant la protéine InlA complète du groupe B (H28, H31, H35) et du groupe C (H6 et H11) sur l'œuf embryonné de poulet n'ont pas été identifiées (article 2) : En effet, ces souches possèdent les activités enzymatiques associées à la virulence comme LLO, Pi-PLC et Pc-PLC. Ensuite, l'analyse de la production de InlB par Western-blot a permis de vérifier sa présence et la taille de la protéine. Enfin, par l'infection de la lignée humaine Caco-2, nous avons pu constater que ces souches avaient des capacités d'adhésion, d'invasion et de dissémination intercellulaire comparables à celles des souches responsables de listérioses chez l'Homme, ce qui sous-entend que les autres facteurs du cycle intracellulaire (comme ActA) sont fonctionnels. Par conséquent, le tropisme d'hôte est une hypothèse qui peut expliquer l'atténuation de leur virulence chez l'embryon de poulet : d'autres facteurs de virulence déficients chez ces souches peuvent être nécessaires à l'infection de l'embryon de poulet mais inutile pour infecter l'Homme. Il est donc difficile de statuer sur leur réel potentiel infectieux pour l'Homme. L'inverse peut être vrai pour les souches pathogènes pour l'œuf embryonné (H2, H12, H27 et H38 ; groupe A), mais compte tenu que toutes les souches issues de cas de listériose chez l'Homme sont virulentes pour l'œuf embryonné de poulet (hormis H5 pour laquelle la virulence est faiblement atténuée), cette hypothèse paraît peu convaincante.

## 12. L'origine des souches produisant une InlA tronquée

L'analyse de la production de InlA parmi des souches isolées d'autres origines telles que les fèces d'oiseau, l'environnement (compost, prélèvements de surface en industrie alimentaire) et les produits alimentaires, a montré que la fréquence de ce phénotype dans l'intestin humain n'était finalement pas spécifique à ce réservoir, mais réellement le reflet de la présence de ce type de souches dans notre alimentation (article 3). En effet, les 10 souches alimentaires testées produisent une forme tronquée de InlA. La comparaison des séquences du gène *inlA* des souches concernées a permis de déceler des régions où le polymorphisme est élevé et que des mutations ponctuelles entraînaient l'apparition de codons stop prématurés. L'analyse sur les souches ayant des séquences partielles du gène *inlA* strictement identiques (H1, H32 et H34 pour les souches d'origine humaine et 1F, 7F, 1S et 2S pour les souches d'origine alimentaire : fromage et saumure) a permis d'établir qu'il s'agissait chacune de souches différentes d'après leur profil en RAPD (résultats non montrés). Compte tenu de l'origine diverse des prélèvements contenant des souches produisant une InlA de 47 kDa, ces résultats suggèrent qu'une lignée évolutive de souches produisant une InlA de 47 kDa

a émergé et se maintient par sa persistance au moins dans plusieurs réservoirs du cycle de transmission de *L. monocytogenes*.

### 13. Hypothèses sur l'incidence et les conséquences de l'ingestion de souches produisant une forme tronquée de InlA chez l'Homme

La fréquence de ce type de souches potentiellement non invasives dans l'aliment pourrait donc expliquer au moins en partie l'incidence relativement faible de cas de listérioses en proportion de la fréquence estimée de *L. monocytogenes* ingérées. En effet, en France, une personne serait exposée 7,8 fois par an à au moins 100 micro-organismes/g d'aliment d'après le rapport de la commission *Listeria* de l'AFSSA (2000). En conséquence, cette étude suggère que le risque lié à l'ingestion d'aliments contaminés par des souches réellement pathogènes de *L. monocytogenes* est actuellement surévalué.

Bien qu'aucune des souches responsables de listériose chez l'Homme ne produisait une protéine InlA tronquée dans cette étude, il faudrait cependant s'assurer de l'innocuité des souches de *L. monocytogenes* produisant une forme tronquée de InlA pour l'Homme, de manière à pouvoir affirmer que leur ingestion n'est pas risquée. Ce type d'étude a déjà été réalisé sur l'Homme par l'ingestion d'une souche de *L. monocytogenes* délétée pour les gènes *actA* et *plcB*. Les volontaires n'ont pas développé de signes cliniques apparents (fièvre, diarrhées ou septicémies) et la souche a pu être isolée dans les fèces pendant 3 à 4 jours (Angelakopoulos *et al.*, 2002).

A l'inverse, il serait intéressant de savoir si parmi les cas de listériose recensés, certaines listérioses pouvaient être liées à la présence d'une souche produisant une forme tronquée de InlA.

Concernant l'analyse de l'effet de souches à virulence atténuée sur le système immunitaire, les travaux du groupe de J. J. Cebra (Manohar *et al.*, 2001) et du groupe de S. Notermans (Chakraborty *et al.*, 1994) ont montré que suite à l'inoculation orale de la souris, des mutants de *L. monocytogenes* déficients pour la synthèse de ActA avaient une virulence atténuée liée à l'absence de dissémination du mutant de cellule à cellule. Ces souches pouvaient coloniser l'appareil digestif de souris gnotobiotiques et en parallèle stimuler le système GALT aboutissant à la production d'IgA sécrétoires (Manohar *et al.*, 2001) et procuraient une protection qui pourraient être suffisante pour éviter l'infection liée à l'inoculation de souches plus virulentes (Chakraborty *et al.*, 1994). Cependant,

cette stimulation du système GALT n'a pas été observée lors de l'étude réalisée chez l'Homme (Angelakopoulos *et al.*, 2002). Les auteurs suggèrent cependant que l'induction du système GALT soit fonction du mode d'entrée du pathogène dans les cellules M des plaques de Peyer, et que ce site d'entrée ne serait pas préférentiellement utilisé par *L. monocytogenes* puisque leur mutant actA<sup>-</sup>/plcB<sup>-</sup> pouvait tout de même entrer directement dans l'entérocyte via l'interaction entre la E-cadhérine et InlA.

D'après ces observations, nous pouvons donc envisager que des souches à virulence atténuée par la forme tronquée de InlA (souche de portage de type H1), et par leur faible capacité à entrer dans la cellule épithéliale, puissent par contre induire la production d'IgA sécrétoires. Sachant que le temps de latence avant la production d'IgA spécifiquement dirigés contre *Listeria* serait assez longue chez la souris (21 à 59 jours après l'inoculation) (Manohar *et al.*, 2001), l'ingestion de la souche H1 pourrait même protéger l'hôte par la suite contre l'infection par des souches potentiellement virulentes (souche de portage de type H2). Ceci pourrait expliquer en partie la présence de souches potentiellement virulentes parmi les souches de portage asymptomatique (H2, H12, H27 et H38) et aussi encore une fois, à l'incidence relativement faible des cas de listériose en général.

D'autre part, les souches à virulence atténuée comme H1 produisent une InlA qui ne reste pas associée à la surface de la bactérie, mais qui a quand même la faculté d'interagir avec son récepteur eucaryote, la E-cadhérine humaine. Il sera important de savoir si cette forme relarguée de InlA dans l'environnement a la capacité de saturer un certain nombre de sites de fixation sur la cellule épithéliale *in vitro* et *in vivo* et empêcher, par un effet barrière par la compétition pour des cibles communes l'infection par d'autres souches virulentes. Dans un premier temps, cela pourra être vérifié *in vitro* en infectant des Caco-2 avec une souche virulente dans un milieu de culture enrichi en surnageant de culture de H1. Ce point est important car cela signifie que ces cellules eucaryotes portant à leur surface ce type d'Internaline A ne pourraient plus être infectées par une autre souche invasive. Par contre, cette hypothèse ne prend pas en compte le renouvellement constant des cellules intestinales *in vivo*. Cependant, il n'en reste pas moins que l'ingestion de telles souches pourrait donc avoir un effet plutôt bénéfique pour l'Homme.

Compte tenu que l'interaction entre la cellule eucaryote et la bactérie résulte de la synthèse des 2 intervenants (InlA et E-cadhérine), un résonnement inverse nous a amené à rechercher dans la littérature s'il existait des personnes produisant des E-cadhérines mutées au niveau du site critique pour l'interaction avec InlA. Ces personnes pourraient alors être naturellement résistantes à l'infection induite par *L. monocytogenes*. Des mutations ont été décrites tout le long de la séquence de la E-cadhérine et certaines pourraient être localisées dans la région ciblée par InlA. Majoritairement, les cas décrits concernent des personnes génétiquement prédisposées à un cancer gastrique (Guilford *et al.*, 1998 ; Chun *et al.*, 2001). Le groupe de P. J. Guilford (da Silva Tatley *et al.*, 2003) s'intéressait aussi à cette hypothèse et l'a abordé du côté de la cellule hôte, alors que de notre côté, nous nous sommes intéressés à la bactérie (article 2). Ces auteurs ont démontré que l'utilisation d'une lignée cellulaire ayant la particularité de produire la E-cadhérine humaine sous forme sécrétée (lignée Kato III) permettait d'inhiber l'internalisation de *L. monocytogenes* qui restait liée à la E-cadhérine soluble dans le milieu extracellulaire. Ces auteurs soulignent aussi le fait que la présence de nombreux facteurs de virulence bactériens et la réponse inflammatoire qu'ils peuvent engendrer, stimule la production de métalloprotéases. Ces métalloprotéases ont la faculté de cliver la E-cadhérine pour laquelle un fragment de 80 kDa est relargué, ce qui libèrerait le domaine de liaison à InlA dans la lumière intestinale et pourrait inhiber la traversée de la barrière intestinale par *L. monocytogenes*. Des investigations dans cette direction pourraient se révéler prometteuses.

## **2. Evaluation des capacités de réponse au stress acide et aux sels biliaires du soucier**

Les capacités de survie des souches de portage dans un environnement simulant celui rencontré dans l'appareil digestif ont été investies. En présence de glutamate dans le milieu, les souches de portage fécal (isolées chez l'Homme et chez la corneille) comme les souches cliniques résistent particulièrement bien à l'acidité du milieu simulant les fluides gastriques, contrairement aux souches d'origine alimentaire. Ce mécanisme de résistance lié à l'activité glutamate décarboxylase (GAD) paraît donc être un avantage adaptatif nécessaire à la survie du pathogène pour atteindre l'intestin. Ces résultats soulèvent le problème lié à la présence et parfois l'ajout délibéré du glutamate dans beaucoup de produits alimentaires pour rehausser leur saveur. En effet, les doses rencontrées sont généralement suffisantes pour permettre l'activation de la GAD (dès 0,22 mM) (Cotter *et al.*, 2001b). Cependant, l'activité GAD n'a

pas pu être détectée pour certaines souches de portages (H6, H27 et H31). Il serait intéressant de vérifier la présence des gènes constitutifs du système. S'ils sont présents, il sera utile d'étudier les conditions dans lesquelles ils sont transcrits et traduits. Cependant, d'autres éléments extérieurs sont à prendre en considération comme la nature de l'aliment qui a véhiculé ces souches ou l'activation d'autres systèmes de résistance à l'acidité. Par exemple, il a été montré chez le primate que la survie de *L. monocytogenes* dans l'appareil digestif de primates est favorisée lorsque l'aliment contaminé est riche en graisses (Smith *et al.*, 2003).

Cette étude nous a montré que peu de souches d'origine alimentaire possédaient un niveau d'activité GAD comparable à celui observé pour les souches de portage fécal et les souches cliniques. En conséquence, la majorité de ces souches alimentaires n'atteindraient pas l'intestin, ce qui suggère que l'activité GAD est un système de protection essentiel contre le pH acide de l'estomac en présence de glutamate. En conclusion, l'activation du système GAD est un élément qui caractérise les souches capables d'atteindre l'intestin et sur cette base, peu de souches ingérées via notre alimentation en seraient capables, ce qui limite les risques consécutifs d'infection par ces souches isolées de l'aliment.

Contrairement à l'activité GAD, la résistance aux sels biliaires rencontrés dans l'intestin grêle apparaît présente au sein du soucier testé. De plus, toutes les souches sont capables de déconjuguer l'acide glycodéoxycholique par l'intermédiaire de l'activité de la BSH. Il a été montré que cette activité est un avantage pour la persistance du pathogène dans la lumière intestinale de *L. monocytogenes* et qu'elle diffère en fonction des sérotypes (Dussurget *et al.*, 2002). Nous n'avons pas pu mettre en évidence de niveaux d'activité en fonction de l'origine des souches mais par contre les souches de sérotype 1/2b et 4b du soucier avaient des capacités de dégradation des sels biliaires globalement supérieures aux souches de sérotype 1/2a, 1/2c ou 3b. De même, le nombre de cellules finales obtenues après croissance en présence de sels biliaires (jusqu'à 5%) à 37°C est supérieur pour Scott A (4b) par rapport à EGD-e (1/2a).

Cette résistance particulière des souches de sérotype 4b par rapport aux souches de sérotype 1/2a s'ajoute aux autres capacités spécifiques à ce sérotype décrites dans la littérature, comme la survie après des modifications brutales de la température (4°C à 60°C), des temps de latences plus courts pour la reprise de croissance à 37°C et des niveaux de virulence globalement plus élevés (Buncic *et al.*, 2001).

D'après ces observations, et compte tenu que la majorité des cas de listériose sont associés à des sérotype 1/2b et 4b, nous confirmons donc qu'une attention particulière devrait être apportée principalement à ces sérotypes pour les souches isolées de l'aliment.

### 3. La relation entre la réponse au stress et la virulence

Du point de vue du génome, les groupes de souches obtenus sur la base du polymorphisme de la fraction variable du gène *inlA* (article 3), sont retrouvés au niveau du polymorphisme observé au niveau du primer utilisé pour amplifier la région contenant la boîte PrfA putative située en amont du gène *bsh* (article 4).

Ainsi, sur la base du polymorphisme de la portion de gène *inlA* étudiée dans l'article 3, les 37 souches étudiées se répartissaient au sein de 5 profils (A, B, C, D et E). Les souches appartenant aux profils A, C, D et E sont regroupées au sein du groupe de souches dont l'amorce PRFABOX-EGD amplifie le promoteur de *bsh* de type EGD-e. De même, toutes les souches du profil B pour *inlA* ont une région promotrice de type Scott A amplifiée par l'amorce PRFABOX-4b. Cette corrélation suggère l'existence de 2 grandes lignées évolutives de *L. monocytogenes* (l'une comportant des souches de type Scott A et l'autre des souches proches de EGD-e).

Un autre aspect pourrait être envisagé concernant la relation entre le stress et la virulence. Il a été montré chez plusieurs microorganismes pathogènes du genre *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* ou encore *Vibrio* que les sels biliaires étaient impliqués dans la régulation de facteurs de virulence (Gunn, 2000). Cette relation apparaît complexe car en fonction des microorganismes, les sels biliaires inhibent ou stimulent la synthèse de facteurs de virulence. Chez *L. monocytogenes*, la BSH est régulée au moins en partie par PrfA, ce qui suggère que là encore les deux mécanismes soient liés. La BSH est aussi utile pour la persistance dans la lumière intestinale, cependant l'effet des sels biliaires sur les capacités invasives de *L. monocytogenes* dans la cellule épithéliale intestinale n'a jamais été envisagé. Sachant que les sels biliaires ont des propriétés communes avec les détergents, il se peut que par un effet mécanique, les protéines associées à l'enveloppe bactérienne soient relarguées dans le milieu comme en présence de SDS, et que l'internalisation de la bactérie dans la cellule hôte soit modifiée. De même, il serait intéressant de mesurer l'effet des sels biliaires sur la transcription des gènes de virulence, de manière à savoir si dans la portion de l'intestin

où les sels biliaires sont présents, *L. monocytogenes* est plutôt destinée à rester à l'état de portage asymptomatique ou stimulée pour infecter l'hôte.

Enfin, une analyse plus globale, complémentaire à l'approche présentée, pourrait permettre de cibler à plus grande échelle les traits spécifiques des souches de portage asymptomatique vis à vis des souches responsables de listériose chez l'Homme ou encore des souches d'origine alimentaire. Une analyse préliminaire du protéome des protéines associées à l'enveloppe pariétale et synthétisées lors de la croissance de H1, H2, Scott A et LO28 dans du bouillon BHI a montré de nombreuses différences. De manière plus systématique, l'analyse globale du génome par l'utilisation de filtres à haute densité pourrait permettre de cibler des gènes plus spécifiques (éventuellement en fonction des sérotypes) et l'analyse du transcriptome permettrait de déterminer les niveaux d'expression des gènes. C'est une voie qui commence à être exploitée et qui a permis notamment d'observer de nouveau un lien entre le stress et la virulence : par rapport aux souches EGD-e et P14 (de sérotype 4b comme Scott A) déficientes pour PrfA, le nombre de transcrits issus du gène *bsh* est deux fois élevé pour la souche de sérotype EGD-e (PrfA+) et le ratio est de 10,3 pour P14 (PrfA+) (Milohanic *et al.*, 2003).

En conclusion, il apparaît que bien que *L. monocytogenes* soit souvent ingérée et généralement bien équipée pour infecter l'hôte, plusieurs paramètres identifiés au cours de ces travaux permettent de penser que les risques de listériose sont a priori faibles. Premièrement, la grande majorité des souches ingérées ne sont pas généralement les mieux adaptées pour résister à l'acidité du pH de l'estomac. Ensuite, pour celles qui arrivent dans l'intestin, les sels biliaires pourraient limiter leurs capacités invasives lorsque celles-ci ne sont pas déjà amoindries par la production d'une forme tronquée de InlA. Enfin, la listériose reste exceptionnelle pour une personne dont le système immunitaire est performant malgré des taux de portage asymptomatique relativement élevés (2 à 10% de la population générale)(Schlech, 2000). Même si les réponses avancées permettent d'apporter des éléments expliquant la faible virulence de la majorité des souches ingérées, et aussi des éléments expliquant le portage, la persistance de ce portage reste cependant à entreprendre.

## **Références bibliographiques**

## A

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**, 1-14.
- Angelakopoulos, H., Loock, K., Sisul, D. M., Jensen, E. R., Miller, J. F. & Hohmann, E. L. (2002). Safety and Shedding of an Attenuated Strain of *Listeria monocytogenes* with a Deletion of *actA/plcB* in Adult Volunteers: a Dose Escalation Study of Oral Inoculation. *Infect Immun* **70**, 3592-3601.
- Angelidis, A. & Smith, G. M. (2003). Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1013-1022.
- Augustin, J. C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L. & Carlier, V. (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1706-1710.
- Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. & Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* **342**, 1236-1241.
- Autio, T., Lunden, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Bjorkroth, J., Sjoberg, A. M. & Korkeala, H. (2002). Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *Int J Food Microbiol* **77**, 83-90.
- Autret, N., Dubail, I., Trieu-Cuot, P., Berche, P. & Charbit, A. (2001). Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* **69**, 2054-2065.
- Avery, S. M. & Buncic, S. (1997). Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37 degrees C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol* **34**, 319-327.

## B

- Balachandran, P., Brooks-Walter, A., Virolainen-Julkunen, A., Hollingshead, S. K. & Briles, D. E. (2002). Role of Pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **70**, 2526-2534.
- Bannam, T. & Goldfine, H. (1999). Mutagenesis of active-site histidines of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on enzyme activity and biological function. *Infect Immun* **67**, 182-186.
- Barbour, A. H., Rampling, A. & Hormaeche, C. E. (1996). Comparison of the infectivity of isolates of *Listeria monocytogenes* following intragastric and intravenous inoculation in mice. *Microb Pathog* **20**, 247-253.
- Barbour, A. H., Rampling, A. & Hormaeche, C. E. (2001). Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun* **69**, 4657-4660.
- Basher, H. A., Fowler, D. R., Rodgers, F. G., Seaman, A. & Woodbine, M. (1984). Pathogenicity of natural and experimental listeriosis in newly hatched chicks. *Res Vet Sci* **36**, 76-80.
- Basher, H. A., Seaman, A. & Woodbine, M. (1983). Infection, haemorrhagia and death of chick embryos experimentally inoculated with *Listeria monocytogenes* by the intra-allantoic route. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Set A* **255**, 239-246.
- Bayles, D. O. & Wilkinson, B. J. (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 23-27.
- Beauregard, K. E., Lee, K. D., Collier, R. J. & Swanson, J. A. (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **186**, 1159-1163.
- Becker, L. A., Cetin, M. S., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. (1998). Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J Bacteriol* **180**, 4547-4554.
- Becker, L. A., Evans, S. N., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. (2000). Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J Bacteriol* **182**, 7083-7087.
- Begley, M., Gahan, C. G. M. & Hill, C. (2002). Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance. *Appl Environ Microbiol* **68**, 6005-6012.
- Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. G. M. (2003). Identification and disruption of *btlA*, a locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 31-38.
- Behari, J. & Youngman, P. (1998). A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol* **180**, 6316-6324.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S. & Goebel, W. (2002). InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* **43**, 557-570.
- Berthelot, F., Beaumont, C., Mompert, F., Girard-Santosuosso, O., Pardon, P. & Duchet-Suchaux, M. (1998). Estimated heritability of the resistance to cecal carrier state of *Salmonella enteritidis* in chickens. *Poult Sci* **77**, 797-801.
- Bierne, H., Dramsi, S., Gratacap, M. P., Randriamampita, C., Carpenter, G., Payrastre, B. & Cossart, P. (2000). The invasion protein InlB from *Listeria monocytogenes* activates PLC- gamma1 downstream from PI 3-kinase. *Cell Microbiol* **2**, 465-476.
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H. L. & Cossart, P. (2001). A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J Cell Biol* **155**, 101-112.
- Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Portillo, F. G., Schneewind, O. & Cossart, P. (2002). Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* **43**, 869-881.
- Blackman, I. & Frank, J. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *J Food Protect* **59**, 827-831.

- Bockmann, R., Dickneite, C., Goebel, W. & Bohne, J. (2000).** PrfA mediates specific binding of RNA polymerase of *Listeria monocytogenes* to PrfA-dependent virulence gene promoters resulting in a transcriptionally active complex. *Mol Microbiol* **36**, 487-497.
- Bockmann, R., Dickneite, C., Middendorf, B., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1996).** Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol Microbiol* **22**, 643-653.
- Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., Bannerman, E., Bille, J. & Jemmi, T. (1997).** Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1338-1343.
- Bohne, J., Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1994).** Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **11**, 1141-1150.
- Bojsen-Moller, J. (1972).** Human listeriosis. Diagnostic, epidemiological and clinical studies. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol Immunol Suppl*, 1-157.
- Borezee, E., Pellegrini, E. & Berche, P. (2000).** OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect Immun* **68**, 7069-7077.
- Borezee, E., Pellegrini, E., Beretti, J. L. & Berche, P. (2001).** SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **147**, 2913-2923.
- Bouttier, S., Ntasama, C., Bellon-fontaine, M.-N. & Fourniat, J. (1996).** Rôle des interactions physico-chimiques dans l'adhésion initiale à la viande de *Listeria innocua*. In *Adhésion des microorganismes aux surface, biofilms-nettoyage-désinfection*. Edited by B.-F. M.-N. F. J.: Lavoisier Techniques et Documentation.
- Braun, L. & Cossart, P. (2000).** Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* **2**, 803-811.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G. & Cossart, P. (1997).** InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* **25**, 285-294.
- Braun, L., Ghebrehivet, B. & Cossart, P. (2000).** gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **19**, 1458-1466.
- Braun, L., Nato, F., Payrastré, B., Mazie, J. C. & Cossart, P. (1999).** The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol* **34**, 10-23.
- Braun, L., Ohayon, H. & Cossart, P. (1998).** The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* **27**, 1077-1087.
- Brehm, K., Ripio, M. T., Kreft, J. & Vazquez-Boland, J. A. (1999).** The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J Bacteriol* **181**, 5024-5032.
- Briones, V., Blanco, M. M., Marco, A., Prats, N., Fernandez-Garayzabal, J. F., Suarez, G., Domingo, M. & Dominguez, L. (1992).** Biliary excretion as possible origin of *Listeria monocytogenes* in fecal carriers. *Am J Vet Res* **53**, 191-193.
- Brosch, R., Buchrieser, C. & Rocourt, J. (1991).** Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res Microbiol* **142**, 667-675.
- Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, E., Vindel, E. & Rocourt, J. (1993).** Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J Food Protect* **56**, 296-301.
- Brosch, R., Chen, J. & Luchansky, J. B. (1994).** Pulsed-field fingerprinting of *listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2584-2592.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., consortium, T. L., Kunst, F., Cossart, P. & Glaser, P. (2003).** Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1470**, 1-7.
- Buddington, K. K., Donahoo, J. B. & Buddington, R. K. (2002).** Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *J Nutr* **132**, 472-477.
- Bula, C. J., Bille, J. & Glauser, M. P. (1995).** An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin Infect Dis* **20**, 66-72.
- Buncic, S. & Avery, S. M. (1996).** Relationship between variations in pathogenicity and log phase at 37 degrees C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 degrees C. *Lett Appl Microbiol* **23**, 18-22.
- Buncic, S., Avery, S. M. & Rogers, A. R. (1996).** Listeriolysin O production and pathogenicity of non-growing *Listeria monocytogenes* stored at refrigeration temperature. *Int J Food Microbiol* **31**, 133-147.
- Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J. & Dimitrijevic, M. (2001).** Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int J Food Microbiol* **65**, 201-212.

## C

- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L. & Cossart, P. (2002).** Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* **10**, 238-245.
- Cai, S. & Wiedmann, M. (2001).** Characterization of the *prfA* virulence gene cluster insertion site in non-hemolytic *Listeria spp.*: probing the evolution of the *Listeria* virulence gene island. *Curr Microbiol* **43**, 271-277.
- Cai, S., Kabuki, D. Y., Kuaye, A. Y., Cargioli, T. G., Chung, M. S., Nielsen, R. & Wiedmann, M. (2002).** Rational design of DNA sequenced-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **40**, 3319-3325.
- Cameron, B. J. & Douglas, L. J. (1996).** Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for candida albicans. *Infect Immun* **64**, 891-896.

- Cameron, L. A., Footer, M. J., van Oudenaarden, A. & Theriot, J. A. (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4908-4913.
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* **69** (suppl), 1046S-1051S.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Wehland, J., Dufrenne, J. & Notermans, S. (1994). Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **10**, 1-10.
- Chasseignaux, E., Gerault, P., Toquin, M. T., Salvat, G., Colin, P. & Ermel, G. (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol Lett* **210**, 271-275.
- Chasseignaux, E., Toquin, M. T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P. & Ermel, G. (2001). Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J Appl Microbiol* **91**, 888-899.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuis, J., Goebel, W. & Vazquez-Boland, J. A. (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 431-436.
- Chun, Y. S., Lindor, N. M., Smyrk, T. C., Petersen, B. T., Burgart, L. J., Guilford, P. J. & Donohue, J. H. (2001). Germline E-cadherin gene mutations. *Cancer* **92**, 181-187.
- Cocconnier, M. H., Dliissi, E., Robard, M., Laboisie, C. L., Gaillard, J. L. & Servin, A. L. (1998). *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through action of listeriolysin O. *Infect Immun* **66**, 3673-3681.
- Coffey, A., Rombouts, F. M. & Abee, T. (1996). Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1252-1256.
- Cole, A. M., Dewan, P. & Ganz, T. (1999). Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun* **67**, 3267-3275.
- Collins, M. D. & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches formulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* **69**(suppl), 1052S-1057S.
- Collins, M. D., Wallbanks, S., Lane, D. J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M. & Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 240-246.
- Conte, M. P., Longhi, C., Petrone, G., Polidoro, M., Valenti, P. & Seganti, L. (2000a). Modulation of *actA* gene expression in *Listeria monocytogenes* by iron. *J Med Microbiol* **49**, 681-683.
- Conte, M. P., Longhi, C., Polidoro, M., Petrone, G., Buonfiglio, V., Di Santo, S., Papi, E., Seganti, L., Visca, P. & Valenti, P. (1996). Iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect Immun* **64**, 3925-3929.
- Conte, M. P., Petrone, G., Di Biase, A. M., Ammendolia, M. G., Superti, F. & Seganti, L. (2000b). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage-like cells. *Microb Pathog* **29**, 137-144.
- Cossart, P. & Bierne, H. (2001). The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Immunol* **13**, 96-103.
- Cossart, P. & Jonquières, R. (2000). Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5013-5015.
- Cossart, P. & Lecuit, M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J* **17**, 3797-3806.
- Cossart, P. (2000). Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol* **2**, 195-205.
- Cossart, P., Pizarro-cerda, J. & Lecuit, M. (2003). Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes* to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* **13**, 23-31.
- Cotter, P. D., Emerson, N., Gahan, C. G. & Hill, C. (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two- component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **181**, 6840-6843.
- Cotter, P. D., Gahan, C. G. & Hill, C. (2000). Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* FOF1 -AtPase operon in the acid tolerance response. *Int J Food Microbiol* **60**, 137-146.
- Cotter, P. D., Gahan, C. G. & Hill, C. (2001a). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol Microbiol* **40**, 465-475.
- Cotter, P. D., Guinane, C. D. & Hill, C. (2002). The *Lis RK* signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. *Antimicrob Agents chemother* **46**, 2784-2790.
- Cotter, P. D., O'reilly, K. & Hill, C. (2001b). Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH food. *J Food Protect* **64**, 1362-1368.
- Cox, L. J., Kleiss, T., Cordier, J. L., Cordella, C., Konkol, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. & Siebenga, A. (1989). *Listeria spp.* in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* **6**, 49-61.
- Czuprynski, C. J. & Balish, E. (1981). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* for gnotobiotic rats. *Infect Immun* **32**, 323-331.
- Czuprynski, C. J. & Faith, N. G. (2002). Sodium bicarbonate enhances the severity of infection in neutropenic mice orally inoculated with *Listeria monocytogenes* EGD. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 477-481.

## D

- da Silva Tatley, F., Aldwell, F. E., Dunbier, A. K. & Guildford, P. J. (2003). N-terminal E-cadherin peptides act as a decoy receptors for *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **71**, 1580-1583.
- Dabiri, G. A., Sanger, J. M., Portnoy, D. A. & Southwick, F. S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6068-6072.
- Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E. & Griffin, P. M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* **336**, 100-105.
- Dancz, C. E., Haraga, A., Portnoy, D. A. & Higgins, D. E. (2002). Inducible control of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*: temporal requirement of Listeriolysin O during intracellular infection. *J Bacteriol* **184**, 5935-5945.
- Datta, A. R. & Kothary, M. H. (1993). Effects of glucose, growth temperature, and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3495-3497.
- Davis, M. J., Coote, P. J. & O'Byrne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* **142**, 2975-2982.
- De Boever, P. & Verstraete, W. (1999). Bile salt deconjugation by *Lactobacillus plantarum* 80 and its implication for bacterial toxicity. *J Appl Bacteriol* **87**, 345-352.
- De Boever, P., Wouters, R., Verchaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G. & Verstraete, W. (2000). Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt toxicity. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 709-714.
- De Smet, I., Van Hoorde, L., Vande Woestyne, M., Christiaens, H. & Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **79**, 292-301.
- Del Corral, F., Buchanan, R. L., Bencivengo, M. M. & Cooke, P. H. (1990). Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *J Food Protect* **53**, 1003-1009.
- Dickneite, C., Bockmann, R., Spory, A., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1998). Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol Microbiol* **27**, 915-928.
- Didierlaurent, A., Sirard, J.-C., Kraehenbuhl, J.-P. & Neutra, M. R. (2002). How the gut senses its content. *Cell Microbiol* **4**, 61-72.
- Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1997). Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect Immun* **65**, 101-109.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. & Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**, 251-261.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P. L. & Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* **65**, 1615-1625.
- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. & Cossart, P. (1993). Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator PrfA. *Mol Microbiol* **9**, 931-941.
- Drevets, D. A. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J Immunol* **158**, 5305-5313.
- Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P. & Labadie, J. (2002). Salt Stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1491-1498.
- Duchet-Suchaux, M., Mompert, F., Berthelot, F., Beaumont, C., Lechopier, P. & Pardon, P. (1997). Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* **41**, 559-567.
- Durst, J. & Zimanyi, M. (1976). The *Listeria monocytogenes* carrier state of the staff of maternity centres in non epidemic periods. *Zentralbl Bakteriol Sect A* **234**, 281-283.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Consortium, t. E. L. G., Buchrieser, C., Glaser, P. & Cossart, P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* **45**, 1095-1106.
- Dykes, G. A. & Moorhead, S. M. (2000). Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *Int J Food Microbiol* **56**, 161-166.

## E

- Edelson, B. T. & Unanue, E. R. (2000). Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol* **12**, 425-431.
- Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**, 823-837.
- Engelbrecht, F., Dominguez-Bernal, G., Hess, J., Dickneite, C., Greiffenberg, L., Lampidis, R., Raffelsbauer, D., Daniels, J. J., Kreft, J., Kaufmann, S. H., Vazquez-Boland, J. A. & Goebel, W. (1998). A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol Microbiol* **30**, 405-417.

- Ericsson, H., Stalhandske, P., Danielsson-Tham, M. L., Bannerman, E., Bille, J., Jacquet, C., Rocourt, J. & Tham, W. (1995).** Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3872-3874.
- Ericsson, H., Unnerstad, H., Mattsson, J. G., Danielsson-Tham, M. L. & Tham, W. (2000).** Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the *inlB* gene. *J Med Microbiol* **49**, 73-80.

## F

- Fabiani, G., Marsoin, J. & Cartier, F. (1976).** Recherche par coproculture des porteurs de *Listeria* chez les transplantés rénaux. Intéret épidémiologique et pathogénique. *Méd Mal Infect* **6**, 15-20.
- Facinelli, B., Giovanetti, E., Magi, G., Biavasco, F. & Varaldo, P. E. (1998).** Lectin reactivity and virulence among strains of *Listeria monocytogenes* determined in vitro using the enterocyte-like cell line Caco-2. *Microbiology* **144**, 109-118.
- Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991).** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**, 476-511.
- Fenlon, D. R. (1985).** Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J Appl Bacteriol* **59**, 537-543.
- Fenlon, D. R. (1999).** *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In *Listeria, listeriosis and food safety*, pp. 21-37. Edited by E. T. Ryser & E. H. Marth. New York Basel: Marcel Dekker, Inc.
- Ferreira, A., O'Byrne, C. P. & Boor, K. J. (2001).** Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4454-4457.
- Field, L. H., Headley, V. L., Underwood, J. L., Payne, S. M. & Berry, L. J. (1986).** The chicken embryo as a model for *Campylobacter* invasion: comparative virulence of human isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect Immun* **54**, 118-125.
- Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1996).** Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2416-2420.
- Fontan, E., Saklani-Jusforgues, H. & Goossens, P. L. (2001).** Early translocation of acid-adapted *Listeria monocytogenes* during enteric infection in TNF/LTalpha-/- mice. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 179-183.
- Franciosa, G., Tartaro, S., Wedell-Neergaard, C. & Aureli, P. (2001).** Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1793-1799.
- Francis, M. S. & Thomas, C. J. (1997).** Mutants in the CtpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog* **22**, 67-78.
- Franz, C. M. A. P., I, S., Haberer, P. & Holzapfel, H. (2001).** Bile salt hydrolase activity of *Enterococci* isolated from food: screening and quantitative determination. *J Food Protect* **64**, 725-729.
- Fraser, K. R. & O'Byrne, C. P. (2002).** Osmoprotection by carnitine in a *Listeria monocytogenes* mutant lacking the OpuC transporter: evidence for a low affinity carnitine uptake system. *FEMS Microbiol Lett* **211**, 189-194.
- Fraser, K. R., Harvie, D., Coote, P. J. & O'Byrne, C. P. (2000).** Identification and characterization of an ATP binding cassette L- carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4696-704.
- Friman, V., Nowrouzian, F., Adlerberth, I. & Wold, A. E. (2002).** Increased frequency of intestinal *Escherichia coli* carrying genes for S fimbriae and haemolysin in IgA-deficient individuals. *Microb Pathog* **32**, 35-42.
- Fujisawa, T. & Mori, M. (1994).** Evaluation of media for determining hemolytic activity and that of API *Listeria* system for identifying strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **32**, 1127-1129.

## G

- Gahan, C. G., O'Mahony, J. & Hill, C. (2001).** Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating in vivo expression. *Infect Immun* **69**, 3924-3932.
- Gaillard, J. L. & Finlay, B. B. (1996).** Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect Immun* **64**, 1299-1308.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991).** Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**, 1127-1141.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P. (1987).** In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55**, 2822-2829.
- Gaillot, O., Bregenholt, S., Jaubert, F., Di Santo, J. P. & Berche, P. (2001).** Stress-induced ClpP serine protease of *Listeria monocytogenes* is essential for induction of listeriolysin O-dependent protective immunity. *Infect Immun* **69**, 4938-4943.
- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S. & Berche, P. (2000).** The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**, 1286-1294.
- Garandeau, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Beretti, J. L., Berche, P. & Charbit, A. (2002).** The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infect Immun* **70**, 1382-1390.
- Gardan, R., Duché, O., Leroy-sétrin, S., Consortium, t. E. L. G. & Labadie, J. (2003).** Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in Osmotolerance. *Appl Environ Microbiol* **69**, 154-161.
- Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. (2000).** Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**, 999-1003.

- Geese, M., Loureiro, J. J., Bear, J. E., Wehland, J., Gertler, F. B. & Sechi, A. S. (2002). Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria* requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerisation. *Mol Biol Cell* **13**, 2383-2396.
- Gerstel, B., Grobe, L., Pistor, S., Chakraborty, T. & Wehland, J. (1996). The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins. *Infect Immun* **64**, 1929-1936.
- Gilot, P., Andre, P. & Content, J. (1999). *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infect Immun* **67**, 6698-6701.
- Gilot, P., Genicot, A. & Andre, P. (1996). Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. *J Clin Microbiol* **34**, 1007-1010.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Portillo, F. G., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., R Emmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J. & Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849-852.
- Goldfine, H., Knob, C., Alford, D. & Bentz, J. (1995). Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin O. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2979-2983.
- Gouin, E., Dehoux, P., Mengaud, J., Kocks, C. & Cossart, P. (1995). IactA of *Listeria ivanovii*, although distantly related to *Listeria monocytogenes* ActA, restores actin tail formation in an *L. monocytogenes* actA mutant. *Infect Immun* **63**, 2729-2737.
- Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, P., Dehaumont, P. & Veit, P. (1993). Epidémie de listériose en France. Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull Epidémiol Hebdom* **4**, 13-14.
- Graham, T., Golsteyn-Thomas, E. J., Gannon, V. P. & Thomas, J. E. (1996). Genus- and species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the 16S/23S intergenic spacer region of the rRNA operon. *Can J Microbiol* **42**, 1155-1162.
- Grant, M. A., Weagant, S. D. & Feng, P. (2001). Glutamate decarboxylase genes as a prescreening marker for detection of pathogenic *Escherichia coli* groups. *App Environ Microbiol* **67**, 3110-3114.
- Greenwood, M. & Hooper, W. L. (1987). Human carriage of *Yersinia* spp. *J Med Microbiol* **23**, 345-348.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Daniels, J. & Kuhn, M. (2000). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* **68**, 3275-3279.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M. & Kuhn, M. (1998). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun* **66**, 5260-5267.
- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A. & Reeve, A. E. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* **392**, 402-405.
- Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microb Infect* **2**, 907-913.
- Gupta, S. & Chowdhury, R. (1997). Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **65**, 1131-1134.
- ## H
- Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Hirano, H., Kamiya, S. & Yamamoto, T. (1999). The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones* **4**, 118-128.
- Hanawa, T., Kai, M., Kamiya, S. & Yamamoto, T. (2000). Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress Chaperones* **5**, 21-29.
- Hanawa, T., Yamamoto, T. & Kamiya, S. (1995). *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect Immun* **63**, 4595-4599.
- Herd, M. & Kocks, C. (2001). Gene fragments distinguishing an epidemic-associated strain from a virulent prototype strain of *Listeria monocytogenes* belong to a distinct functional subset of genes and partially cross-hybridize with other *Listeria* species. *Infect Immun* **69**, 3972-3979.
- Herler, M., Bubert, A., Goetz, M., Vega, Y., Vazquez-Boland, J. A. & Goebel, W. (2001). Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. *J Bacteriol* **183**, 5562-5570.
- Hof, H., Lampidis, R. & Bensch, J. (2000). Nosocomial *Listeria* gastroenteritis in a newborn, confirmed by random amplification of polymorphic DNA. *Clin Microbiol Infect* **6**, 683-686.
- Hof, H., Nichterlein, T. & Kretschmar, M. (1997). Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **10**, 345-357.
- Hu, L., Umeda, A., Kondo, S. & Amoko, K. (1995). Typing of *Saphylococcus aureus* colonising human nasal carriers by pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* **42**, 127-132.
- Huang, S. H., Stins, M. F. & Kim, K. S. (2000). Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* **2**, 1237-1244.
- Huang, S.-H. & Yong, A. Y. (2001). Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* **3**, 277-287.
- Huillet, E., Larpin, S., Pardon, P. & Berche, P. (1999). Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of *hly* expression. *FEMS Microbiol Lett* **174**, 265-272.

Hylemon, P. B. & Harder, J. (1999). Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 475-488.

## I

Iiver, D., Arnqvist, A., ögren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L. & Borén, T. (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**, 373-377.

Ireton, K., Payraastre, B. & Cossart, P. (1999). The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 17025-17032.

## J

Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M. & Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities for forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *App Environ Microbiol* **65**, 4949-4956.

Jeffers, G. T., Bruce, J. L., McDonough, P. L., Scarlett, J., Boor, K. J. & Wiedmann, M. (2001). Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* **147**, 1095-1104.

Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N. & Herman, L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 103-109.

Ji, G., Beavis, R. & Novick, R. P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptides variants. *Science* **276**, 2027-2030.

Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P. & Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **34**, 902-914.

Jonquieres, R., Bierne, H., Mengaud, J. & Cossart, P. (1998). The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect Immun* **66**, 3420-3422.

Jonquieres, R., Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. (2001). Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **42**, 955-965.

## K

Kallipolitis, B. H. & Ingmer, H. (2001). *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 111-115.

Kampelmacher, E. H. & van Noorle Jansen, L. M. (1972). Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zentralbl Bakteriol Sect.A* **221**, 70-77.

Kampelmacher, E. H., Huysinga, W. T. & van Noorle Jansen, L. M. (1972). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women and newborn infants. *Ned Tijdschr Geneesk* **116**, 1685-1687.

Kampelmacher, E. H., Maas, D. E. & van Noorle Jansen, L. M. (1976). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women with and without direct animal contact. *Zentralbl Bakteriol Sect. A* **234**, 238-242.

Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K. & Sameshima, T. (2002). Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii*. *App Environ Microbiol* **68**, 3830-3840.

Kelly, J., Barnass, S., Sawicka, E. & Dean, A. (1999). *Listeria meningitis* presenting in an immunocompetent adult patient. *Hosp Med* **60**, 140-141.

Kerouanton, A., Brisabois, A., Denoyer, E., Dilasser, F., Grout, J., Salvat, G. & Picard, B. (1998). Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **43**, 61-71.

Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N. M., Ohmomo, S. & Okamoto, T. (1999). *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett Appl Microbiol* **29**, 313-316.

Kingsley, R. A., Humphries, A. D., Weening, E. H., De Zoete, M. R., Winter, S., Papaconstantinopoulou, A., Dougan, G. & Bäumlér, A. J. (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype *thyphimurium*: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* **71**, 629-640.

Kluytmans, J., Van Belkum, A. & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews* **10**, 505-520.

Knarreborg, A., Engberg, R. M., Jensen, S. K. & Jensen, B. B. (2002). Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. *App Environ Microbiol* **68**, 6425-6428.

Ko, R. & Smith, L. T. (1999). Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4040-4048.

Kociubinski, G., Pérez, P. & De Antoni, G. (1999). Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Prot* **62**, 905-912.

Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**, 521-531.

Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1993). Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci* **105**, 699-710.

- Kocks, C., Marchand, J. B., Gouin, E., d'Hauteville, H., Sansonetti, P. J., Carlier, M. F. & Cossart, P. (1995).** The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol* **18**, 413-423.
- Kolstad, J., Caugant, D. A. & Rorvik, L. M. (1992).** Differentiation of *Listeria monocytogenes* isolates by using plasmid profiling and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Food Microbiol* **16**, 247-260.
- Kolstad, J., Rorvik, L. M. & Granum, P. E. (1991).** Characterization of plasmids from *Listeria* sp. *Int J Food Microbiol* **12**, 123-131.
- Kreft, J., Vazquez-Boland, J.-A., Altrock, S., Dominguez-Bernal, G. & Goebel, W. (2002).** Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**, 109-125.
- Krinos, C., High, A. S. & Rodgers, F. G. (1999).** Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol* **86**, 237-244.

## L

- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of a structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* **227**, 680-685.
- Lamont, R. J. & Postlethwaite, R. (1986).** Carriage of *Listeria monocytogenes* and related species in pregnant and non-pregnant women in Aberdeen, Scotland. *J Infect* **13**, 187-193.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirschhain, J. & Kemler, R. (1994).** E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8263-8267.
- Lasa, I., Gouin, E., Goethals, M., Vancompernelle, K., David, V., Vandekerckhove, J. & Cossart, P. (1997).** Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **16**, 1531-1540.
- Lauer, P., Theriot, J. A., Skoble, J., Welch, M. D. & Portnoy, D. A. (2001).** Systematic mutational analysis of the amino-terminal domain of the *Listeria monocytogenes* ActA protein reveals novel functions in actin-based motility. *Mol Microbiol* **42**, 1163-1177.
- Lebrun, M., Mengaud, J., Ohayon, H., Nato, F. & Cossart, P. (1996).** Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol Microbiol* **21**, 579-592.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaikin, M., Gumbiner, B. & Cossart, P. (1999).** A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**, 3956-3963.
- Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B. & Cossart, P. (2000).** A role for alpha- and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10008-10013.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. & Cossart, P. (1997).** Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* **65**, 5309-5319.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. & Cossart, P. (2001).** A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**, 1722-1725.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E. & Chakraborty, T. (1992).** The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**, 947-952.
- Leimeister-Wachter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W. & Chakraborty, T. (1990).** Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8336-8340.
- Lemos, J. A. & Burne, R. A. (2002).** Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus* mutants. *J Bacteriol* **184**, 6357-6366.
- Lety, M. A., Frehel, C., Berche, P. & Charbit, A. (2002).** Critical role of the N-terminal residues of listeriolysin O in phagosomal escape and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **2**, 367-379.
- Lety, M. A., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J. L., Kayal, S., Berche, P. & Charbit, A. (2001).** Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **39**, 1124-1139.
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S. & Rochat, F. (2000).** *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* **47**, 646-652.
- Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J. & Vandenesch, F. (2003).** Bacterial competition for human nasal cavity colonisation: role of Staphylococcal *agr* alleles. *App Environ Microbiol* **69**, 18-23.
- Lingnau, A., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. & Wehland, J. (1996).** Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun* **64**, 1002-1006.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1995).** Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* **63**, 3896-3903.
- Lomberg, H. e. a. (1986).** Influence of blood group on the availability of receptors for attachment of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **51**, 919-926.
- Lou, Y. & Yousef, A. E. (1997).** Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1252-1255.
- Louie, M., Jayaratne, P., Luchsinger, I., Devenish, J., Yao, J., Schlech, W. & Simor, A. (1996).** Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **34**, 15-19.
- Lwin, M. M., De Louvois, J. & Hurley, D. R. (1991).** Carriage of *Listeria monocytogenes* in pregnant women. *J Obstet Gynaecol* **11**, 41-42.

## M

- Ma, Z., Richard, H., Tucker, D. L., Conway, T. & Foster, J. W. (2002).** Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX et GadW (YhiW). *J Bacteriol* **184**, 7001-7012.
- MacGowan, A. P., Marshall, R. J., MacKay, I. M. & Reeves, D. S. (1991).** *Listeria* faecal carriage by renal transplant recipients, haemodialysis patients and patients in general practice: its relation to season, drug therapy, foreign travel, animal exposure and diet. *Epidemiol Infect* **106**, 157-166.
- Maijala, R., Lyytikäinen, O., Autio, T., Aalto, T., Haavisto, L. & Honkanen-Buzalski, T. (2001).** Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *Int J Food Microbiol* **70**, 97-109.
- Manohar, M., Baumann, D. O., Bos, N. A. & Cebra, J. J. (2001).** Gut colonization of mice with *actA*-negative mutant of *Listeria monocytogenes* can stimulate a humoral mucosal immune response. *Infect Immun* **69**, 3542-3549.
- Mansell, A., Braun, L., Cossart, P. & O'Neill, L. A. (2000).** A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF- $\kappa$ B in J774 macrophages. *Cell Microbiol* **2**, 127-136.
- Mansell, A., Khelef, N., Cossart, P. & O'Neill, L. A. (2001).** Internalin B activates nuclear factor- $\kappa$ B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol Chem* **276**, 43597-43603.
- Marco, A. J., Altimira, J., Prats, N., Lopez, S., Dominguez, L., Domingo, M. & Briones, V. (1997).** Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microb Pathog* **23**, 255-263.
- Marco, A. J., Prats, N., Ramos, J. A., Briones, V., Blanco, M., Dominguez, L. & Domingo, M. (1992).** A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol* **107**, 1-9.
- Marino, M., Banerjee, M., Jonquière, R., Cossart, P. & Ghosh, P. (2002).** GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO J* **21**, 5623-5634.
- Marquis, H. & Hager, E. J. (2000).** pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**, 289-298.
- 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**, 4531-4534.
- Marquis, H., Goldfine, H. & Portnoy, D. A. (1997).** Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **137**, 1381-1392.
- Marron, L., Emerson, N., Gahan, C. G. & Hill, C. (1997).** A mutant of *Listeria monocytogenes* LO28 unable to induce an acid tolerance response displays diminished virulence in a murine model. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4945-4947.
- McCracken, V. J. & Lorenz, R. G. (2001).** The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* **3**, 1-11.
- McLaughlan, A. M. & Foster, S. J. (1998).** Molecular characterization of an autolytic amidase of *Listeria monocytogenes* EGD. *Microbiology* **144**, 1359-1367.
- Mekalanos, J. J. (1992).** Environmental signals controlling of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**, 1-7.
- Mendum, M. L. & T, S. L. (2002).** Gbu glycine betaine porteur and carnitine uptake in osmotically stressed *Listeria monocytogenes* cells. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5647-5655.
- Mengaud, J., Lecuit, M., Lebrun, M., Nato, F., Mazie, J. C. & Cossart, P. (1996a).** Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun* **64**, 5430-5433.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. & Cossart, P. (1996b).** E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**, 923-932.
- Menudier, A., Rougier, F. P. & Bosgiraud, C. (1996).** Comparative virulence between different strains of *Listeria* in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and mice. *Pathol Biol (Paris)* **44**, 783-789.
- Mereghetti, L., Lanotte, P., Savoye-Marczuk, V., Marquet-Van Der Mee, N., Audurier, A. & Quentin, R. (2002).** Combined Ribotyping and Random Multiprimer DNA Analysis To Probe the Population Structure of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2849-2857.
- Merino, D., Reglier-Poupet, H., Berche, P. & Charbit, A. (2002).** A hypermutator phenotype attenuates the virulence of *Listeria monocytogenes* in a mouse model. *Mol Microbiol* **44**, 877-887.
- Michel, E., Reich, K. A., Favier, R., Berche, P. & Cossart, P. (1990).** Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol Microbiol* **4**, 2167-2178.
- Milenbachs, A. A., Brown, D. P., Moors, M. & Youngman, P. (1997).** Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **23**, 1075-1085.
- Milohanic, E., Glaser, P., J-Y., C., Frangeul, L., Vega, Y., Vasquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P. & Buchrieser, C. (2003).** Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**, 1613-1625.
- Milohanic, E., Jonquieres, R., Cossart, P., Berche, P. & Gaillard, J. L. (2001).** The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol* **39**, 1212-1224.
- Mizuki, M., Nakane, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y. & Iwakura, Y. (2002).** Comparison of host resistance to primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections in mice by intranasal and intravenous routes. *Infect Immun* **70**, 4805-4811.
- Mourrain, P., Lasa, I., Gautreau, A., Gouin, E., Pugsley, A. & Cossart, P. (1997).** ActA is a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10034-10039.
- Myers, E. R., Dallmier, A. W. & Martin, S. E. (1993).** Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2082-2086.

## N

- Nadon, C. A., Bowen, B. M., Wiedmann, M. & Boor, K. J. (2002).** Sigma B Contributes to PrfA-Mediated Virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **70**, 3948-3952.
- Nadon, C. A., Woodward, D. L., Young, C., Rodgers, F. G. & Wiedmann, M. (2001).** Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **39**, 2704-2707.
- Nair, S., Derre, I., Msadek, T., Gaillot, O. & Berche, P. (2000a).** CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **35**, 800-811.
- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V. & Berche, P. (1999).** ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **31**, 185-196.
- Nair, S., Milohanic, E. & Berche, P. (2000b).** ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**, 7061-7068.
- Norrung, B. & Andersen, J. K. (2000).** Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 228-232.
- Norwood, D. E. & Gilmour, A. (2000).** The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* **88**, 512-520.
- Notermans, S. H., Dufrenne, J., Leimeister-Wachter, M., Domann, E. & Chakraborty, T. (1991a).** Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2666-2670.
- Notermans, S. H., Dufrenne, J., Teunis, P. & Chackraborty, T. (1998).** Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **61**, 244-248.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Chakraborty, T., Steinmeyer, S. & Terplan, G. (1991b).** The chick embryo test agrees with the mouse bio-assay for assessment of the pathogenicity of *Listeria* species. *Lett Appl Microbiol* **13**, 161-164.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. & Chackraborty, T. (1998).** Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **61**, 244-248.

## O

- O'Driscoll, B., Gahan, C. 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.
- Ortel, S. (1975).** Listeriosis during pregnancy and excretion of listeria by laboratory workers. *Zentralbl Bakteriol Sect. A* **231**, 491-502.

## P

- Pace, J. L., Chai, T.-J., Rossi, H. A. & Jiang, X. (1997).** Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2372-2377.
- Pandiripally, V. K., Westbrook, D. G., Sunki, G. R. & Bhunia, A. K. (1999).** Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. *J Med Microbiol* **48**, 117-124.
- Parish, M. E. & Higgins, D. P. (1989).** Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J Food Prot* **52**, 144-147.
- Park, J. H., Lee, Y. S., Lim, Y. K., Kwon, S. H., Lee, C. U. & Yoon, B. S. (2000).** Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 35-40.
- Park, S. F. & Kroll, R. G. (1993).** Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **8**, 653-661.
- Park, S. F. (1994).** The repression of listeriolysin O expression in *Listeria monocytogenes* by the phenolic beta-D-glucoside, arbutin. *Lett Appl Microbiol* **19**, 258-260.
- Parkins, M. D., Ceri, H. & Storey, D. G. (2001).** *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**, 1215-1226.
- Peacock, S., De Silva, I. & Lowy, F. D. (2001).** What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **9**, 605-610.
- Peterkin, P. I., Gardiner, M. A., Malik, N. & Idziak, E. S. (1992).** Plasmids in *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Can J Microbiol* **38**, 161-164.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F. & Alige, S. (2000).** Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **55**, 121-126.
- Pierre, O. & Veit, P. (1996).** Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. *Bull Epidemiol Hebdom* **45/96**, 195-197.
- Pine, L., Quinn, F. D., Ewing, E. P., Birkness, K. A., White, E. H., Stephens, D. S. & Ribot, E. (1995).** Evaluation of the chick embryo for the determination of relative virulence of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Letters* **130**, 37-44.
- Pizarro-Cerda, J., Jonquieres, R., Gouin, E., Vandekerckhove, J., Garin, J. & Cossart, P. (2002).** Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InlA- or InlB-phagosomes. *Cell Microbiol* **4**, 101-115.
- Pope, L. M., Reed, K. E. & Paynes, S. M. (1995).** Increased protein secretion and adherence to HeLa cells by *Shigella* spp. following growth in the presence of bile salts. *Infect Immun* **63**, 3642-3648.

- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F. & Gaillard, J. L. (2001).** Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol* **3**, 331-340.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P. & Gaillard, J. L. (1998).** Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun* **66**, 747-755.
- Prouty, A. M. & Gunn, J. S. (2000).** *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* **68**, 6763-6769.

## Q

- Querrec, L. (1987).** *Listeria* et listériose. In *Manuel de bactériologie clinique*, pp. 21-26. Edited by J. Freyney, F. Renaud, W. Hansen & C. Bollet: Elsevier.

## R

- Racz, P., Tenner, K. & Mero, E. (1972).** Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Lab Invest* **26**, 694-700.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S. H. & Goebel, W. (1998).** The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* **260**, 144-158.
- Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D. G., Hamood, A. N., Iglewski, B. H. & Kornberg, A. (2000).** Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9636-9641.
- Read, L. J. & Muench, H. (1938).** A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493-497.
- Reeds, P. J., Burrin, D. G., Stoll, B. & Jahoor, F. (2000).** Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr* **130**, 978S-982S.
- Réglier-Poupet, H., Pelligrini, E., Charbit, A. & Berche, P. (2003).** Identification of LpeA, a psa-like membrane protein that promotes cell entry by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **71**, 474-482.
- Renzi, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S. & Cossart, P. (1997).** Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* **65**, 1515-1518.
- Ripio, M. T., Brehm, K., Lara, M., Suarez, M. & Vazquez-Boland, J. A. (1997a).** Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* **179**, 7174-7180.
- Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Lara, M., Suarez, M. & Vazquez-Boland, J. A. (1997b).** A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**, 1533-1540.
- Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Brehm, K., Berche, P. & Vazquez-Boland, J. A. (1996).** Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol* **147**, 371-384.
- Ripio, M. T., Vazquez-Boland, J. A., Vega, Y., Nair, S. & Berche, P. (1998).** Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **158**, 45-50.
- Rocourt, J. (1996).** Taxonomy of the *Listeria* genus and typing of *L. monocytogenes*. *Pathol Biol (Paris)* **44**, 749-756.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C. & Piffaretti, J. C. (1992).** Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 171-174.
- Rocourt, J. (1999)** The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* : Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification in *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2nd edn. New York, N. Y.: Marcel Dekker Inc, **1**, 1-21.
- Rocourt, J., Jacquet, C. & Reilly, A. (2000).** Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int J Food Microbiol* **62**, 197-209.
- Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S. & Berche, P. (1998).** The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol* **27**, 1235-1245.
- Rouquette, C., Ripio, M. T., Pellegrini, E., Bolla, J. M., Tascon, R. I., Vazquez-Boland, J. A. & Berche, P. (1996).** Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and in vivo survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **21**, 977-987.
- Rousset, A., Lemaître, J. P. & Delcourt, A. (1994).** Recherche de *Listeria monocytogenes* au niveau de différents sites (selles, sécrétions génitales et rhino-pharyngés). *Med Mal Infect* , 1174-1179.

## S

- Saklani-Jusforgues, H., Fontan, E. & Goossens, P. L. (2000).** Effect of acid-adaptation on *Listeria monocytogenes* survival and translocation in a murine intragastric infection model. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 155-159.
- Salamina, G., Dalle Donne, E., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminathan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N. & Salmaso, S. (1996).** A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol Infect* **117**, 429-436.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F. & Mabilat, C. (1996).** Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 669-674.

- Salvat, G., Toquin, M. T. & Ermel, G. (1997). Epidémiologie de *Listeria monocytogenes* dans la filière porcine. *Viandes et Produits carnés* **18**, 264-268.
- Samelis, J., Sofos, J. N., Kendall, P. A. & Smith, G. C. (2001). Influence of the natural microbial flora on the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in a model system of fresh meat decontamination fluids. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2410-2420.
- Santiago, N. I., Zipf, A. & Bhunia, A. K. (1999). Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2765-2769.
- Schlech, W. F., 3rd (1984). New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. *Clin Invest Med* **7**, 321-324.
- Schlech, W. F., 3rd (2000). Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* **31**, 770-775.
- Schlech, W. F., 3rd, 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. *N Engl J Med* **308**, 203-206.
- Schonwetter, B. S. E., Stolzenberg, E. D. & Zasloff, M. A. (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* **267**, 1645-1648.
- Schubert, W.-D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M. P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T. & Heinz, D. W. (2002). Structure of Internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**, 825-836.
- Schuchat, A., Deaver, K., Hayes, P. S., Graves, L., Mascola, L. & Wenger, J. D. (1993). Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *J Infect Dis* **167**, 1261-1262.
- Seeliger, H. P. (1988). Listeriosis—history and actual developments. *Infection* **16**, S80-S84.
- Sela, S., Neeman, R., Keller, N. & Barzilai, A. (2000). Relationship between asymptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to and to be internalized by cultured epithelial cells. *J Med Microbiol* **49**, 499-502.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegumfeldt, H. & McMeekin, T. (2002). Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. *Int J Food Microbiol* **75**, 89-97.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Ebricht, R. & Cossart, P. (1996). A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* **20**, 785-797.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T. & Cossart, P. (1995). Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J Bacteriol* **177**, 6469-6476.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. & Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**, 501-510.
- Shuter, J., Hatcher, V. B. & Lowy, F. D. (1996). *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. *Infect Immun* **64**, 310-318.
- Skoble, J., Auerbuch, V., Goley, E. D., Welch, M. D. & Portnoy, A. (2001). Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* **155**, 89-100.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. & Hill, C. (2001a). Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2571-2577.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. & Hill, C. (2001b). Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4560-4565.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., O'Driscoll, B. & Hill, C. (2000). Analysis of the role of *betL* in contributing to the growth and survival of *Listeria monocytogenes* LO28. *Int J Food Microbiol* **60**, 261-268.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., Abee, T. & Hill, C. (1999). Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2078-2083.
- Sleator, R. D., Wouters, J., Gahan, C. G., Abee, T. & Hill, C. (2001c). Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2692-2698.
- Slutsker, L. & Schuchat, A. (1999). Listeriosis in animals. In *Listeria, listeriosis and food safety*, pp. 75-95. Edited by E. T. Ryser & E. H. Marth. New York, N. Y.: Marcel Dekker Inc.
- Smith, G. A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N. C., Portnoy, D. A. & Goldfine, H. (1995). The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**, 4231-4237.
- Smith, M. A., Takeuchi, K., Brackett, R. E., McClure, H. M., Raybourne, R. B., Williams, K. M., Babu, U. S., Ware, G. O., Broderson, J. R. & Doyle, M. K. (2003). Nonhuman primate model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths. *Infect Immun* **71**, 1574-1579.
- Sokolovic, Z., Riedel, J., Wuenschel, M. & Goebel, W. (1993). Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol Microbiol* **8**, 219-227.
- Sokolovic, Z., Schuller, S., Bohne, J., Baur, A., Rdest, U., Dickneite, C., Nichterlein, T. & Goebel, W. (1996). Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4. *Infect Immun* **64**, 4008-4019.
- Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I. & Vazquez-Boland, J. A. (2001). A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* **3**, 853-864.
- Sukhareva, B. S. & Mamaeva, O. K. (2002). Glutamate decarboxylase: computer studies of enzyme evolution. *biochem (Mosc)* **67**, 1180-1188.

## T

- Tabouret, M., de Rycke, J. & Dubray, G. (1992).** Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. *J Gen Microbiol* **138**, 743-753.
- Terplan, G. & Steinmeyer, S. (1989).** Investigations on the pathogenicity of *Listeria spp.* by experimental infection of the chick embryo. *Int J Food Microbiol* **8**, 277-280.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W. & Nikaido, H. (1997).** Active efflux of bile salt by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 2512-2518.
- Turnock, L. L., Somers, E. B., Faith, N. G., Czuprynski, C. J. & Lee Wong, A. C. (2002).** The effects of prior growth as a biofilm on the virulence of *Salmonella typhimurium* for mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **25**, 43-48.

## U

- Unnerstad, H., Ericsson, H., Alderborn, A., Tham, W., Danielsson-Tham, M. L. & Mattsson, J. G. (2001).** Pyrosequencing as a method for grouping of *Listeria monocytogenes* strains on the basis of single-nucleotide polymorphisms in the *inlB* gene. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5339-5342.
- Unnerstad, H., Nilsson, I., Ericsson, H., Danielsson-Tham, M. L., Bille, J., Bannerman, E. & Tham, W. (1999).** Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2054-2056.

## V

- Van Belkum, A., Riewarts Eriksen, N. H., Sijmons, M., Van Leeuwen, W., Van den Bergh, M., Kluytmans, J., Espersen, F. & Verbrugh, H. (1997).** Coagulase and protein A polymorphism do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **46**, 222-232.
- Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P. & Velge, P. (1998).** Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J Appl Microbiol* **85**, 337-346.
- Van Velkingurgh, J. C. & Gunn, J. S. (1999).** PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella spp.* *Infect Immun* **67**, 1614-1622.
- Vazquez-Boland, J. A., Dominguez-Bernal, G., Gonzalez-Zorn, B., Kreft, J. & Goebel, W. (2001a).** Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* **3**, 571-584.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001b).** *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**, 584-640.
- Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M. T., Bockmann, R., Gonzalez-Zorn, B., Novella, S., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W. & Vazquez-Boland, J. A. (1998).** Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA\* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J Bacteriol* **180**, 6655-6660.
- Vines, A. & Swaminathan, B. (1998).** Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. *Curr Microbiol* **36**, 309-318.

## W

- Wang, S. Y., Lauritz, J., Jass, J. & Milton, D. L. (2002).** A ToxR homolog from *Vibrio anguillarum* serotype O1 regulates its own production, bile resistance, and biofilm formation. *J Bacteriol* **184**, 1630-1639.
- Weber, A., Potel, J., Schäfer-Schmidt, R., Prell, A. & Datzmann, C. (1995).** Investigations on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. *Zbl Hyg* **198**, 117-123.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A. & Mitchison, T. J. (1998).** Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**, 105-108.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Karatzas, A. K., Wouters, J. A. & Abee, T. (2002a).** Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* **68**, 456-463.
- Wemekamp-kamphuis, H. H., Wouters, J. A., Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., Hill, C. & Abee, T. (2002b).** Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4710-4716.
- Wernars, K., Boerlin, P., Audurier, A., Russell, E. G., Curtis, G. D., Herman, L. & van der Mee-Marquet, N. (1996).** The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Int J Food Microbiol* **32**, 325-341.
- Wernars, K., Heuvelman, K., Notermans, S., Domann, E., Leimeister-Wachter, M. & Chakraborty, T. (1992).** Suitability of the *prfA* gene, which encodes a regulator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, in the identification of pathogenic *Listeria spp.* *Appl Environ Microbiol* **58**, 765-768.
- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J. & Boor, K. J. (1998).** General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **180**, 3650-3656.

**Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L. & Batt, C. A. (1997).** Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* **65**, 2707-2716.

**Williams, J. R., Thayyullathil, C. & Freitag, N. E. (2000).** Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J Bacteriol* **182**, 837-841.

## **Z**

**Zachar, Z. & Savage, D. C. (1979).** Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **23**, 168-174.

**Zalevsky, J., Grigorova, I. & Mullins, R. D. (2001).** Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria* Acta protein. Acta binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* **276**, 3468-3475.

**Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. & Mekalanos, J. J. (2002).** Quorum sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3129-3134.