

N° :1009

50376
1982
193

50376
1982
193

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité : **BIOCHIMIE**

par

FARIDA ADLY

**ETUDE ANTIGÈNIQUE DE LISTERIA
MONOCYTOGENES : APPLICATION AU SERO-DIAGNOSTIC
DE LA LISTERIOSE**



Soutenue le 9 Décembre 1982 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury : Président : MM J. GUILLAUME
Rapporteur : MM G. MARTIN
Examineurs : MM J. KREMBEL
MM JC. DERIEUX
Mme M. ROUSSEL-DELVALLEZ

A MA MERE

A MON PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN GUILLAUME

Professeur à l'Université de Lille I

Vous me faites le grand honneur de
présider cette thèse.

J'ai eu la chance de bénéficier de
votre enseignement durant mes études.

Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance
et mon profond respect.

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUY MARTIN

Professeur à l'Université de Lille II

Chef de Service du Laboratoire de Bactériologie C

Voici deux ans, vous m'avez accueillie
avec confiance et gentillesse dans votre service.

Je vous en suis très reconnaissante.

Et je tiens à vous remercier d'avoir
accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

Je vous prie de croire à mon profond
respect et à ma grande admiration.

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN KREMBEL

Professeur à l'Université de Lille I

Je suis sensible à l'honneur que
vous me faites de juger cette thèse.

J'ai eu la chance de bénéficier de
votre enseignement durant mes études.

Je vous prie de croire en mes sentiments
respectueux.

MADAME MICHELINE ROUSSEL-DELVALLEZ

Chef de travaux des Universités

Assistante des hôpitaux

Ce travail est aussi le vôtre.

Vous m'avez consacré durant plus de deux années une grande partie de votre temps que je sais précieux, pour mener à bien cette thèse.

Aujourd'hui je suis heureuse que vous soyez parmi mes juges. Qu'il vous en soit remercié.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon amitié.

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-CLAUDE DERIEUX

Professeur à l'Université de Lille I

Vous avez spontanément accepté de juger
ce travail.

Je vous en remercie.

Je vous prie de croire en mes sentiments
respectueux.

A TOUTE L'EQUIPE DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE C

Je tiens à remercier

MADemoiselle ELIANE DRANCOURT et MADAME MARIE-CHRISTINE LIMBERT pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée dans la réalisation de ce travail.

MONSIEUR DECK pour les cultures qu'il nous a effectuées.

Mes remerciements vont au Secrétariat du Service, en particulier à

MADemoiselle SABINE BORMS qui a assurée avec compétence et dévouement la dactylographie de cette thèse.

et MADemoiselle MARIE-FRANCOISE CABY

SUJET

ETUDE ANTIGENIQUE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* :
APPLICATION AU SERO-DIAGNOSTIC DE LA LISTERIOSE

INTRODUCTION

Les multiples aspects que la listériose peut revêtir et le peu de moyens dont les cliniciens disposent pour lutter contre cette pathologie ont suggéré deux orientations de recherche.

- soit l'étude des antigènes de *Listeria monocytogenes* pour une meilleure compréhension du pouvoir pathogène du germe.

- soit l'étude de la réponse immunitaire de l'hôte et les mécanismes qui déterminent cette réponse.

Il existait un nombre élevé de travaux portant sur les anticorps anti-*Listeria* mais peu étudiaient la structure antigénique de *Listeria monocytogenes*. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi ce travail.

Lors de notre étude bibliographique préliminaire nous avons constaté que de nombreuses réactions sérologiques ont été largement utilisées pour le dépistage de la listériose chez la femme enceinte.

La principale technique, la réaction d'agglutination, qui utilise des bactéries entières, présente deux inconvénients majeurs :

- taux parfois élevés chez les individus "sains" ;
- parfois même taux inférieurs aux taux significatifs chez les femmes enceintes présentant une listériose prouvée bactériologiquement.

Plusieurs raisons sont à l'origine de ces difficultés : la qualité de l'antigène utilisé ainsi que l'existence d'antigènes communs entre *Listeria monocytogenes* et d'autres espèces bactériennes.

Pour éviter cet inconvénient, nous avons tenté de préparer un antigène purifié spécifique de *Listeria* susceptible d'être utilisable pour le séro-diagnostic de listériose.

Notre travail a donc consisté dans un premier temps à faire l'étude antigénique de *Listeria monocytogenes* et dans un deuxième temps d'appliquer l'antigène purifié que nous avons préparé à la détection des anticorps anti-*Listeria* dans les sérums des femmes enceintes et nouveau-nés atteints de listériose. Nous avons choisi une méthode sensible : l'E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) qui n'avait pas encore été utilisée pour *Listeria monocytogenes*.

HISTORIQUE

L'histoire de la listériose intéresse la pathologie animale et la pathologie humaine.

La première description de la listériose semble remonter à 1911, époque à laquelle HULPHERS (71), en Suède, découvre un nouveau germe dans le foie d'un lapin mort de septicémie. Ce bacille jusqu'alors inconnu, avait entraîné la formation de larges zones de nécrose hépatique ; en conséquence, HULPHERS l'appela "*Bacillus hepatis*".

Les premiers cas de listériose ont été observés en 1917 par ATKINSON (7) en Australie, qui put décrire, au cours d'une petite épidémie de méningite chez les enfants, un bacille qu'il classa dans la famille des *Corynebacteriaceae*. De même, NYFELDT (107) en 1929, isole le germe de trois sujets ayant une mononucléose infectieuse.

En 1921, DUMONT et COTONI (39) rapportent le cas d'une méningite mortelle chez un soldat italien, avec isolement du bacille d'un liquide céphalorachidien.

L'Anglais MURRAY en 1924 (102) observe, au cours d'une épizootie qui sévissait sur les lapins et les cobayes, le germe Gram positif responsable de lésions nécrotiques au niveau du foie et d'une mononucléose sanguine. En 1926, MURRAY et coll (102) nomment le bacille "*Bacterium monocytogenes*" en raison de l'importante monocytose sanguine qu'ils observent chez les animaux.

En 1927, PIRIE (121) isole une bactérie qui décimait les gerbilles (petits rongeurs). Il l'appela "*Listeria hepaticum*" pour rendre hommage à Lord Lister. Il identifie le germe à celui de MURRAY et propose le terme de "*Listerella monocytogenes*".

C'est en 1939, au congrès de bactériologie de New-York, que fut admis de façon officielle pour cette bactérie la dénomination "*Listeria monocytogenes*".

GRAHAM et coll (59) démontrent que *Listeria monocytogenes* peut causer des avortements chez les animaux.

Le premier cas de méningite listérienne néonatale est rapporté en 1936 par BURN (21). C'est ensuite surtout dans la littérature allemande qu'est décrite la listériose chez le nouveau-né et par REISS (131) la "*granulomatosis infantiseptica*", forme aiguë septicémique. Les deux premiers cas décrits chez le nouveau-né en France furent rapportés par COULOMBIER en 1956 (30).

Depuis, de nombreux travaux consacrés à cette maladie se sont multipliés en raison d'une meilleure connaissance du germe et de sa pathologie.

CHAPITRE I :
BACTERIOLOGIE

BACTERIOLOGIE

Listeria monocytogenes a longtemps posé des problèmes d'identification. SEELIGER (142) étudia un très grand nombre de souches, et détermina certains critères permettant d'identifier *Listeria*.

I POSITION TAXONOMIQUE

Listeria monocytogenes a posé et pose encore des problèmes taxonomiques. Elle fut incorporée, d'abord, par BREED en 1957 (17) dans la famille des *Corynebacteriaceae* qui était composée de six genres :

- . *Corynebacterium*
- . *Listeria*
- . *Erysipelothrix*
- . *Microbacterium*
- . *Cellulomonas*
- . *Arthrobacter*

Listeria monocytogenes était l'unique espèce du genre *Listeria*. Puis PREVOT, en 1961, décrit *Listeria denitrificans* (143), LARSEN et SEELIGER en 1966 décrivent *Listeria grayi* (143), enfin WELSHIMER et MEREDITH en 1971 décrivent *Listeria murrayi* (169).

A l'heure actuelle dans la dernière édition (8ème) de "Bergey's Manual" (143), le genre *Listeria* ainsi que les genres *Erysipelothrix* et *Caryophanon* furent placés comme "genre à affiliation incertaine" dans une section qui contient également les Lactobacilles.

II CARACTERES MORPHOLOGIQUES

Listeria est un bacille Gram positif, habituellement court et trapu (un à deux microns de long sur 0,5 micron de large) et à extrémités légèrement arrondies.

Le germe ne possède pas de spore et a été longtemps considéré comme non capsulé, mais les méthodes d'immunocytologie et d'immunomicroscopie (microscope électronique) ont permis de mettre en évidence des structures capsulaires chez *Listeria monocytogenes*. La capsule de nature mucopolysaccharidique enrobe la cellule d'une couche continue, régulière de forme et d'épaisseur (151). Cette capsule est inconstante et dépend de la composition du milieu de culture. Pour augmenter la production de la capsule, SMITH (151) et METZGER (96) ont montré que la culture sur un milieu à base de tryptose et de glucose à 5 p100 additionné de sérum de lapin (10 p100) permettait d'observer des colonies plus grosses avec apparition des capsules.

En culture, c'est un germe très polymorphe ; dans ses formes longues, il est facilement confondu avec les membres du genre *Corynebacterium*, car il peut prendre l'aspect en palissade dans des cultures de 15 à 24 heures d'incubation en association par paires formant des V ou des Y ou encore des formes coccoïdes ou de diplocoques. La forme coccoïde est rencontrée dans les tissus infectés au niveau de mononucléaires ; cette forme est retrouvée dans les cultures en bouillon.

Listeria monocytogenes prend bien la coloration de Gram ; cependant le caractère Gram positif est assez labile ; dès que la culture est un peu vieille, les germes sont faiblement décolorés ce qui les fait confondre avec *Haemophilus* (6 - 65).

Des coupes ultra-fines de micro-organismes fixées à l'acide osmique montrent une paroi lamellaire complexe (151).

SRIVASTAVA (153) étudie la couche "peptidoglycane" (mureine) de la paroi de *Listeria monocytogenes* et démontre que cette couche constitue 0,4 p100 du poids sec des cellules intactes. L'analyse chimique indique que 27 p100 du poids sec de ce peptidoglycane est constitué d'hydrates de carbone et 66 p100 de peptides.

SALTON (136) démontre que 5 à 7 p100 de la paroi de *Listeria monocytogenes* est constituée de lipides qui possèdent un fort effet d'adjuvant aux niveaux cellulaire et humoral (75) chez la souris.

La présence dans la paroi d'un système enzymatique provoquant la lyse de cette paroi a été montrée par TINELLI (158). Ce système fonctionnerait à un pH légèrement alcalin et serait activé par la trypsine ; un chauffage des suspensions aqueuses de paroi pendant cinq minutes à 100° C inhibe totalement cette autolyse.

III CULTURES

Pour identifier *Listeria monocytogenes*, il est indispensable de connaître les caractères culturels.

3.1 Milieux

Listeria monocytogenes se multiplie sur les milieux usuels, mais les milieux à base de tryptose sont les plus favorables ; celui-ci est un excellent substrat pour la conservation de la bactérie (65). Elle cultive bien sur les milieux contenant du glucose (5 p100).

CURY et coll (58) ont cultivé *Listeria monocytogenes* sur un milieu chimiquement défini renfermant de la riboflavine, de la biotine, de la thiamine, de l'acide nicotinique, des sels et du glucose.

Pour l'isolement sélectif de *Listeria monocytogenes*, à partir de prélèvements polymicrobiens, de nombreux milieux ont été étudiés contenant des sels minéraux, des antibiotiques, de l'acide nalidixique. Citons : le milieu au tellurite de potassium et chloramphénicol de KAMPELMACHER (78), le milieu contenant de la gélose au sang et de l'acide nalidixique de BEERENS (13), le milieu à la tryptaflavine et à l'acide nalidixique de RALOVICH (126) et le milieu de DESPIERRES (33) constitué d'acide nalidixique, de polymyxine et de bleu de méthylène.

3.2 Caractères cultureux

Listeria monocytogenes pousse sur les milieux habituellement utilisés en bactériologie qu'ils soient solides ou liquides.

Listeria cultive bien à pH légèrement alcalin ; le pH optimum se situe entre 7,2 et 7,6. La croissance est possible jusqu'à des pH de 5,6 à 9,6. *Listeria* se développe entre 3° C et 45° C. La température optimum se situe entre 30° C et 37° C.

Le germe contrairement aux autres germes pathogènes pour l'homme se multiplie à + 4° C. Cette propriété est utilisée comme moyen d'enrichissement en *Listeria monocytogenes* à partir des produits pathologiques.

La technique d'enrichissement proposée par GRAY (60) consiste à émulsionner ou broyer le produit suspect dans de l'eau distillée stérile et de le conserver à + 4° C. Périodiquement, un repiquage est effectué sur un milieu nutritif et sur un milieu sélectif qui seront incubés à 37° C pendant 24 à 48 heures avant d'être examinés ; quelques jours de réfrigération suffisent habituellement pour assurer l'isolement de *Listeria monocytogenes*, sinon l'expérience doit être poursuivie (jusqu'à trois mois). Cette technique donne de bons résultats, mais son utilisation en clinique est limitée en raison de sa lenteur.

L'incubation à basse température augmente la virulence du germe (65). En effet, les souches de *Listeria monocytogenes* cultivées en bouillon à une température de 5° C sont plus virulentes par voie intra-péritonéale chez la souris, que les souches incubées à une température de 37° C. Cette virulence est liée à la présence de l'antigène L (79), dont nous reparlerons lors de l'étude de la structure antigénique de *Listeria monocytogenes*.

Sur gélose ordinaire, les colonies sont rondes d'environ 1 mm de diamètre, à bord régulier, lisses et bombées sous forme de goutte de rosée, opalescentes. Lorsqu'elles sont examinées en transillumination oblique (68), elles ont une coloration gris bleu si caractéristique pour GRAY (62) que cela permet de les distinguer lors d'un isolement à partir de produits polymicrobiens.

Sur gélose au sang, une hémolyse de type β se développe en présence de la plupart des globules rouges de mammifères ; elle est nette pour les souches récemment isolées. Par contre les cultures en vieillissant donnent des colonies plus grandes (3 à 5 mm) irrégulières dont l'hémolyse a souvent disparue, contenant des germes plus longs et filamenteux. Bien qu'elle fût longtemps considérée comme constante pour l'espèce, l'hémolyse peut s'atténuer ou disparaître lors des repiquages. En effet, BOJSEN-MØLLER (15) obtient à partir des coprocultures humaines, des souches de type sérologique 4 totalement dépourvues de propriété hémolytique.

En bouillon ordinaire, *Listeria monocytogenes* pousse en 24 heures d'incubation donnant un trouble homogène qui est beaucoup plus abondant si le bouillon est glucosé.

3.3 Exigences respiratoires

C'est un germe aéro-anaérobie facultatif ; *Listeria monocytogenes* pousse mieux en atmosphère possédant des tensions légèrement abaissées en O₂ et légèrement augmentées en CO₂ par rapport à celles de l'air (49).

3.4 Mobilité

Un caractère essentiel de *Listeria* est d'être mobile. La mobilité est maximum si la culture est incubée entre 20° C et 22° C. Elle peut ne pas exister si la culture est incubée à 37° C.

SEASTONE (140) pensait que *Listeria monocytogenes* ne possédait qu'un seul flagelle terminal ou subterminal. En fait, comme l'ont montré PATERSON (116), puis GRIFFIN et ROBBINS (66) le nombre de flagelles et leur disposition varient avec la température des cultures.

Cette mobilité est due à une ciliature péritriche qui disparaît à 37° C. Par contre, à 4° C ces flagelles existent et sont actifs (65).

3.5 Résistance

Listeria monocytogenes possède une grande résistance, bien que ne produisant pas de spores. Il demeure vivant en culture plusieurs mois à la température du laboratoire et plusieurs années à + 4° C. Le germe résiste 15 minutes à la température de 60° C (58) ; il est cependant détruit rapidement à 80° C.

Le germe résiste à une concentration en chlorure de sodium jusqu'à 10 p100 ; l'adjonction de tellurite de potassium à la concentration de 0,01 à 0,05 p100 ne gêne pas la multiplication de *Listeria* (58), alors que ces concentrations sont inhibitrices pour la plupart des bactéries à Gram positif.

Lors de l'examen des cultures, la morphologie est le plus souvent caractéristique, cependant le diagnostic doit être confirmé par l'étude des propriétés biochimiques spécifiques.

3.6 Caractères biochimiques

Listeria monocytogenes possède une catalase et une β galactosidase, fermente sans production de gaz le glucose, le levulose, particulièrement le lactose et réduit le lait tournesolé sans coagulation.

L'esculine est également fermentée en 2 heures, avec un noircissement du milieu, ce caractère rapide constitue d'ailleurs une méthode d'identification du germe.

Listeria monocytogenes est sans action sur le mannitol, le glycérol, ne réduit pas les nitrates. Les recherches d'indol, d'uréase, d'hydrogène sulfuré sont négatives.

De nombreuses discussions persistent à propos des caractères biochimiques : GRAY (65) a obtenu une production d'H₂S en modifiant les conditions de culture. Pour SEELIGER (142), la fermentation de quelques glucides, xylose en particulier varie en fonction de la souche étudiée.

La production de phosphatase alcaline a été mise en évidence par ELISCHEROVA (45) ; elle est plus importante pour les souches de sérotype 4 que pour celles de sérotype 1. Un rapport direct semble exister entre cette production et la virulence du germe.

3.7 Formes L

Les difficultés rencontrées dans l'isolement de la bactérie à partir des tissus d'animaux expérimentalement ou naturellement infectés ont fait suggérer par de nombreux auteurs (44 - 70) l'existence possible des formes L de *Listeria*.

L'existence de ces formes de *Listeria monocytogenes* a été prouvée par SUCHANOVA (65) dont l'expérience a été décrite par GRAY (65). Il implante dans la cavité péritonéale de lapins gravides des sacs de collodion contenant *Listeria monocytogenes* ; bien que le diamètre des pores soit inférieur à *Listeria monocytogenes*, il retrouve les bactéries dans le placenta dans 8 cas sur 11.

Dans une autre étude (65), il obtient sur milieu à la pénicilline et au glycolle des formes L de *Listeria monocytogenes*.

3.8 Sensibilité aux bactériophages

La présence de phages dans les cultures de *Listeria monocytogenes* est mentionnée par SCHULTZ (139), puis par SWORD (156). Grâce à l'irradiation par les ultra-violets, on a pu isoler 18 phages à partir de 121 souches. Parmi eux, cinq sont suffisamment différents pour être utilisés à des fins de typage.

L'étude de lysotypie faite par AUDURIER (8) sur 823 souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France à l'aide d'un jeu de 20 bactériophages a permis d'évaluer l'activité lytique des phages et leur spécificité ; le spectre lytique de chaque phage est en étroite corrélation avec le type sérologique de la souche lysogène dont il provient.

C'est ainsi que l'on a pu mettre en évidence des groupes correspondant presque exactement aux sérotypes de PATERSON (116) ; avec ce mode de typage, il n'existe pas de réactions croisées avec les autres bactéries (Streptocoques, Staphylocoques), comme cela se retrouve dans les tests sérologiques (104 - 168 - 142).

WATSON et coll (163) ont isolé un phage appelé L 11/16 lysant 100 p100 des bactéries de sérotypage 1, 2 et 4 et 50 p100 de type 3. Les cultures du type 3 semblent être résistantes aux phages (65). Un sérum anti-phage L 11/16 a été préparé chez des lapins et conjugué avec l'isothiocyanate de fluoresceine. Ce sérum a pu être utilisé pour mettre en évidence *Listeria monocytogenes* dans des préparations tissulaires provenant de souris infectées. En effet, les anticorps anti-phage marqués se fixent sur le phage L 11/16 absorbé à la surface des germes, les visualisant au microscope à fluorescence (164).

L'étude des caractères morphologiques, physico-chimiques de ces phages serait d'un apport précieux pour la différenciation des souches de *Listeria monocytogenes* (94).

CHAPITRE II :
LES ANTIGENES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

LES ANTIGENES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

I STRUCTURE ANTIGENIQUE

Les premiers travaux effectués sur la structure antigénique datent de 1935 par SEASTONE (140). Cependant, ce sont SCHULTZ et JULIANELLE (138 - 77) en 1938 et 1939 respectivement qui ont les premiers suggéré qu'il y avait deux groupes distincts sérologiquement.

Le premier groupe fut désigné par JULIANELLE *Listeria monocytogenes* de type I ou souche des rongeurs, le deuxième groupe *Listeria monocytogenes* de type II ou souche des ruminants.

Les premières études approfondies sur la structure antigénique de *Listeria monocytogenes* ont été faites par PATERSON (116) en 1940, qui divise le genre *Listeria* en quatre types (1, 2, 3 et 4) en fonction des antigènes somatiques O et des antigènes flagellaires H. Les types 1, 3 et 4 diffèrent par la répartition de leurs facteurs O (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX) alors que le type 2 présente un facteur H flagellaire qui lui est propre, le facteur D.

Les facteurs somatique III et flagellaire B sont communs à tous les types.

TABLEAU 1 : STRUCTURE ANTIGENIQUE DE LISTERIA MONOCYTOGENES (65)

SEROTYPE	ANTIGENE O	ANTIGENE H	ANTIGENE SPECIFIQUE
1 a	I II (III)*	A B C	I
1 b	I II (III)	A B C	C
2	I II (III)	B D	D
3 a	II (III) IV	A B C	IV
3 b	II (III) IV	A B C	C
4 a	(III)	A B C	IX
4 b	(III)	A B C	VI
4 c	(III)	A B C	VII
4 ab	(III)	A B C	VI IX
4 d	(III)	A B C	VIII
4 e	(III)	A B C	V VI VIII IX
4 f	Propriétés hémolytiques		
4 g			

(III)* Antigène irrégulièrement présent



TABLEAU 2 : SEROVARIETES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, MURRAY, GRAYI ET ESPECES VOISINES (144)

DESIGNATION		ANTIGENES O										ANTIGENE H					
PATERSON	SEELIGER DONKER-VOET																
1	1/2 a	I	II	(III)*												A	B
	1/2 b	I	II	(III)												A	B C
2	1/2 c	I	II	(III)												B	D
3	3 a		II	(III)	IV											A	B
	3 b		II	(III)	IV											A	B C
	3 c		II	(III)	IV											B	D
4	4 a			(III)			V	VII								A	B C
	4 ab			(III)			V	VI	VII							A	B C
	4 b			(III)			V	VI								A	B C
	4 c			(III)			V	VII								A	B C
	4 d			(III)			V	VI	VIII							A	B C
	4 e			(III)			V	VI	VIII	IX						A	B C
	4 f			(III)			V	VII								A	B C
	4 g			(III)			V	VI	VII	X XI						A	B C
	5			(III)			V	VI	VIII	X						A	B C
	6			(III)				VII	VIII	XI						A	B C
	7			(III)						XII XIII						A	B C
	<i>Listeria spec.</i>			(III)													
	<i>Listeria (ssp grayi</i>			(III)												XIV	E
	<i>ssp murrayi)</i>			(III)												XIV	E

(III)* Facteur antigénique inconstant



SEELIGER a divisé, en 1958, le sérotype 4 en type 4a et type 4b d'après les facteurs somatiques O et DONKER-VOET (35) toujours selon l'antigène O, subdivise le sérotype 4 en 4c, 4d, 4e puis en type 4f et 4g en fonction de leurs propriétés hémolytiques (49).

Elle trouve quelques différences au niveau des antigènes flagellaires des sérotypes 1 et 3 qu'elle subdivise en 1a et 3a.

Les sérotypes actuellement reconnus, avec leur formule antigénique et leurs facteurs spécifiques sont résumés dans le tableau 1, emprunté à SEELIGER (144). Hormis les sérovars qui figurent sur ce tableau, d'autres combinaisons d'antigènes existent (41) mais leur nature doit encore être étudiée.

On distingue actuellement 17 sérotypes différents (144) auxquels il faudrait ajouter trois autres espèces étroitement apparentées à *Listeria monocytogenes*, *Listeria Grayi* (143), *Listeria murrayi* (169), *Listeria denitrificans* (143), dont la structure est encore peu connue.

Une comparaison des deux groupes décrits par JULIANELLE (77) et des types décrits par PATERSON (116) montre que le groupe "ruminant" correspond au type 4.

Les conclusions que tira JULIANELLE sont explicables si l'on regarde l'origine des souches qu'il a étudiées. Les souches des rongeurs ont été isolées de lapins et cobayes par MURRAY (102) en Angleterre et d'un gerbille par PIRIE (121) en Afrique du sud. Les souches de ruminants de PIRIE viennent des U.S.A. Des typages récents d'un grand nombre de cultures montrent que le type 1 (rongeurs) est prédominant en Europe et en Afrique, alors que le type 4 (ruminant) est plus important aux U.S.A. (35). Etant donné le nombre limité des souches sur lequel il travailla, on comprend facilement ses conclusions erronées.

A côté de ces antigènes spécifiques de type, on a isolé un facteur commun à la plupart des bactéries Gram positif : l'antigène de RANTZ (128).

II L'ANTIGENE DE RANTZ

C'est un antigène de composition chimique indéterminée et présent dans les surnageants de cultures de plusieurs types de bactéries ; *Streptococcus* du groupe D, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ; il est également produit par les Streptocoques des groupes A, B et C, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae* (142).

Les dosages de cet antigène ont montré qu'il est quantitativement plus élevé dans les cultures de *Listeria* en bouillon que dans les cultures sur gélose (104).

Cet antigène est capable de sensibiliser des hématies fraîches et de les rendre agglutinables par un sérum immun-anti antigène de RANTZ (128) ; son manque de spécificité l'a fait nommer antigène hétérologue. La présence de l'antigène de RANTZ dans toutes les souches de *Listeria monocytogenes* a été montrée par NETER et coll (104) utilisant le test d'hémagglutination.

Cet antigène est à la base des réactions croisées entre *Listeria monocytogenes* et Staphylocoques ; ce qui fut largement démontré par SEELIGER (141) et WELSHIMER (168). Cependant, PEASE et coll (119) rapportent que les réactions croisées entre *Listeria monocytogenes* et *Erysipelothrix* ne sont pas dues à l'antigène de RANTZ.

III LES SUBSTANCES A CARACTERE ANTIGENIQUE SECRETEES PAR LA BACTERIE

Les substances produites par *Listeria monocytogenes*, ayant un effet toxique sur l'organisme peuvent, schématiquement, se diviser en deux groupes :

- Les substances toxiques extracellulaires.
- Les substances toxiques faisant partie de la cellule bactérienne.

3.1 Substances toxiques extracellulaires

Il s'agit, généralement, de substances solubles.

a) Production d'hémolysine

La plupart des souches de *Listeria monocytogenes* élaborent une hémolysine sécrétée dans le milieu extérieur par le germe au cours de la phase exponentielle de sa croissance (130).

L'hémolysine est une substance soluble, filtrable, active sur la plupart des globules rouges des mammifères (souris et lapin).

De nombreux chercheurs ont étudié la sécrétion in vitro de l'hémolysine, les principaux facteurs influençant son activité, et sa cinétique d'action, ainsi que son caractère antigénique.

GIRARD et coll (56) démontrent que cette substance est précipitable par une solution de sulfate d'ammonium à 60 p100 ; cette fraction protéique "l'euglobine" possède l'activité hémolytique, et migre en électrophorèse avec les γ globulines. Cette substance est douée d'un pouvoir cytotoxique pour les macrophages de la souris (165), mais les doses nécessaires pour observer ces effets sont très élevées et certainement jamais atteintes in vivo (87).

Elle est thermolabile, présente une cinétique de lyse érythrocytaire (56) comparable à la streptolysine O produite par certains Streptocoques des groupes A, C et G.

SIDDIQUE (147), qui étudia particulièrement cette substance a isolé deux fractions :

- l'une est responsable de l'activité hémolytique et thrombolytique in vitro :

- l'autre a une action mixte DPNase et TPNase, c'est à dire qu'elle détruit les diphospho et les triphosphopyridine-nucléotides. Inactivée lentement à 37° C, cette fraction résiste 15 minutes à une température de 100° C ; elle a un maximum d'activité pour un pH compris entre 6,8 et 7,4 ; elle est inactivée par l'oxygène et réactivée par la cystéine.

JENKINS (76) obtient une augmentation de l'activité hémolytique après purification de l'hémolysine par adsorption et élution à partir de gel de phosphate de calcium (hydroxyapatite) comme l'a fait HERBERT et coll (69) pour l'hémolysine du Streptocoque du groupe A.

Plus récemment SEELIGER (146) arrive à la conclusion que l'hémolysine purifiée du sérovar 5 est thermolabile et montre une tendance vers la protéolyse initiée par la trypsine et la pronase.

Testée contre les érythrocytes de différentes espèces d'animaux, elle montre une variabilité hémolytique considérable, avec quelques différences dans la sensibilité des hématies (celles du singe et du cheval sont les plus sensibles).

Le caractère antigénique de l'hémolysine est démontré chez le lapin (146) par la neutralisation de l'hémolyse par l'anti-sérum homologue, effectuée sur gélose au sang, et aussi par la mise en évidence d'anticorps anti-hémolysine par la technique E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay).

Des auteurs (56 - 76) ont mis au point un test de dépistage de l'anti-hémolysine dans les sérums sur le modèle de la recherche de l'antistreptolysine O, dans les infections streptococciques. Cette réaction n'est pas fiable puisque l'activité hémolytique peut être faible ou inexistante (167) dans des cas de listériose confirmée.

b) Une autre toxine extracellulaire

Elle a été mise en évidence (152 -88) dans le filtrat des cultures de *Listeria monocytogenes*. Cette toxine provoque, chez le lapin, des lésions hémorragiques locales 3 heures après inoculation intradermique. Après 18 heures, ces lésions se transforment en

nécroses identiques à celles provoquées par une culture vivante de *Listeria monocytogenes*. Enfin, ce même filtrat tue les souris 24 à 48 heures après inoculation intrapéritonéale.

3.2 Substances toxiques de la cellule bactérienne

Il s'agit de substances qui font partie de la cellule de *Listeria monocytogenes* et qui ne sont libérées qu'après la lyse de celle-ci.

- Le facteur responsable de la monocytose (MPA : "monocytosis-producing-agent") de STANLEY (154) a fait l'objet de nombreuses recherches. Son action sur les monocytes du sang (augmentation du taux normal d'environ 6 000 fois) sans augmentation notable du nombre des autres leucocytes (65), a tout de suite éveillé l'intérêt des histologistes qui ont vu, dans cette propriété, un formidable moyen pour l'étude des origines et du développement des monocytes (65).

Cette monocytose ne semble pas être déterminée uniquement par la bactérie. La nature de l'hôte joue, également, un rôle important quant à la manifestation du phénomène. Ainsi dans la listériose humaine, l'augmentation des monocytes reste exceptionnelle tandis que, dans la listériose animale, elle est constante chez les

animaux monogastriques alors qu'elle n'est pratiquement jamais retrouvée chez les ruminants (65). On note une différence similaire dans le mode d'expression clinique de la maladie suivant l'hôte, la listériose induisant le plus souvent une septicémie chez l'animal monogastrique, une encéphalite chez les ruminants (62).

Du point de vue chimique, MPA est un phospholipide qui semble se situer au niveau de la membrane cytoplasmique (80). Son pouvoir d'induction de la monocytose paraît être lié à la fraction monoglycéride.

L'analyse chimique révèle que, en dehors de la partie lipidique, les extraits de MPA contiennent 0,97 à 5 p100 d'hydrates de carbone, 1,37 à 1,49 p100 de protéines.

Les lipides contenus dans les extraits de MPA sont de nature glycéridique, glycolipidique et phosphatidyl-choline. Le MPA semble affecter le métabolisme des stéroïdes.

GALSWORTHY (55) sépare par les méthodes chromatographiques de filtration sur gel et d'échange d'ions (DEAE-cellulose) le facteur MPA en deux fractions qui ont deux activités différentes : l'une responsable de la monocytose et de l'augmentation de la réponse humorale à plusieurs antigènes, l'autre responsable

d'un effet immunosuppresseur.

JEAGER et MYERS (73) ont décrit un antigène de surface, ou de type "L" rencontré surtout dans les cultures à basse température. L'antigène L est détruit par extraction au chloroforme ; par contre des extractions à l'éther de cet antigène donnent un produit laiteux qui réagit avec le sérum anti-*Escherichia coli* K8, et qui induit une monocytose chez la souris (65) semblable à celle induite par le facteur de STANLEY (154) cité précédemment.

- PATOCKA et coll (117) ont obtenu sous l'effet d'une désintégration chimique (lyse à l'aide d'une solution de glyco-colle) et mécanique de cultures virulentes de *Listeria monocytogenes* une substance différente de celle de JEAGER et MYERS mais qu'ils ont appelé également substance L (118). Cette substance L, riche en protéines révélées par immunoélectrophorèse bidimensionnelle, possède une activité biologique fort augmentée par précipitation au sulfate d'ammonium ; injectée au lapin par voie intradermique, elle provoque des réactions d'érythème ou point d'inoculation trois à quatre jours après l'injection. L'examen histopathologique révèle une réaction inflammatoire avec un grand nombre d'éosinophiles et de mononucléaires. Cette substance accroît nettement le pouvoir infectieux de *Listeria monocytogenes* à l'égard de la souris.

D'autres substances toxiques (95 - 133) ont pu être isolées de la paroi de *Listeria monocytogenes*. Tout récemment M'ARA (92) a démontré l'existence d'une endotoxine par extraction au phénol à partir de cultures bactériennes de *Listeria monocytogenes* suivie d'une ultracentrifugation et d'une chromatographie sur Sépharose. Cette endotoxine est de nature lipopeptidopolysaccharidique.

IV LES ANTIGENES DE PAROI ET LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES

Des travaux (22 - 23 - 11 - 82 - 134) étudient les propriétés biologiques des extraits de paroi de *Listeria monocytogenes*.

RODRIGUEZ (134) obtient une protection des souris contre des doses léthales de *Listeria*, en injectant un extrait de paroi préparé par traitement aux ultrasons et centrifugation différentielle. L'extrait antigénique de paroi active les macrophages et favorise la phagocytose des bactéries infestantes (82) ; son effet se traduit par la synthèse d'anticorps opsoniques et cytophiles. Il confère une résistance qui est d'autant plus importante qu'il est injecté en même temps qu'un adjuvant, l'endotoxine lipopolysaccharidique de *Salmonella*, par exemple. Le mécanisme par lequel cet antigène induit cette résistance n'est pas connu.

KLASKY (82) dans l'espoir d'expliquer cette immunité et d'identifier l'immunogène spécifique de *Listeria monocytogenes*, isole une fraction antigénique extraite de paroi de *Listeria* par traitement des germes à la "French-press" et centrifugation différentielle. Seule la partie protéique est immunogène chez la souris et est capable d'induire une résistance à l'égard de l'infection ce qui confirme les travaux de CAMPBELL (22). Seul un clivage peptidique par action de la trypsine inactive la fraction protéique.

BAKER (11) travaille sur les extraits antigéniques de paroi de *Listeria monocytogenes* préparés dans les mêmes conditions que CAMPBELL (22). Ces extraits antigéniques sont purifiés par trois procédés enzymatiques successifs (traitement à la pronase, trypsine et désoxyribonucléase). Ces antigènes augmentent la virulence du germe et diminuent la résistance de la souris préalablement infectée par *Listeria monocytogenes*.

Ces extraits purifiés possèdent un effet analogue au facteur décrit par SILVERMAN (148). Ce dernier semble être l'un des facteurs responsables de la virulence et du pouvoir infectieux de *Listeria monocytogenes*.

Cependant, dans d'autres travaux, CAMPBELL (22) démontre qu'au moins une fraction de la paroi agit directement sur les lymphocytes B et favorise leur division et la production d'anticorps.

JAIN (74) étendant son étude sur la structure antigénique à tous les sérotypes de *Listeria monocytogenes* obtient plusieurs fractions antigéniques par différentes extractions : à l'acétone, à la soude, et précipitation à l'acide trichloracétique. Ces fractions sont constituées d'hydrates de carbone et de protéines qui sont fortement antigéniques et donnent 5 bandes de précipitation lorsqu'elles sont testées vis à vis des sérums homologues en immunodiffusion sur gel.

COOPER et coll (28) obtiennent 16 fractions à partir d'une souche sérotype 5 par précipitation au sulfate d'ammonium et extraction au chloroforme. 7 de ces fractions ont une action abortive chez la souris. Les 16 fractions antigéniques possèdent un pouvoir immunogène (production faible d'agglutinine et production forte de précipitine chez le lapin).

CHAPITRE III :

POUVOIR PATHOGENE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

POUVOIR PATHOGENE DE LISTERIA

I POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL

Cobaye, souris et lapin sont les animaux les plus utilisés pour cette étude ; l'effet obtenu après infection expérimentale dépend de l'espèce et de l'âge de l'animal, de la souche utilisée, de la dose et de la voie d'injection (79 -47).

L'injection intrapéritonéale d'une souche virulente, à dose suffisante provoque chez la souris une septicémie mortelle. A l'autopsie, on trouve des lésions nodulaires dans tous les viscéres, avec prédominance au niveau du foie, de la rate (120) et des surrénales (42). L'histologie montre alors des foyers de nécrose cellulaire entourés de polynucléaires, avec infiltration caractéristique par des cellules mononuclées. *Listeria monocytogenes* est retrouvée dans le foie et la rate de l'animal (65).

L'instillation conjonctivale entraîne chez l'animal une kérato-conjonctivite avec oedème des paupières, suppuration et forte purulence de l'oeil. Ce test est utilisé pour le diagnostic spécifique de listériose. Praticqué chez le lapin, cela constitue le test de PONS et JULIANELLE (122) ; chez le cobaye, il est appelé test d'ANTON (2).

En pratique, ce test consiste soit à déposer sur la cornée une ou deux gouttes de bouillon de culture de 24 heures, soit à frictionner la conjonctive avec un écouvillon trempé dans la culture de germes. La kérato-conjonctivite commence en moins de 48 heures et, dans le pus qui s'écoule, on retrouve facilement le bacille.

La contamination du tractus respiratoire par des aérosols de suspension bactérienne détermine chez la souris des manifestations léthales de type broncho-pneumonie ou de septicémie (79).

Le pouvoir pathogène expérimental chez l'animal gravide est peu utilisé du point de vue du diagnostic, mais ce cas est intéressant à considérer pour l'étude pathogénique. La maladie expérimentale reproduit souvent ce que l'on observe en pathologie humaine ; interruption de grossesse plus ou moins tardive, mort-nés, ou infections néonatales.

II LE POUVOIR PATHOGENE CHEZ L'HOMME

La virulence de *Listeria monocytogenes* fait intervenir les toxines en particulier l'hémolysine. Mais les travaux (87) ont cherché à préciser si le pouvoir pathogène était lié à la virulence de *Listeria monocytogenes* et/ou à l'état physio-pathologique de l'hôte.

Listeria monocytogenes est qualifiée de germe "opportuniste" devenant pathogène chez l'homme qui présente un terrain prédisposé. Selon GRAY et KILLINGER (65) un nombre assez important de malades atteints de listériose présente une affection préalable (diabète, maladies néoplasiques, affections hépatiques, cirrhoses). Les traitements immuno-supresseurs, corticoïdes constituent une cause favorisante essentielle de la listériose de l'adulte. La listériose est ainsi devenue une complication redoutable et quasi-classique de la pathologie des greffes d'organes, ces sujets recevant habituellement de tels traitements, et ceci de façon prolongée (24 - 159 - 109).

Par ailleurs la listériose peut survenir au cours des états physiologiques suivants :

- nouveau-né
- grossesse
- vieillard

Tous ces états qu'ils soient pathologique, thérapeutiques ou physiologiques co-existent avec une insuffisance des défenses immunitaires du sujet (52). Les manifestations pathologiques engendrées par *Listeria monocytogenes* sont très diverses et se présentent soit comme des infections généralisées septicémiques, soit comme des infections localisées, ou encore infections inapparentes (52).

Listeria monocytogenes possède un certain tropisme pour le système nerveux, le système réticulo-endothélial et l'appareil génital (110) ce qui explique que les formes cliniques d'origine obstétricale soient si fréquentes (162).

LA LISTERIOSE DE LA FEMME ENCEINTE

La listériose de la femme est importante à connaître en raison de son retentissement sévère sur le fœtus (43) ou le nouveau-né. Mais elle est souvent difficile à diagnostiquer (37) chez la mère, où les tableaux aigus (méningites et septicémies) sont rares, alors que les formes latentes ou inapparentes (52) sont beaucoup plus fréquentes.

Il semble que la femme enceinte soit prédisposée à l'infection listérienne. De nombreux auteurs (40) en effet, estiment que la fréquence de la listériose est plus importante au cours de la grossesse que chez la femme normale. Cette fréquence peut avoir une double origine :

- soit la mère présente une infection chronique, inapparente, réactivée par la grossesse ;
- soit la grossesse est un facteur prédisposant pour *Listeria monocytogenes*.

Si on se réfère à l'expérimentation animale, il semble que la deuxième hypothèse soit retenue, car dans la plupart des

cas (chez la lapine ou chez la brebis) une dose sans effet clinique sur le mâle ou la lapine non gravide provoque lorsque l'animal est en cours de gestation, un avortement ou la naissance d'animaux malades. En fait, il semblerait plutôt que la grossesse révèle une infection qui sinon serait restée inapparente.

I MANIFESTATIONS CLINIQUES CHEZ LA FEMME ENCEINTE

La méningite aiguë reste exceptionnelle dans la littérature : SEELIGER (142) rapporte un cas, celui d'une primipare atteinte de méningite aiguë.

Les septicémies sont plus fréquentes réalisant un syndrome infectieux aigu, fièvre, frissons (20 - 72 - 18). Ces deux cas sont assez rares (155).

Les formes apparemment banales sont plus fréquentes ; elles passent inaperçues, ne se révélant que par leurs conséquences sur l'évolution de la grossesse ; tout au plus peut-on noter un épisode infectieux, de type grippal, ne durant que 24 à 48 heures. L'épisode fébrile survient soit au cours de la grossesse entre le 5ème et le 8ème mois et il est alors souvent négligé, soit au cours d'un deuxième épisode juste avant ou lors de l'accouchement, qui est le plus

souvent prématuré. D'autres symptômes peuvent se voir au cours de la grossesse :

- des signes génitaux, notamment leucorrhées (37) ;
- des signes urinaires : soit cystite, soit pyélonéphrite ;
- des signes digestifs : diarrhées légères, gastro-entérites banales avec vomissements (29) ;
- des signes rhinopharyngés ou oculo-glandulaires.

D'une façon générale toute la symptomatologie de la listériose chez la femme enceinte disparaît après l'accouchement ou l'avortement (18).

II LES CONSEQUENCES DE LA LISTERIOSE MATERNELLE

Contrastant avec l'état bénin habituel de l'infection maternelle, les conséquences ovulaires sont redoutables (72). Selon la date de la contamination de la femme, et ses possibilités de défense naturelle, la grossesse est arrêtée plus ou moins précocément ou évolue jusqu'à terme.

L'avortement survient préférentiellement au cours du 2ème trimestre de la grossesse (16). Il est fébrile ou précédé de quelques jours par un épisode pseudo-grippal. GRAY (65) rapporte un cas d'avortement plus précoce survenu au cours du 2ème mois de la grossesse.

L'accouchement prématuré est souvent fébrile lui aussi ou précédé des symptômes déjà décrits lors de la listériose maternelle. L'enfant naît souvent atteint. L'accouchement peut être à terme avec ou sans fièvre. Le foetus peut être mort in utéro, ce dernier cas pouvant survenir à n'importe quel terme (43 - 72). Le foetus peut être expulsé mort, parfois macéré.

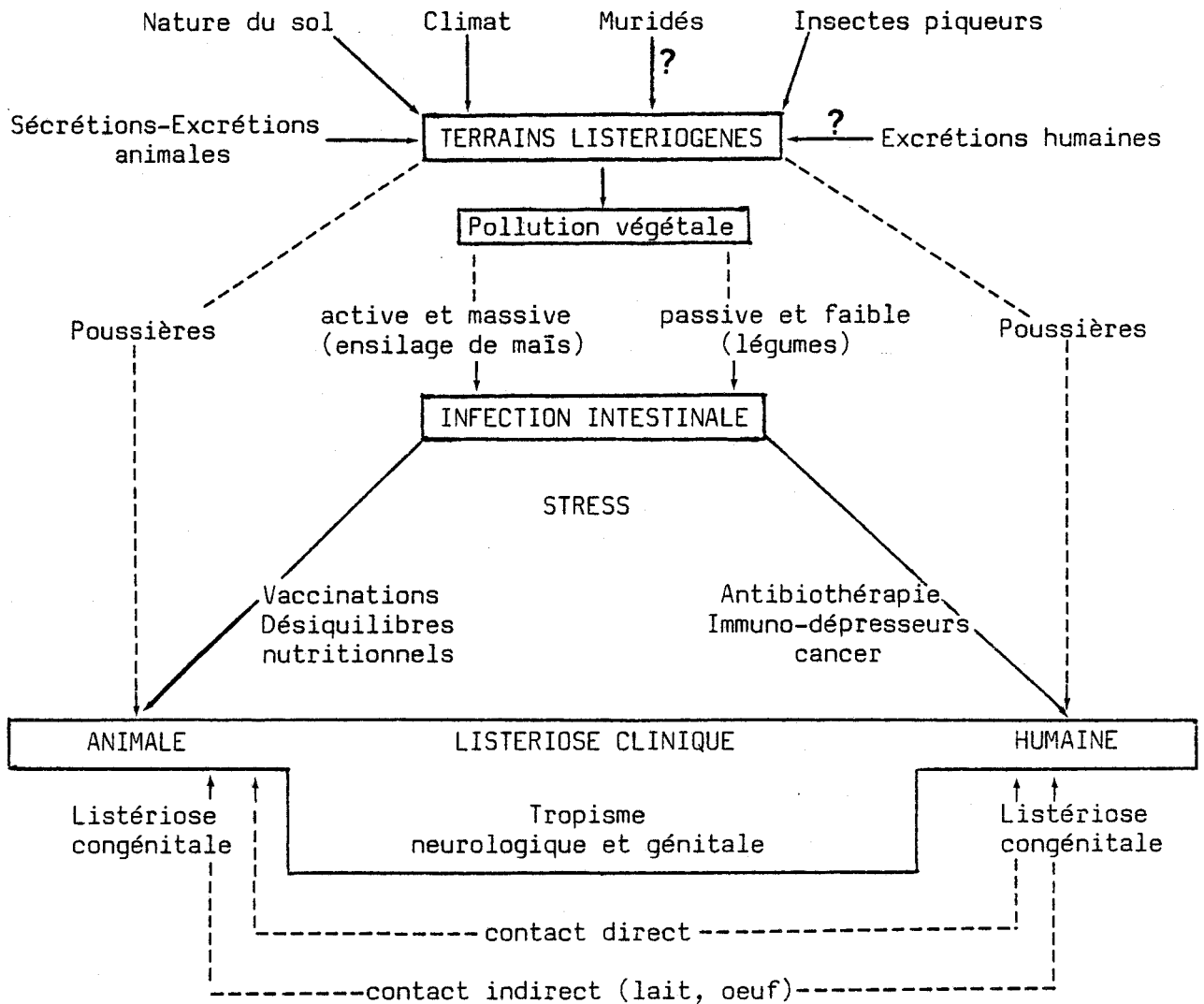
III MODE DE CONTAMINATION DE LA FEMME ENCEINTE

La femme enceinte se contamine pendant la grossesse de multiples façons (ingestion d'aliments insuffisamment cuits, etc...). Elle se contamine comme l'ensemble de la population : un schéma publié par MAUPAS (94) permet de résumer l'épidémiologie de *Listeria monocytogenes*, qui, il faut bien le reconnaître, n'est pas très bien connue.

De plus la contamination peut être antérieure à la grossesse et avoir entraîné la formation d'un foyer latent génital. Ce dernier cas soulève le problème de l'atteinte ovulaire itérative qui entraîne des avortements à répétition.

IV CONSEQUENCE SUR L'AVENIR OBSTETRICAL DE LA FEMME ; AVORTEMENT A REPETITION

Il s'agit d'un point très discuté. Dans la littérature, on ne retrouve que quelques cas de listérioses répétées au cours de



SCHEMA EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE D'APRES MAUPAS ET COLL (94)

MAUPAS dans son schéma insiste sur la différence entre la listériose. "Infection intestinale" et la listériose "clinique" ; en effet *Listeria monocytogenes* a pu être isolée de selles de sujets ne présentant aucun trouble. Ce sont des porteurs sains.



grossesses successives (64). Les résultats rapportés par RAPPAPORT et coll (129) avaient ému l'opinion : ces auteurs avaient en 5 mois isolé *Listeria monocytogenes* des sécrétions cervico-vaginales de 25 femmes parmi 34 qui présentaient des antécédents d'avortement à répétition. Mais les publications récentes (72) permettent de mettre en doute l'existence d'une atteinte ovulaire itérative, liée à un portage cervico-vaginal chronique. En effet, *Listeria monocytogenes* n'est jamais retrouvée dans les prélèvements vaginaux (72) pratiqués en dehors ou au cours de la grossesse. L'incidence de la listériose dans l'avortement à répétition est certainement limitée.

LA LISTERIOSE NEO-NATALE

La listériose néo-natale est une des formes les plus fréquentes de la listériose humaine (99). Depuis que COULOMBIER (29) a rapporté le premier cas français de méningite chez le nouveau-né, les publications se sont multipliées.

La forme clinique la plus anciennement connue est la septicémie néo-natale déjà décrite par BURN (21), puis par REISS (131) la "*granulomatosis infantiseptica*" qui correspond à une septicémie à localisations multiples d'une extrême gravité, à début précoce, et qui survient le plus souvent chez les prématurés.

Le début peut survenir après quelques heures, ou jours de vie ; l'enfant naît prématuré avec des signes de détresse respiratoire ou de souffrances cérébrales et meurt rapidement.

Parfois l'enfant paraît normal à la naissance mais son état s'aggrave dans les heures qui suivent. Certains signes évocateurs d'une méningite aiguë apparaissent ; l'enfant survit quelques jours seulement. Ces deux aspects de l'infection néonatale à *Listeria* la rapproche de celle due au streptocoque du groupe B avec une forme tardive et une forme précoce (53).

Le nouveau-né d'aspect normal à la naissance peut aussi dans le courant des trois semaines suivantes ou après un intervalle de trois jours, présenter une infection qui évolue sous la forme d'une méningite néonatale isolée ; après traitement et guérison apparente, des séquelles sont possibles.

I MODE DE CONTAMINATION DES NOUVEAU-NES

1.1 La transmission materno-foetale peut être intra-utérine selon trois voies classiques (99 - 19) :

- la voie hématogène transplacentaire, avec envahissement placentaire, puis foetal au cours de la septicémie maternelle ;
- la voie ascendante à partir d'une infection cervico-vaginale (foyer latent génital) gagnant de proche en proche les membranes et le liquide amniotique.

Ces deux modes de transmission sont responsables de la forme septicémique néo-natale, avec ou sans méningite, et avec localisations broncho-pulmonaires et digestives par l'intermédiaire du liquide amniotique infecté.

- la troisième voie est la contamination locale transmembranaire à partir d'un foyer infectieux.

1.2 La contamination peut être post-natale. Le nouveau-né peut être contaminé au moment de l'accouchement par des germes présents dans le vagin maternel. Dans ce cas, l'enfant s'infecterait par voie aérienne et présenterait surtout des formes localisées ou des formes méningées. Cependant, il est rare de mettre en évidence *Listeria monocytogenes* dans les voies génitales maternelles avant l'accouchement (16). Cette forme de contamination semble donc peu fréquente.

CHAPITRE IV :
IMMUNITE CELLULAIRE

IMMUNITE CELLULAIRE

L'immunité cellulaire joue un rôle important dans la résistance aux infections bactériennes dues à des micro-organismes à développement intracellulaire facultatif (120) comme *Listeria monocytogenes*.

I IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE

SEELIGER (142) fait remarquer l'absence de corrélation entre le taux d'anticorps et la gravité de l'infection.

De nombreux auteurs (111 - 90 - 170 - 98 - 67 - 3 - 127) ont été incapables de protéger des lapins ou d'autres animaux par des suspensions tuées ou formolées de *Listeria monocytogenes*. Ils ont de même été incapables de démontrer une protection par des sérums à hauts titres préparés à partir de bactéries vivantes ou tuées. Ces sérums ne transmettent aucune résistance à l'infection. MACKANESS (90) et NORTH (108) ont démontré qu'à la suite de l'inoculation intraveineuse de *Listeria*, les micro-organismes survivent et se multiplient à l'intérieur des macrophages et, sont ainsi inaccessibles aux anticorps humoraux (127).

Cependant des souris recevant des doses subléthales de souches virulentes de *Listeria monocytogenes* sont immunes si on les infecte avec des bactéries vivantes (98 - 170). En effet, dans beaucoup d'infections dues à des micro-organismes intracellulaires, la guérison de la primo-infection et la résistance à une infection ultérieure dépendent d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (120). Cette immunité cellulaire peut être transférée par injection de lymphocytes provenant d'animaux sensibilisés (120 - 170).

II IMMUNITE NON SPECIFIQUE

MACKANESS (90) découvre que les macrophages d'une souris qui survit à une infection listérienne, sont résistants à *Listeria* (ces macrophages apparaissent pendant l'infection et cette apparition coïncide avec l'arrêt de la multiplication du germe dans la rate). Ces macrophages permettent une réponse accélérée à une nouvelle infection : c'est une immunité cellulaire. Cette immunité se développe vis à vis d'agents infectieux sans rapport avec celui qui est responsable de l'immunisation, c'est une immunité cellulaire non spécifique ; elle peut être produite par l'inoculation de *Listeria*, de *Salmonella* (3) et même de *Candida* (93).

Dans le cas de *Salmonella*, on a pu démontrer chez la souris que la résistance cellulaire provient de l'adsorption d'anticorps spécifiques à la surface de macrophages. Ce mécanisme pourrait expliquer dans une certaine mesure l'absence d'anticorps circulants.

Dans le cas de *Listeria* ce mécanisme ne suffit pas pour expliquer les faits suivants. Le transfert de macrophages tués ne confère aucune résistance. Celle-ci étant liée à la présence exclusive et à la prolifération des macrophages. Ce processus d'immunité cellulaire est conditionné par une réaction antigène-anticorps. Si un animal est infecté par *Listeria monocytogenes*, il développe une résistance cellulaire non spécifique, mais la modification des macrophages qui conduit à cette résistance est un phénomène spécifique qui dépend (98) :

- de l'état de réactivité immunologique de l'hôte ; ce phénomène est inhibé par l'action des immuno-suppresseurs (125) ;

- de la réaction anamnesticque qui ne se produit que par la réintroduction du germe qui avait été utilisé la première fois, selon une réaction de type antigène-anticorps. Il faut donc supposer que le germe transforme le monocyte normal en un monocyte résistant et que cette transformation est une réaction du type antigène-anticorps, la résistance acquise étant par ailleurs non spécifique.

RODRIGUEZ (134) suggère que la résistance induite par des extraits de paroi de *Listeria monocytogenes* est au moins en partie spécifique. Car cette résistance après infection par l'organisme immunisant serait beaucoup plus grande que l'infection

par un autre organisme. Bien que l'induction de la résistance par des bactéries tuées soit difficile à démontrer, une résistance significative a été démontrée chez des souris immunisées par les formes L de *Listeria monocytogenes* (12).

KLASKY (82) décide d'isoler et d'identifier l'immunogène spécifique de *Listeria monocytogenes* pour expliquer le mécanisme de l'immunité. Il obtient une fraction protéique, immunogène mais faiblement antigénique. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait suivant : il est probable que la fraction antigénique soit différente de la fraction immunogène, localisée en des points différents de la cellule ; de plus les animaux immunisés ont de faibles taux ou pas d'anticorps circulants.

KLASKY (82) suggère que la résistance à *Listeria* est de type médiation cellulaire par l'intermédiaire des lymphocytes T, immunologiquement spécifiques. Ces cellules sont supposées répondre à l'antigène en sécrétant des lymphokines qui activent les macrophages de façon non spécifique pour phagocyter et tuer les bactéries infestantes. L'activation des macrophages est un processus dépendant du thymus. On pourrait supposer que les animaux athymiques soient très sensibles à l'infection à *Listeria*. Cependant, on a montré que des souris thymectomisées, ou traitées avec un sérum anti-thymocyte ne montrent pas une sensibilité frappante durant les cinq jours après l'infection listérienne (170 - 149 - 46).

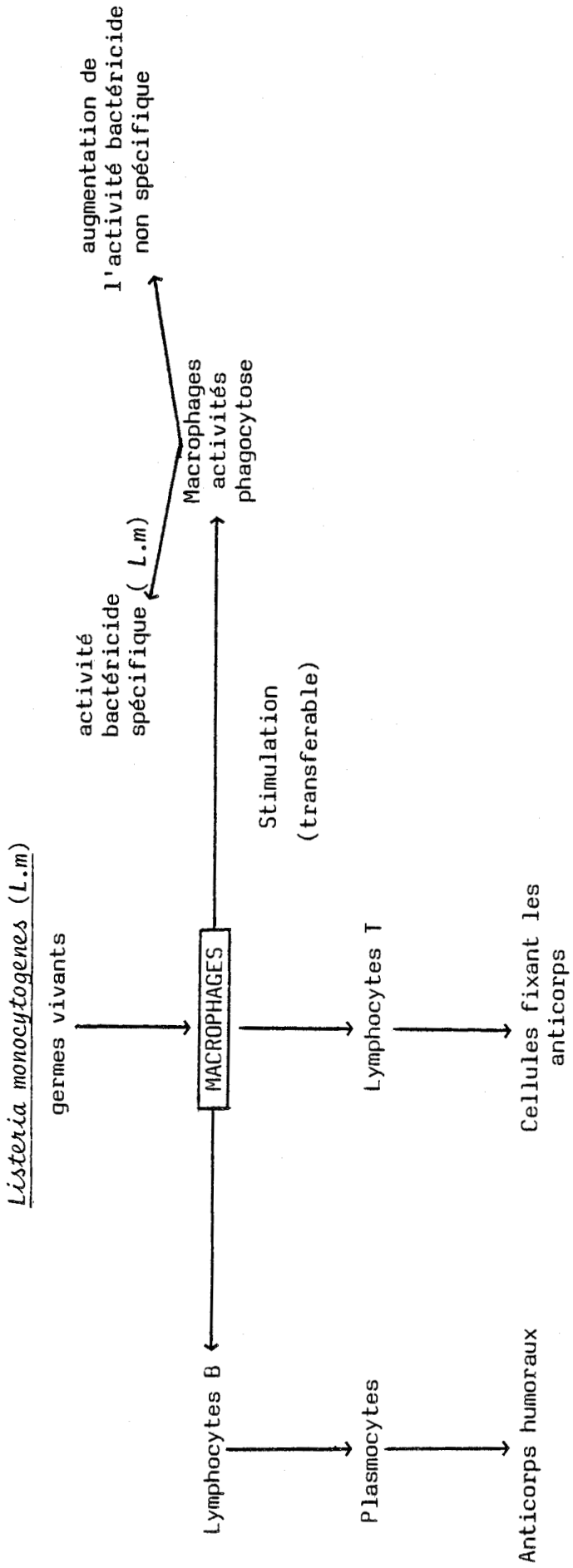


FIGURE 4 : SCHEMA RESUMANT LE MECANISME DE L'IMMUNITE CELLULAIRE DE LISTERIA MONOCYTOGENES (125)



CHAPITRE V :
DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA LISTERIOSE

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA LISTERIOSE

L'étude sérologique de la listériose a donné lieu à de très nombreux travaux (142) qui sont souvent contradictoires. Le problème est complexe car les différentes techniques sérologiques sont pratiquées à partir de préparations antigéniques variables, différentes selon les auteurs et les résultats ne sont donc pas comparables. De sorte que, comme le dit GRAY (65) "des légions de publications" issues de tous les coins du monde sont sorties quant à la sérologie de *Listeria monocytogenes*, que tous les types de réactions sérologiques ont été étudiées, mais que deux d'entre elles seulement sont les plus couramment employées (34) : la réaction d'agglutination, et la réaction de déviation du complément (142).

I REACTION D'AGGLUTINATION

Cette réaction est utilisée par de nombreux auteurs (65) pour le sérotypage des souches de *Listeria monocytogenes*, et pour le séro-diagnostic afin de déceler la présence et le taux des agglutinines sériques.

La réaction d'agglutination se heurte à des difficultés techniques. La préparation des antigènes somatiques O et flagellaires H nécessite des méthodes de cultures particulières.

1.1 Propriétés des antigènes flagellaires et somatiques

ROBBINS et GRIFFIN (132) ont étudié les antigènes O et H et leurs anticorps correspondants. Certaines précautions doivent être prises pour la préparation des solutions antigéniques.

Un faible chauffage, l'addition de formaldéhyde, de chloramine T, de merthiolate (éthyl mercurithiosalicylate de sodium) ou de phénol n'ont pas d'effet sur la production d'antigène H. Cependant le facteur A est détruit par la chloramine T, le merthiolate et le phénol ; le facteur C est très légèrement atteint par le merthiolate à l'exception du facteur III.

Les facteurs O ne sont pas affectés par un chauffage à 100° C (54) ou par une forte concentration d'alcool.

Les anticorps anti-facteurs H : A, B, C et D apparaissent très tôt, mais le facteur A tend à décroître très vite. L'anticorps anti-facteur C apparaît plus tard mais il se développe rapidement. La production d'anticorps contre les facteurs O est peu variable, particulièrement contre le facteur III qui reste longtemps bas mais qui atteint des taux relativement élevés après la cinquième semaine.

OSEBOLD et coll (112) démontrent l'existence d'une substance protéique en surface qui empêcherait les antigènes traités à la chaleur de s'agglutiner. Le traitement des cultures par la trypsine à la concentration de 0,1 p100 modifie la couche protéique la plus externe de la paroi des germes, supprime cet effet et augmente la spécificité des préparations d'antigènes somatiques. Il est préférable d'éviter le phénol puisqu'il favorise l'auto-agglutination.

1.2 Préparation des antigènes flagellaires H et somatiques O pour la production des sérums et les tests d'agglutination

Pour les antigènes flagellaires H, une culture très mobile est indispensable. Pour cela, DONKER-VOET (35), recommande d'inoculer les cultures sur des boîtes de Pétri contenant peu d'agar (5 p100), incubées à la température du laboratoire 22° C pour avoir le maximum de mobilité. Les cultures sont transférées en milieu liquide, puis inoculées sur gélose molle "humide", pour faciliter l'agglutination par les immun-sérums homologues.

Les bactéries sont traitées par le formol à une concentration de 0,25 à 0,30 p100. La suspension antigénique ainsi obtenue après 24 heures d'incubation à 37° C peut être utilisée soit pour l'immunisation des lapins, soit pour les tests d'agglutination.

Pour les antigènes somatiques O, les cultures en milieu solide sont incubées à 37° C de façon à empêcher la formation des antigènes flagellaires pendant 24 - 36 heures d'incubation. Les cultures sont lavées en eau physiologique. L'extraction antigénique se fait au bain marie à une température de 100° C pendant une heure (141). La suspension antigénique est faite dans un tampon phosphate pH 7,2 et est utilisée pour l'immunisation des lapins et les tests d'agglutination.

1.3 La séro-agglutination

Au cours d'une infection à *Listeria*, se développent souvent chez l'homme ou l'animal, des anticorps sériques contre les antigènes O et H, que l'on peut mettre en évidence, qualitativement et quantitativement par agglutination. Les antigènes O et H sont ajoutés à des concentrations décroissantes de sérum. Les agglutinations O sont finement granuleuses, les agglutinations H sont floconneuses et peuvent être dissociées.

a) Résultats

La présence très fréquente des agglutinines anti-*Listeria* dans les sérums humains pose le problème de la spécificité des agglutinines, étant donné que *Listeria monocytogenes* possède des communautés antigéniques avec de nombreux germes Gram positif (142).

L'un des inconvénients majeurs du test d'agglutination est l'existence des réactions croisées avec des Streptocoques hémolytiques, et Staphylocoques (*epidermidis* et *aureus*).

SEELIGER et coll en 1957 (137) ont montré que les antigènes O thermostables de type 1 et 3 donnent des réactions croisées avec les Streptocoques du groupe D et les Staphylocoques dorés. Ces réactions sérologiques communes sont dûes en partie à la présence de l'antigène de RANTZ (128).

Dans ce cas, une saturation des sérums par une souche de *Staphylococcus aureus* est utile. L'absorption par une culture de Staphylocoques a un effet relativement faible sur les agglutinines du type 1, elle supprime complètement toute trace d'agglutinines de type 3 de *Listeria monocytogenes*. Des réactions croisées surviennent aussi avec des bactéries de type 4 mais elles sont moins gênantes que celles rencontrées avec les autres types. Les souches tuées au formol donnent également des réactions croisées mais à un degré moindre que les souches tuées à la chaleur.

WELSHIMER (168) démontre des réactions croisées entre *Listeria monocytogenes* formolées et *Staphylococcus epidermidis*. Quand les lapins sont immunisés contre *Staphylococcus epidermidis* et infectés trois mois après par *Listeria monocytogenes*, il y a

une nette augmentation du titre en anticorps anti-Staphylocoque. De même quand les lapins sont immunisés par *Listeria monocytogenes* et infectés après par *Staphylococcus epidermidis*, il y a une nette augmentation du titre en anticorps anti-Staphylocoque. Ceci suggère fortement que ces bactéries ont en commun un ou des antigènes.

b) Conclusion

Beaucoup de sujets apparemment sains ont des agglutinines anti-*Listeria* mais il est impossible de déterminer leur signification. Dans la plupart des cas, les titres d'anticorps atteignent, au maximum, une valeur limite de 1:160.

En général, des anticorps dans un sérum sont la marque d'un contact précédent avec l'antigène spécifique ; puisque *Listeria monocytogenes* peut donner des réactions croisées, ces anticorps ne sont pas obligatoirement spécifiques de *Listeria*, particulièrement en ce qui concerne les titres bas.

En fait, il y a grand intérêt dans ces cas à pratiquer une absorption des sérums par les Staphylocoques et Streptocoques du groupe D (142).

SEELIGER (142) considère qu'en l'absence de symptômes cliniques évidents, ne sont pris en considération que les taux égaux ou supérieurs à 1:320. Le test d'agglutination n'a de valeur que si l'on observe une augmentation du titre d'anticorps pendant la durée de convalescence de ce qui semble être une listériose ; une élévation simultanée des agglutinines anti O et anti H serait de bonne valeur.

Mais en général le taux de ces deux types d'anticorps (anti H et anti O) ne varie pas de façon parallèle, les anticorps anti H n'atteignent un haut titre qu'une fois que les anticorps anti O ont atteint ou même dépassé leur titre maximum (49).

Pour ces raisons d'autres précautions doivent être prises dans l'interprétation sérologique de listériose. En fait, il faut répéter l'examen à 15 jours d'intervalles de façon à suivre la cinétique des anticorps.

c) "Les agglutinines froides"

KORN (83) observe une activité remarquable des "agglutinines froides" dans le sérum de malades présentant une méningite listérienne confirmée. Ces sérums sont testés par des solutions antigéniques préparées à partir des cultures de *Listeria*.

tuées à la chaleur. Les agglutinines croissent puis chutent de façon parallèle aux titres d'agglutination durant l'évolution de la maladie. Ces agglutinines peuvent également être produites expérimentalement chez le lapin et leur évolution suit le même schéma que le test d'agglutination. KORN (83) suggère que si des agglutinines froides sont formées durant l'infection listérienne, elles peuvent donner lieu à des réactions faussement positives dans la méthode de PAUL BUNELL DAVIDSON.

HOEPRICH (142) applique la méthode de DAVIDSON modifiée ; les agglutinines froides révèlent les anticorps spécifiques de *Listeria monocytogenes*. Cependant, d'autres auteurs (65) n'ont jamais été capables de démontrer l'existence de ces agglutinines dans les sérums de patients présentant une listériose.

II REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

Indépendamment mais simultanément, SEELIGER (142) et PATOCKA (65) développent des tests pour la détection des anticorps anti-*Listeria* fixant le complément. Ils utilisent des extraits acides de *Listeria monocytogenes* à partir des lysats préparés par congélation et décongélation successives des suspensions de cultures bactériennes tuées par le merthiolate.

La réaction est réalisée avec des antigènes somatiques O phénolés, après exposition des cultures de *Listeria monocytogenes* aux ultra-sons et hautes températures (142). La réaction est positive si l'hémolyse du système révélateur ne peut se faire, c'est à dire si le complément a été fixé préalablement par le complexe antigène-anticorps.

2.1 Résultats

La réaction de déviation du complément reste souvent négative dans des cas de listérioses bactériologiquement prouvées. Elle est due à l'apparition d'anticorps qui ne persistent à un taux appréciable que peu de temps.

On trouve rarement des réactions de fixation du complément fortement positives (49). Les titres ne dépassent guère 80 à 160 et un titre de 10 est considéré comme significatif. Comme dans la réaction d'agglutination, la fréquence des réactions croisées avec les antigènes staphylococciques oblige à être particulièrement prudent dans l'interprétation des résultats. Dès lors, SEELIGER (142) considère donc ce test comme spécifique si les sérums ont été absorbés avec les antigènes de Staphylocoque et de Streptocoque. Cependant, la saturation du sérum de patient avec Staphylocoque peut provoquer l'épuisement des anticorps anti-*Listeria*. Le test d'absorption peut ainsi, parfois, donner de faux négatifs si les anticorps formés sont

des anticorps anti-antigène du groupe, qui est commun à *Listeria* et aux Staphylocoques. Dans de tels cas, la mise en évidence d'agglutinines H, qui présentent une spécificité plus importante, peut aider au diagnostic (49). Par conséquent, en raison de ces difficultés, il est recommandé de faire conjointement les deux réactions d'agglutination et fixation du complément.

2.2 Conclusion

La réaction de déviation du complément est peu utilisée par rapport à la séro-agglutination ; c'est une réaction spécifique mais peu sensible (101) qui requiert une grande standardisation et rares sont les laboratoires qui la pratiquent (49).

Afin d'associer la spécificité des antigènes solubles à la sensibilité des réactions d'agglutination et de faciliter la lecture des résultats, BIND (14) utilise l'antigène somatique soluble extrait à l'acide trichloroacétique selon la technique de BOIVIN ; l'antigène est fixé par le chlorure de chrome sur les hématies de mouton (38). La présence d'anticorps dans les sérums à tester provoque une hémagglutination passive. Pour objectiver la lecture des résultats, l'addition de complément entraîne une lyse des hématies agglutinées et l'hémoglobine libérée est dosée par spectrophotométrie. Les résultats sont donnés par la différence de densité optique (ΔDO) obtenue par rapport à un témoin sérum négatif (14).

Cette technique mise au point chez l'animal n'a pas pu être utilisée pour le diagnostic de la listériose humaine.

III REACTION DE PRECIPITATION

Cette réaction peut être utilisée pour le sérotypage et le séro-diagnostic.

MURASHI et TOMPKINS (103) ainsi que METZGER (96) ont démontré la présence des précipitogènes d'origine somatique obtenus par traitement des cultures de *Listeria monocytogenes* à l'éther.

SEELIGER (142) rapporte des réactions croisées entre les précipitogènes de *Streptococcus faecalis* et *Listeria monocytogenes*. La réaction réciproque n'est pas vérifiée ce qui suggère que le test de précipitation pourrait avoir des avantages sur le test d'agglutination.

L'immunoprécipitation en gel (115) s'avère une méthode qui est "pleine d'avenir" pour établir un diagnostic rapide de listériose. Déjà DREW (36) en 1946 à partir des extraits polysaccharidiques de *Listeria monocytogenes* spéculait sur le fait que si ces polysaccharides étaient libérés dans le liquide céphalo-rachidien des malades atteints de méningite un test de précipitation pourrait être réalisable.

IV REACTION D'HEMAGGLUTINATION

Des travaux de SACHSE et POTEL (137) sur l'hémagglutination utilisant des érythrocytes de poulet, de mouton et d'homme du groupe O, ont montré des réactions croisées avec les Streptocoques du groupe D et *Listeria monocytogenes* de type 1.

NETER (104) en utilisant le test d'hémagglutination démontre la présence de l'antigène de RANTZ (128) commun à de nombreuses bactéries Gram positif dans les souches de *Listeria monocytogenes*. Ce qui confirme les inquiétudes quant à la validité de ce test sérologique pour les listérioses.

V REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE

Cette méthode décèle des antigènes précipitants par l'emploi d'antisérums spécifiques conjugués à l'isothiocyanate de fluoresceine (150 -81). Cette technique pourrait être employée comme moyen de dépistage de la listériose chez la femme enceinte et chez le nouveau-né (méconium, liquide céphalorachidien). Cette technique permet un diagnostic rapide, mais CHERRY et MOODY (27) démontrent le manque de spécificité des immun-sérums fluorescents jusqu'alors à la disposition des laboratoires.

VI TEST DE CROISSANCE

Préconisé par POTEL et DEGEN en 1960 (124), il consiste à cultiver les bactéries en présence de dilutions connues d'anti-sérum spécifique en bouillon nutritif ; aux basses dilutions les bactéries cultivent, s'agglutinent et forment des masses floconneuses laissant un bouillon clair. Aux fortes dilutions, seul un dépôt se forme avec un bouillon restant plus ou moins trouble. Si le trouble est uniforme avec un bouillon de culture présentant juste un petit bouton de croissance à la base, on considère que le test de croissance est négatif. Le test peut être considéré comme satisfaisant pour le diagnostic sérologique avec un titre significatif au 1:50.

DESPIERRES reprend le test de croissance en 1971 (34) pour l'adapter à la réaction d'agglutination en gélose nutritive en présence de sérum à examiner. Elle démontre que la réaction sur gélose donne des résultats plus spécifiques du fait de communautés antigéniques moindres avec d'autres germes. Cependant, la réaction d'agglutination sur gélose ne peut mettre en évidence des agglutinines H, en raison de la concentration élevée en gélose du milieu de culture, de la température de culture (37° C). Tous ces facteurs défavorisent fortement le développement de la ciliature des germes.

De plus cette technique nécessite l'entretien de cultures parfaitement "smooth" et l'emploi de bactéries vivantes comme antigène de *Listeria monocytogenes* ne semble pas le moyen le plus adéquat pour le séro-diagnostic de la listériose.

VII CONCLUSION

Le diagnostic de listériose ne peut se fonder uniquement sur ces réactions sérologiques car beaucoup de sujets apparemment sains ont des anticorps agglutinants de *Listeria monocytogenes*, à des taux faibles. Etant donné les réactions sérologiques croisées (168 - 141 - 142) que nous avons signalées, ces anticorps peuvent aussi bien correspondre à une infection banale à Staphylocoque ou à Streptocoque qu'à une listériose ancienne. C'est pour cette raison qu'en matière de diagnostic sérologique, il faut exiger un taux élevé d'anticorps avant d'admettre l'existence d'une listériose récente ou en cours.

Inversement, comme nous l'avons vu, les réactions sérologiques (agglutination ou fixation du complément) peuvent être négatives dans des cas de listériose bactériologiquement prouvée. Il est difficile de savoir si ceci est dû à l'absence de formation d'anticorps ou au fait que la technique utilisée n'a pu les mettre en évidence. Il est utile de déterminer la nature des anticorps décelés dans la listériose (16).

Le traitement des sérums par le 2 mercapto-éthanol (157 - 113) selon la technique de UHR et FINK-ELSTEIN (160) assure la différenciation des IgG et des IgM.

ARMSTRONG et SWORD (4) ont trouvé chez la lapine après une listériose expérimentale, des anticorps de deux types ; IgG et IgM dont le rapport est assez stable dans un cas donné, mais variable selon les sujets d'expérience. Les tests d'agglutination détectent classiquement les IgM (19 S) dans un premier temps, puis dans un deuxième temps les IgG (7 S).

Cependant AALUND et coll (1) rapportent que 50 à 60 p100 des anticorps agglutinants chez les animaux infectés sont les IgG (7 S).

Chez l'homme, les macroglobulines de la classe IgM sont dominantes et les anticorps IgG n'ont été décelés que lors des infections confirmées ou probables (145). Les fractions IgM sont facilement décelées par les réactions d'agglutination. Tandis que les IgG seraient responsables de l'activité précipitante (5).

Il faudrait donc logiquement utiliser ces deux types de réactions lorsqu'on cherche à faire un diagnostic sérologique (142).

La persistance des taux d'anticorps agglutinants est mal connue. Parfois les taux élevés se maintiennent plusieurs mois après une infection listérienne, rarement des années, ce qui rend difficile l'interprétation des titres élevés trouvés longtemps après une infection en particulier quand on ne dispose pas de paire de sérum.

Mais on connaît également le rôle possible de *Listeria monocytogenes* dans les déficits mentaux ou dans les cas de retard psychomoteur ; certains (65) ont trouvé un taux d'anticorps anti-listériens élevés chez des enfants atteints de débilité. Par ailleurs certains cas d'avortements où la listéria n'a jamais été isolée doivent être regardés avec suspicion.

La fréquence des formes inapparentes de listériose complique l'étude de l'incidence réelle de cette communauté antigénique sur le diagnostic sérologique des listérioses.

Cependant la sérologie a un intérêt certain ; femme enceinte présentant un épisode grippal au cours duquel la bactériologie n'a pu être faite ou est restée négative ; femme ayant des antécédents d'avortement ou d'accouchement prématuré ou dont l'enfant a eu une infection néo-natale précoce. La sérologie conduit au diagnostic d'infection maternelle et amène à instituer un traitement antibiotique jusqu'à l'accouchement.

L'abondance des techniques témoigne des insuffisances de la méthode sérologique (65 - 142) : toutes les réactions usuelles qui emploient des bactéries entières (34), comme antigène n'ont pas donné de bons résultats. Sans doute l'utilisation de réaction nouvelle utilisant des extraits bactériens comme antigène spécifique de *Listeria monocytogenes* capable de faire une bonne différenciation des immunoglobulines pourra établir un véritable diagnostic et remédier à cette déficience.

MATERIEL ET METHODES*

* Tous les milieux de culture, solutions et tampons utilisés sont répertoriés dans l'annexe technique.

CHAPITRE I :
CULTURE BACTERIENNE ET
PREPARATION DES ANTIGENES

CULTURE BACTERIENNE ET PREPARATION DES ANTIGENES

I SOUCHES BACTERIENNES ET CONSERVATION

1.1 Les souches bactériennes

Les sérovars 1 et surtout 4b sont ceux qui sont les plus fréquemment retrouvés en Europe et en France dans les listérioses humaines (123). C'est la raison pour laquelle dans notre étude nous avons choisi une souche de *Listeria monocytogenes* sérovar 4b.

- Les différentes souches de référence de la collection du Professeur H.P.R. SEELIGER ont été gracieusement fournies par le Docteur A.L. COURTIEU (Faculté de Médecine de Nantes).

- Les souches de *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* ont été isolées au Laboratoire.

1.2 Conservation des souches

Toutes les souches sont conservées par lyophilisation. Les souches bactériennes ont étéensemencées sur une gélose ordinaire qui a été incubée 18 heures à 37° C. La culture est émulsionnée dans 5 ml de lait écrémé stérilisé 20 minutes par autoclavage

TABLEAU 3

SOUCHES DE REFERENCE DE LA COLLECTION
DU PROFESSEUR H.P.R. SEELIGER

Sérotypes de <i>Listeria monocytogenes</i>	Numéro de collection donné par le Laboratoire Hospitalier de Nantes
1/2 a	095 73 1801
1/2 b	095 73 1802
1/2 c	095 73 1803
3 a	095 73 1804
3 b	095 73 1805
3 c	095 73 1806
4 ab	095 73 1807
4 a	095 73 1808
4 b	095 73 1809
4 c	095 75 1810
4 d	095 73 1811
4 e	095 75 1089
4 g	095 75 1090
4 f	095 75 1814
5	095 73 1815
6	095 73 1816
7	095 73 1817
<i>Listeria grayi</i>	



à 105° C. La suspension bactérienne est répartie sous un faible volume dans des ampoules puis lyophilisée avec un lyophilisateur USIFROID.

Avant utilisation, les germes lyophilisés mis en suspension dans du bouillon DTB sont incubés à 37° C pendant 18 heures. La culture est ensuite repiquée sur gélose ordinaire.

Entre les expériences, les souches sont conservées sur gélose à la température du laboratoire.

II LES CULTURES BACTERIENNES

2.1 Culture en erlenmeyer

La culture en vue de la production des antigènes a été effectuée dans les erlenmeyers de 4 litres de bouillon DTBensemencés par 100 ml d'une pré-culture de 24 heures à 37° C. La masse bactérienne est obtenue par centrifugation à 600 g à + 4° C pendant 20 minutes au moyen d'une centrifugeuse BECKMAN (rotor JA 10). Le contrôle de la pureté des cultures a été suivi par isolement sur milieu gélosé au sang.

Les germes sont recueillis stérilement, lavés ensuite à trois reprises par une solution d'eau physiologique stérile pour éliminer toute trace de milieu de culture.

Un erlenmeyer de 4 litres de milieu de culture fournit environ 4 grammes (poids humide) de bactéries avec *Listeria monocytogenes*. Les germes lavés sont conservés par congélation.

2.2 Culture en masse

Les cultures en fermenteur qui ont été réalisées par Monsieur DECK dans le Service du Professeur GUILLAUME permettent l'obtention d'une quantité importante de matériel bactérien. Les bactéries sont cultivées dans un fermenteur BIOLAFFITE (Gourdon-Poissy) de 15 litres de capacité. Cette méthode nécessite une pré-culture dans une fiole de 1 000 ml dont le contenu est injecté dans le fermenteur après une incubation de 24 heures. La culture se déroule sous agitation constante de 50 tours par minute et sous pression constante d'air à la température de 37° C pendant 8 heures afin d'obtenir des bactéries en phase exponentielle de croissance. Le débit de l'aération est porté à un litre d'air par volume de milieu et par minute. L'addition de l'antimousse (Bervaloïde type 5818) est indispensable pour baisser la tension superficielle. Les bactéries sont recueillies par centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse WESTPHALIA (clarificatrice KDD 600) ; ceci permet l'obtention d'environ 65 g de *Listeria* en poids humide. Les germes lavés sont conservés par congélation.

III PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES

Avant tout broyage, nous avons effectué un contrôle de la pureté de la culture par isolement sur milieu gélosé au sang.

3.1 Broyage à la X press

a) Principe de la méthode

Nous avons utilisé le culot bactérien provenant soit du fermenteur, soit des cultures en erlenmeyers. Le culot est soumis au cryobroyage à la X press selon la méthode employée par DELVALLEZ et coll (31).

Cette technique consiste à rendre les bactéries rigides et cassantes en les congelant dans la neige carbonique à une température de $- 25^{\circ}$ C. Le cryobroyage est réalisé à l'aide de la X press (LKB BIOTECH) constituée de deux cylindres symétriques en acier inoxydable pouvant recevoir le matériel bactérien. Les deux cylindres communiquent entre eux par un orifice de 2 mm de diamètre ce qui permet le passage des microorganismes éclatés. La rupture des parois bactériennes est assurée par l'action d'une forte pression.

b) Mode opératoire

Le culot bactérien est repris dans 20 ml de tampon Tris 1 stérile, additionné ou non de 10 mM $MgCl_2$. La suspension est injectée

dans la cellule de 25 ml préalablement portée à basse température dans la neige carbonique, puis broyée sous une pression de 28.10^3 psi. Chaque suspension est soumise à 6 passages consécutifs à la X press.

3.2 Homogénéisation du broyat

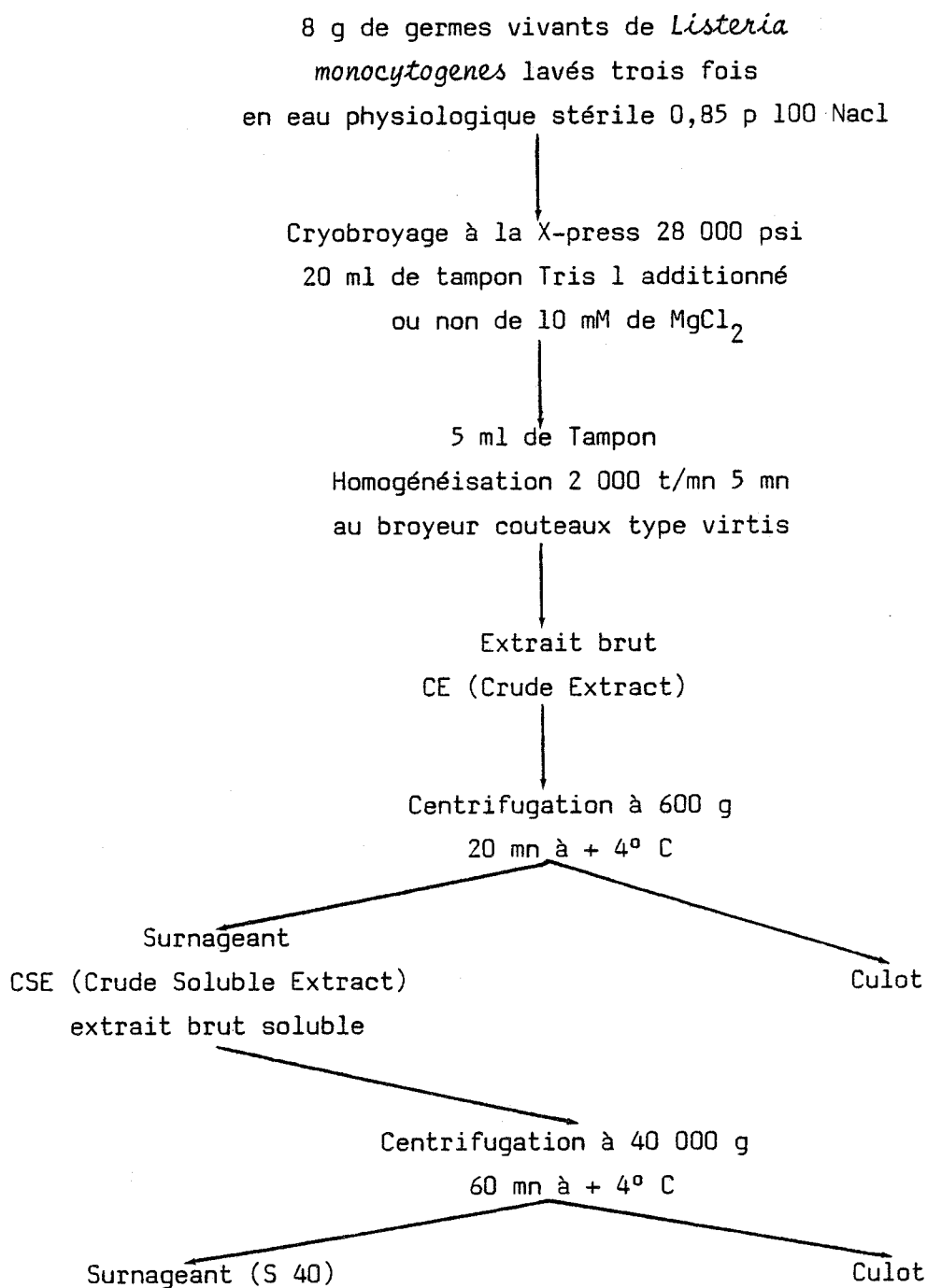
La masse broyée est traitée dans un homogénéiseur-broyeur à couteaux "Virtis 45" pendant 5 minutes à la vitesse de 2 000 tours par minute.

3.3 Préparation de l'extrait antigénique de centrifugation

Le broyat homogénéisé appelé extrait brut (CE = Crude Extract) est dans un premier temps centrifugé à 600 g pendant 20 minutes pour sédimenter les bactéries restantes. Puis une centrifugation du surnageant (CSE = Crude Soluble Extract) à 40 000 g au moyen d'une centrifugeuse BECKMAN (rotor J 20) sépare les éléments particuliers (dont les parois bactériennes) des antigènes solubles de *Listeria*. Toutes les opérations sont effectuées à une température de + 4° C (tableau 4).

TABLEAU 4

PREPARATION ANTIGENIQUE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* SEROTYPE 4



IV OBTENTION DES SERUMS

4.1 Procédés d'immunisation des lapins

Les lapins sont immunisés selon la méthode définie par VAITUKAITIS (161) qui permet d'obtenir des immun-sérums à partir de très faibles quantités d'antigènes. On choisit un lapin adulte pesant 3 à 3,5 kilogrammes exempt de toutes maladies.

Nous immunisons par lots de trois lapins (géants des Flandres-élevage Cegav) de façon à obtenir un pool de sérum. Avant d'immuniser les lapins, on leur prélève 5 ml de sérum qui sont testés par immunodiffusion contre les extraits antigéniques de *Listeria*, Streptocoque, et Staphylocoque pour vérifier l'absence de réaction immunologique vis à vis de ces germes.

Les lapins rasés sur les flancs reçoivent par voie intradermique un volume de mélange suivant :

- Solution antigénique..... 1 ml
- Adjuvant incomplet de Freund (Laboratoire Difco)..... 1 ml

On émulsionne soigneusement le mélange juste avant l'injection.

Les injections sont faites en plusieurs points sur la peau du flanc ; un rappel à lieu trois semaines après la première injection.

Les sérums sont prélevés 15 jours après la seconde injection, par saignement au niveau de la veine marginale de l'oreille. Les sérums sont conservés congelés, par aliquot de 1 ml.

Préparation des sérums immuns

- Immun-sérums anti-bactéries entières

L'antigène utilisé à été des *Listeria* vivantes à 10^9 bactéries/ml mélangé à un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund. Le lapin est protégé trois jours après l'injection de la solution bactérienne, par un traitement à la Pénicilline (1 million unités internationales) injectée une seule fois par voie intramusculaire. On procède à trois injections par voie intradermique séparées par un intervalle de trois semaines chacune.

- Immun-sérums polyvalents

Les solutions antigéniques ont été le CE, le CSE et le S 40.

- Immun-sérums monovalents

La solution antigénique injectée aux lapins a été préparée à partir d'un pic de précipitation anticorps-antigène obtenu par la technique de LAURELL (86) selon les modalités décrites par DELVALLEZ et coll (31).

4.2 Sérums humains

Ils ont été divisés en deux groupes :

- un premier groupe composé de sérums négatifs provenant de femmes enceintes, de nouveau-nés et de personnes saines ou présentant des manifestations pathologiques non listériennes.

- le deuxième groupe ; sérums positifs de femmes enceintes ; mères de nouveau-nés, nouveau-nés chez qui a été isolé *Listeria monocytogenes*.

Les sérums sont répartis en aliquots de 1 ml et congelés à - 20° C.

V DOSAGE DE PROTEINES (LOWRY (89))

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de LOWRY (89) au réactif de biuret en utilisant une solution standard de sérum albumine (SIGMA) pour la gamme étalon.

5.1 Gamme de sérum albumine bovine

10 mg de sérum albumine bovine sont dissous dans 10 ml d'eau distillée. La solution mère ainsi préparée est diluée avec de l'eau distillée de façon suivante.

Solution mère		H ₂ O		Concentration Finale
2,5 ml	+	2,5 ml	=	500 ug/ml
2,0 ml	+	3,0 ml	=	400 ug/ml
1,5 ml	+	3,5 ml	=	300 ug/ml
1,0 ml	+	4,0 ml	=	200 ug/ml
0,75 ml	+	4,25 ml	=	150 ug/ml
0,50 ml	+	4,50 ml	=	100 ug/ml
0,25 ml	+	4,75 ml	=	50 ug/ml

5.2 Mode opératoire

A 0,2 ml de solution protéique à doser, diluée de façon à entrer dans la gamme standard et 0,2 ml de chaque concentration standard on ajoute 2 ml de réactif du biuret. L'ensemble est mélangé et laissé 30 minutes à l'obscurité à la température du laboratoire. On ajoute rapidement à chacun des tubes 0,2 ml de réactif de Folin dilué au demi extemporanément en eau distillée et on mélange dès l'addition, car ce réactif est très instable en milieu alcalin.

La coloration se développe en 15 minutes à l'obscurité.
Elle reste stable environ deux heures.

La lecture des résultats se fait au spectrophotomètre
à la longueur d'onde de 660 nm. Les solutions sont lues contre
le témoin réactif.

CHAPITRE II :

METHODES IMMUNOLOGIQUES

- Méthodes de détection des antigènes
- Méthodes de titrage des anticorps

METHODES DE DETECTION DES ANTIGENES

I IMMUNODIFFUSION EN GELOSE PAR LA METHODE D'OUCHTERLONY (115)

Cette méthode consiste à faire diffuser l'un vers l'autre une solution antigénique et un antisérum contenant des anticorps précipitants dirigés contre ces antigènes. Nous avons utilisé l'immunodiffusion pour une première appréciation du nombre d'antigènes, et pour l'étude du rapport des concentrations antigènes-anticorps.

1.1 Mode opératoire

a) Préparation des lames

Les lames de 25x75 mm sont mises plusieurs jours dans de l'alcool avant utilisation. Les lames sont déposées par 6 sur le chassis LKB-GELMAN.

Les chassis étant garnis, parfaitement horizontal, chaque rangée de trois lames reçoit 13 ml d'agar fondue à 90° C, refroidie à température ambiante à l'abri de la poussière sous couvercle pendant 10 minutes. L'empreinte des trous est faite à l'emporte pièce

LKB dans la gélose solidifiée, selon la disposition et la taille souhaitée, puis les châssis sont placés sur le porte-chassis à 4° C pour une légère contraction de la gélose, ce qui facilite l'extraction ultérieure du gel dans les trous.

b) Immunodiffusion

Les solutions antigéniques à analyser sont déposées dans les trous à la pipette automatique GILSON : dépôt de 10 μ l pour des trous de 2 mm de diamètre sur 2 mm de profondeur. Les châssis sur leur porte-chassis, sont placés en atmosphère humide dans des boîtes hermétiques, garnies de papier filtre humidifié.

Les lames sont abandonnées 24 heures à une température de 37° C, puis 24 heures à 4° C pour favoriser une bonne précipitation des arcs. Il est possible de recharger les puits après un délai de 24 heures. Après un séjour à 4° C, les lames sont immergées une heure dans une solution de citrate pour éliminer les faux arcs.

L'excès de matériel diffusible est enlevé par deux lavages effectués dans la solution de chlorure de sodium à 0,85 p100, et enfin un dernier lavage dans l'eau distillée pendant une nuit à 4° C.

Le séchage a lieu sous papier Whatman n° 1 par simple évaporation à la température ambiante. On veille à ce que tous les trous soient entièrement remplis d'eau au moment de placer le papier Whatman lequel est déposé humidifié sur la gélose. Ces précautions évitent l'éclatement de la circonférence des trous lors du séchage. A la fin du séchage, le papier filtre se retire sans difficulté. Les lames sont détachées du châssis et numérotées puis colorées dans la solution d'amidoschwarz 10 B pendant 5 minutes. Les lames sont décolorées dans deux bains successifs de solution de décoloration.

II IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE D'APRES LAURELL (86)

Le mélange antigénique est préalablement séparé par électrophorèse (1ère dimension), puis soumis à une seconde électrophorèse dans un gel contenant un antisérum polyvalent ou monospécifique (2ème dimension).

2.1 Mode opératoire

a) Préparation des lames

Les lames de verre de 90x110x15 mm, lavées et dégraissées reçoivent un volume de 16 ml d'agarose fondue à 90° C. Le gel est refroidi et solidifié. On pratique à l'emporte pièce APELEX un puits de 10 mm de long. Le gel est aspiré par une pipette pasteur. On

dépose 30 μ l de solution antigénique à analyser ; après évaporation à température ambiante, le puits est rempli par un mélange d'agarose et de bleu de bromophénol fondu à 90° C et refroidi à une température de 45° C. Le bleu sert de témoin de migration.

b) Première dimension

La migration est induite par un courant continu fourni par un générateur type SHANDON, donnant une différence de potentiel de 10 V/cm pendant 60 minutes. Le pontage est assuré par du papier Whatman n° 1 imbibé du Tampon véronal.

c) Deuxième dimension

A la fin de la première migration, on enlève le gel inutile ne conservant que l'étroite bande contenant les protéines. On prépare 14 ml d'agarose pour la deuxième dimension dans laquelle l'immun-sérum spécifique est incorporé. Le gel est coulé rapidement sur la lame.

La deuxième migration, qui se déroule perpendiculairement à la migration première, a lieu sous 3 volts/cm pendant 16 heures.

Puis les lames sont pressées pendant une heure, ensuite lavées dans une solution de chlorure de sodium à 0,85 p100 par deux bains successifs. Puis un dernier lavage à l'eau distillée précède le séchage sous papier Whatman n° 1 et la coloration au bleu de Coomassie -R.

III IMMUNOELECTROPHORESE SIMPLE "TECHNIQUE DES ROCKETS" D'APRES

AXELSEN (10)

Cette méthode consiste à faire pénétrer l'antigène dans le gel imprégné d'antisérum sous l'influence d'un champ électrique. Nous avons utilisé cette technique pour la détection et la détermination quantitative des antigènes élués dans les fractions de Sépharose 4B et Séphacryl S400, afin d'établir un rapport entre la concentration en protéines et la concentration en antigène.

Les lames de verre lavées, dégraissées reçoivent un volume de 16 ml d'agarose. Le gel est refroidi et à l'aide d'emporte pièces APELEX des puits de 1,5 mm de diamètre sont découpés sur une bande d'agarose qui est conservée. Le restant du gel est découpé et remplacé par un mélange d'agarose et d'immun-sérum mélangé comme précédemment.

Les échantillons à analyser sont déposés sous un courant de 2 volts/cm. La migration se poursuit pendant 16 heures.

Les opérations de lavage, de coloration et décoloration se font de façon identique à celles décrites pour la technique de LAURELL (86).

METHODES DE TITRAGE DES ANTICORPS

I SERO-AGGLUTINATION

Nous avons utilisé la méthode classique d'agglutination (142) en tube des suspensions antigéniques 0 de *Listeria monocytogenes* délivrées par l'Institut BEHRING. Seules sont utilisées les suspensions de type 1 et 4b correspondant aux sérotypes les plus fréquemment isolés en France.

On réalise des dilutions suivant une progression géométrique de raison 2 des sérums à tester en solution tampon phosphate pH 7,2 à partir d'une dilution initiale au 1:20. La réaction consiste à ajouter 0,25 ml de suspension antigénique à 0,25 ml de chaque dilution du sérum. Le mélange antigène-sérum est placé en incubation de 12 heures à 37° C.

La lecture se fait à l'oeil nu à l'aide de l'agglutinoscope. Chaque tube est comparé à un tube témoin (sérum sans suspension antigénique). L'agglutination 0 est fine, nette et résistante à l'agitation. Les titres sont exprimés par le dénominateur de la dilution la plus forte des sérums capables d'agglutiner l'antigène.

II IMMUNOENZYMOLOGIE

La technique E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) est une méthode immunoenzymologique visant à mettre en évidence une réaction antigène-anticorps à l'aide d'un antiserum marqué par un enzyme, la phosphatase alcaline celle-ci étant révélée à l'aide d'un substrat spécifique le para-nitrophénylphosphate.

Nous avons utilisé cette technique pour le sérodiagnostic de listériose afin de détecter les IgG et IgM dans les sérums humains. Cette technique a été mise au point par ENGVALL et PERLMAN (48), modifiée par CARLIER et coll (25) et adaptée à l'antigène 2 de *Listeria monocytogenes* par DELVALLEZ et coll (32).

2.1 Mode opératoire

La réaction est réalisée sur plaque "Microélisa" en immulon à fond plat (DYNATECH).

a) Tapissage des cupules

Chaque cupule reçoit 100 μ l de solution antigénique diluée dans un tampon carbonate bicarbonate 0,1 M pH 9,6. Les plaques sont incubées une nuit à température ambiante, puis lavées trois fois avec du tampon phosphate tween à l'aide du laveur automatique "Dynawasher"

(DYNATECH). Elles sont prêtes à l'emploi, mais peuvent être congelées à -20° C. Dans ce cas, on effectue un nouveau lavage dans le tampon phosphate tween avant utilisation.

b) Incubation avec les sérums

Les sérums humains sont dilués au 1:10 selon une progression géométrique de raison 2 avec du tampon phosphate tween. Chaque cupule reçoit $100 \mu\text{l}$ de sérum à tester. Pour chaque sérum les tests sont faits en double. Les plaques sont placées à température ambiante pendant 4 heures, puis lavées trois fois avec le tampon phosphate tween.

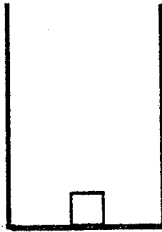
c) Incubation avec les conjugués

Ceux-ci sont dilués dans le tampon phosphate tween à la concentration choisie. Les conjugués anti IgM (chaîne μ) et les anti IgG (chaîne γ) couplés à la phosphatase alcaline selon la technique d'AVRAMEAS (9), nous ont été fournis par FUMOZE. Les conjugués sont ajoutés à raison de $100 \mu\text{l}$ par cupule. Les plaques sont incubées une nuit à $+ 4^{\circ}$ C et lavées trois fois par du tampon phosphate tween.

d) Mesure de l'intensité de la réaction enzyme-substrat

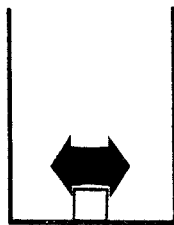
On ajoute dans chaque cupule $100 \mu\text{l}$ d'une solution de paranitrophénylphosphate à 1 mg/ml dans du tampon diéthanolamine à pH 9,8. Les plaques sont incubées 1 heure à la température ambiante.

1° Tapissage des cupules



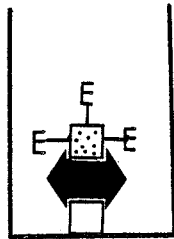
- Avec antigène de *Listeria monocytogenes*.
Incubation une nuit à température ambiante.
- Lavages

2° Incubation avec les sérums



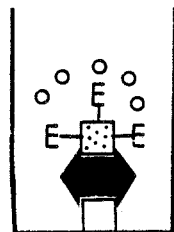
- Pendant 4 heures à température ambiante.
L'anticorps absorbé sur l'antigène.
- Lavages

3° Incubation avec les conjugués à la Phosphatase alcaline



- Pendant une nuit à + 4° C
- Lavages

4° Addition du substrat enzymatique



- Incubation pendant une heure
- Lecture des résultats

FIGURE 5 : SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES DE LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.

La réaction est arrêtée par l'addition dans chaque cupule de 25 μ l de NaOH 2N. L'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide du lecteur de plaque MICROELISA AUTO READER.

III DETECTION DU FACTEUR RHUMATOÏDE

Le facteur rhumatoïde présent dans le sérum d'individus atteints de polyarthrite rhumatoïde, appartient à la classe des IgM le plus souvent. Le facteur rhumatoïde est mis en évidence par réaction d'agglutination directe sur lame à l'aide des particules de latex couvertes de gamma-globulines humaines fournies sous forme de coffret rhumalateX par FUMOUE.

3.1 Mode opératoire

Le dépistage sur lame ; le sérum à examiner doit être fraîchement prélevé ou conservé par congélation. Les sérums et les réactifs doivent être à température ambiante pour effectuer la réaction.

Le sérum est dilué ; 0,05 ml dans 1 ml de solution de tampon glycoColle pH 8,2. On dépose une goutte de sérum dilué sur des cases de la lame. On ajoute sur la case, une goutte de réactif de latex globulines après avoir soigneusement agité la suspension. Les deux gouttes sont bien mélangées. On imprime à la lame un lent mouvement de rotation. Le résultat d'agglutination est observé en deux minutes sur un fond noir.

Une réaction positive se caractérise par la présence d'une agglutination massive, visible à l'oeil nu, d'apparition rapide. La réaction est lue par rapport aux témoins (sérum positif et sérum négatif).



CHAPITRE III :
METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Désirant étudier les différents antigènes de *Listeria monocytogenes* il nous était indispensable de faire un choix quant aux critères de séparation que nous allions utiliser.

Une protéine se définit en effet par 4 grands critères principaux :

- taille,
- charge,
- structure,
- fonction biologique.

A chacun de ces critères correspond un modèle de séparation. Nous avons choisi les deux premiers.

- A la taille correspond les méthodes . Electrophorèse en gel
. Gel filtration
- A la charge correspond échangeuse d'ions.

I CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE FILTRATION

Nous avons utilisé deux types de gel, gel Sépharose 4B (PHARMACIA) et un gel Séphacryl superfine 400 (PHARMACIA) sous un volume de 500 ml en suspension dans de l'eau distillée.

- Le gel sépharose 4B est lavé soigneusement par du tampon Tris 2. Le gel parfaitement dégazé est versé dans une colonne de 1 mètre. Le gel est stabilisé par 2 volumes de tampon d'élution à un débit de 12 ml/heure. La colonne est calibrée par une étude des séparations de mélange des protéines (KIT PHARMACIA).

- bleu de dextran 2 000..... PM 2.10^6
- Tyroglobuline (thyroïde de boeuf)..... PM 669.10^3
- Catalase (sérum de boeuf)..... PM 232.10^3
- Sérum albumine (sérum de boeuf)..... PM 67.10^3

L'échantillon est appliqué au haut de la colonne, le flux du tampon étant descendant. L'effluent est collecté à l'aide du collecteur (PHARMACIA FRAC 300) avec enregistrement de la densité optique des éluats (Enregistreur REC 2 PHARMACIA).

- Le gel séphacryl superfine est lavé avec du Tampon Tris 3. Le montage s'effectue comme précédemment avec un débit rapide de 120 ml/heure pour obtenir un lit chromatographique homogène. Nous avons procédé pour le reste des opérations de la même façon que pour la chromatographie sur sépharose 4B.

- Concentration par ultrafiltration : les fractions d'élution sont recueillies à froid, concentrées sur membrane DIAFLO (Amicon type YM 10). La concentration s'effectue sous courant d'azote

sous une pression de 1 bar et sous agitation magnétique. La dialyse est poursuivie contre de l'eau distillée.

II CHROMATOGRAPHIE ECHANGE D'IONS

Nous avons utilisé l'appareillage proposé récemment (1982) par PHARMACIA "FPLC" (Fast-Liquid-Chromatography) chromatographie liquide rapide des protéines. Cet équipement permet d'obtenir une haute résolution, des rendements importants pendant des temps très courts de séparation.

La colonne utilisée est une colonne échangeuse d'anion mono Q (PHARMACIA). La colonne, délivrée dans une solution à 24 p100 d'éthanol et d'eau avec un ion sulfate comme contre ion est lavée avec :

- 5 ml de tampon A de départ (de faible force ionique) ; puis 10 ml de tampon B (de forte force ionique) ce qui permet d'équilibrer avec le contre ion que nous avons choisi ; enfin 5 ml de Tampon 1 de départ.

La colonne ainsi équilibrée est prête à l'emploi.

Un appareil à gradient programmable est incorporé au système.

L'échantillon est injecté à la colonne, le flux de la colonne étant descendant. L'effluent est collecté à l'aide du collecteur PHARMACIA précédemment cité.

III DESSALAGE ET CONCENTRATION SUR COLONNE PD 10

Nous avons pratiqué un dessalage sur des petites colonnes prêtes à l'emploi de Sephadex G-25 M (PD 10 PHARMACIA). Il s'agit de petites colonnes de 5 cm contenant un volume de 9,1 ml qui permettent rapidement de changer de tampon et de concentrer.

RESULTATS

CHAPITRE I :
ETUDE ANTIGENIQUE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
SEROVAR 4b

I ANALYSE ANTIGENIQUE

1.1 Les extraits antigéniques

a) Résultats

Nous avons vérifié l'efficacité du broyage par deux numérations successives du nombre de bactéries vivantes avant et après passage à la X-press. Le rendement est de l'ordre de 90 p100.

Nous sommes partis des bactéries broyées en tampon Tris 1 additionné ou non de 10 mM de $MgCl_2$. Le broyat, nous a fourni l'extrait brut, CE qui a été débarrassé des bactéries intactes qui pouvaient encore s'y trouver par une première centrifugation à 600 g. Nous avons obtenu un surnageant, CSE dans lequel se trouve les antigènes solubles avec les parois et les débris membranaires. Nous avons ensuite séparé les parois des antigènes solubles par une centrifugation à 40 000 g. Ces derniers ont été retrouvés dans le surnageant appelé S40.

Notre étude antigénique a porté sur les antigènes solubles de S40.

TABLEAU 5

Tampon d'extraction	Extrait antigénique	Nombre de lots effectués	Poids humide des bactéries exprimé en gramme	Poids de l'extrait lyophilisé exprimé en mg
Tampon a	CE	6	≈ 8	2 000 mg
	S40	12	≈ 8	210 mg
Tampon b	S 40	10	≈ 8	210 mg

Les poids mentionnés dans ce tableau sont les quantités obtenues par lot ; chaque lot représente un broyat effectué selon les modalités décrites dans la partie matériel et méthodes.



Chaque broyat nous a fourni environ 20 ml de S40 légèrement opalescent et de couleur jaunâtre contenant 6 à 14 mg de protéines par ml.

Les quantités obtenues pour chacun des extraits étaient très faibles. De ce fait, il nous a fallu rassembler plusieurs lots de façon à pouvoir effectuer tous les essais nécessaires à l'étude antigénique : préparation des extraits CE, CSE, S40 et immunisation des lapins. Le nombre de lot effectué pour chacun des différents extraits ainsi que les quantités obtenues pour chacun d'entre eux sont résumés dans le tableau 5.

b) Conclusion

La technique de cryobroyage (31) que nous avons employée pour la préparation des extraits antigéniques semble reproductible dans les quantités obtenues comme le montre le tableau 5.

Les quantités obtenues des extraits antigéniques lyophilisés sont de :

- 2 000 mg pour l'extrait brut CE

- 210 mg pour l'extrait soluble S40

Si nous rapportons ces différentes quantités au poids humide des bactéries de départ, nous trouvons que ces quantités représentent seulement :

- 25 p100 de CE

- 2,5 p100 de S40

Le CE représente l'antigène total de *Listeria monocytogenes* obtenu après passage au broyeur à couteaux. C'est un mélange de parois des débris membranaires et des bactéries intactes ; c'est pourquoi le poids que nous avons obtenu est 10 fois plus élevé que celui de l'extrait antigénique S40.

1.2 Détection des antigènes

a) Résultats

Les immun-sérums de lapins

En préliminaire nous avons vérifié qu'avant l'infection, tous les sérums de lapins ne présentaient aucun arc de précipitation en immunodiffusion sur gélose (115) vis à vis des extraits de *Listeria monocytogenes* et des souches de *Streptococcus foecalis* et *Staphylococcus aureus* réputés avoir des réactions croisées avec *Listeria monocytogenes*. L'extrait antigénique choisi pour ces souches est le S40 que nous avons préparé.

Nous avons inoculé à quatre lapins une suspension bactérienne de *Listeria* vivantes. Une suspension de 10^9 bactéries par ml est injectée sous un volume de 1 ml, ce qui correspond à une densité optique de 10, lue à une longueur d'onde de 660 nm au spectrophotomètre MONOSPAC 105.

Après cette injection, deux lapins sur quatre ont montré des signes évidents d'infection listérienne. Nous avons donc décidé d'entreprendre un traitement antibiotique à la Pénicilline G à la dose de un million d'unités internationales. Nous avons repris la Pénicilline G par 1 ml d'eau physiologique stérile. Nous avons injecté 0,5 ml de la suspension par voie intramusculaire pour chaque lapin.

Malgré ce traitement les deux lapins malades sont morts, les deux autres ont fourni des immun-sérums riches en anticorps précipitants. Ces anticorps apparaissent après la troisième injection et atteignent leur maximum après la quatrième injection.

Les extraits antigéniques CE, CSE, ont été inoculés aux lapins à raison de 10 mg par injection en présence d'adjuvant incomplet de Freund selon le protocole défini dans la partie matériel et méthodes :

- sept lapins ont été inoculés par l'extrait brut CE ;
- un lapin a été infecté par le CSE ;
- cinq lapins ont été inoculés par le S40.

Tous ces extraits antigéniques ont fourni des immun-sérums riches en anticorps précipitants.

Analyse des antigènes

Les résultats obtenus avec l'extrait antigénique, S40 en immunodiffusion (115) varient en fonction des immun-sérums utilisés :

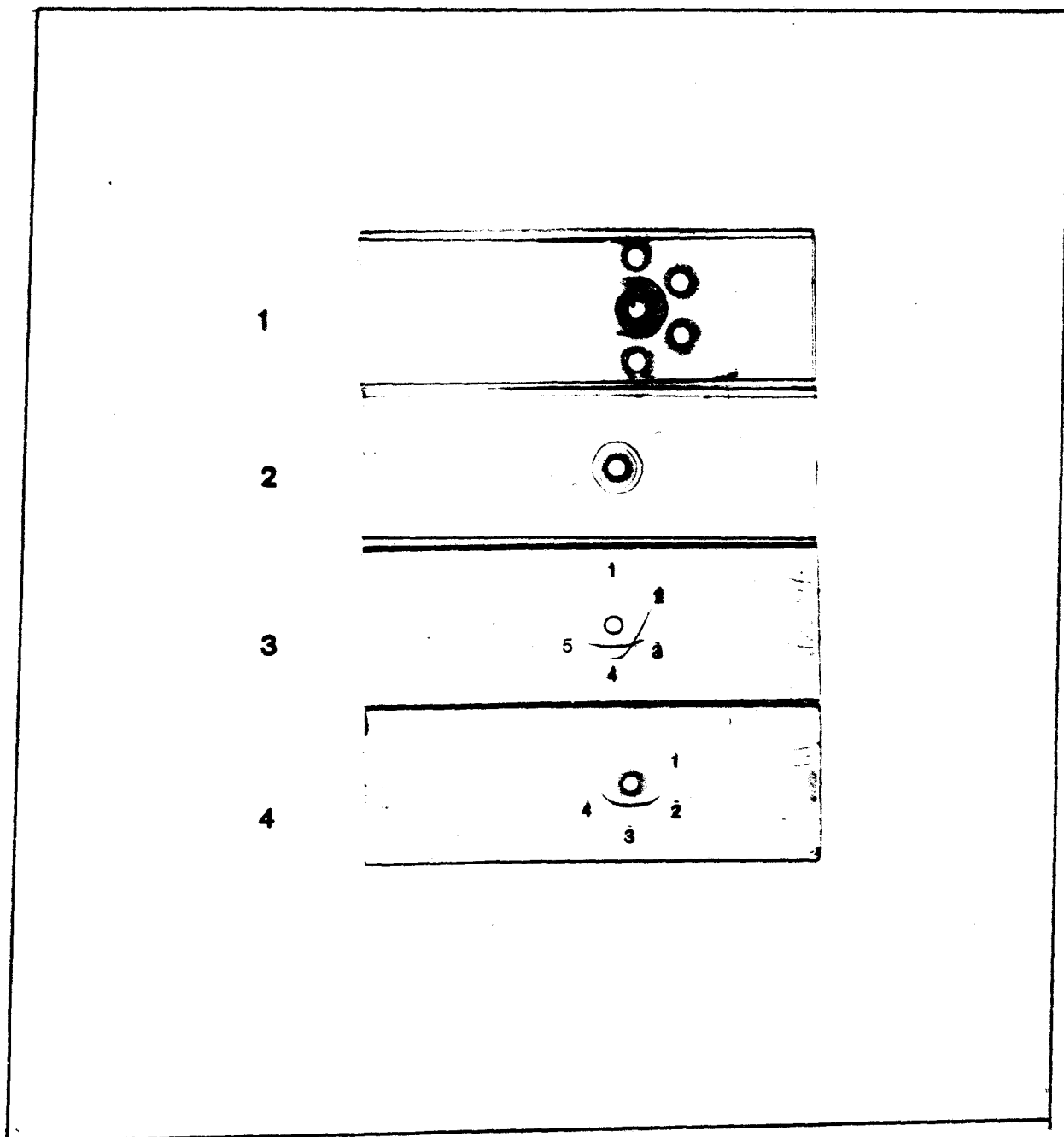
- sérums de lapins anti-bactéries entières ;
- sérums de lapins anti CE ;
- sérums de lapins anti CSE ;
- sérums de lapins anti S40.

Ces résultats apparaissent sur la PHOTO I.

Trois arcs de précipitation sont révélés avec les immun-sérums anti-bactéries entières, et anti S40. Nous observons la présence de deux arcs majeurs ; l'un situé près du puits central, l'autre à proximité du dépôt des immun-sérums.

Il est évident que la réaction d'OUCHTERLONY (115) se prête mal au dénombrement des arcs de précipitation. Mais elle a eu pour nous l'énorme avantage de nous donner une idée du rapport antigène-anticorps à utiliser pour obtenir toute précipitation.

L'analyse antigénique de l'extrait S40 a été étudiée par immunoélectrophorèse bidimensionnelle vis à vis des immun-sérums anti S40, et anti-bactéries entières.



BUS
LILLE

PHOTO I : IMMUNODIFFUSION EN GELOSE

L'immunodiffusion se passe 24 heures à 37° C suivie d'un séjour de 24 heures à 4° C.

- 1° : - Solution antigénique S40 de *Listeria monocytogenes* sérovar 4b ; à 10 µl à 8,8 mg par ml en protéines dans le puits central.
- Immun-sérum anti-bactéries entières prélevé à des temps variables au cours de l'immunisation du lapin, 10 µl dans les puits périphériques.
- 2° : - Solution antigénique S40 de *Listeria monocytogenes* sérovar 4b, 10 µl à 8,8 mg par ml dans le puits central.
- Immun-sérum anti S40, 10 µl dans les puits périphériques.
- 3° : - Immun-sérum polyvalent anti S40, 10 µl dans le puits central.
- Fractions 1, 2, 3, 4, 5 obtenues du S40 par filtration sur gel de Sépharose 4B, 10 µl de chaque fraction.
- 4° : - Immun-sérum monovalent anti-antigène 2, 10 µl dans le puits central.
- Fractions 1, 2, 3, 4 obtenues du S40 par filtration sur gel de Sépharose 4B, 10 µl de chaque fraction.

Nous avons obtenu 17 pics de précipitation dans l'extrait antigénique S40 vis à vis de l'immun-sérum homologue, comme l'indique la PHOTO III.

Parmi les 17 antigènes solubles détectés par immunoélectrophorèse bidimensionnelle, deux antigènes A et B sont majeurs. La migration de l'antigène A sur l'agarose est relativement lente, comme elle l'est en gélose dans le cas de l'immunodiffusion où l'arc de précipitation qui semble correspondre à l'antigène A est proche du puits central. L'antigène B pourrait correspondre au deuxième arc majeur obtenu en immunodiffusion.

L'immun-sérum anti-bactéries entières révèle 9 pics de précipitation dont l'antigène majeur est représenté par le pic B comme le montre la PHOTO II.

Les réactions d'identité entre l'antigène 2 révélé avec l'immun-sérum anti S40 et l'antigène majeur obtenu avec l'immun-sérum anti-bactéries entières ont été faites (31).

DELVALLEZ et coll (31) concluent qu'il s'agit du même antigène présent chez la bactérie entière, qu'on retrouve également dans le contenu cellulaire.

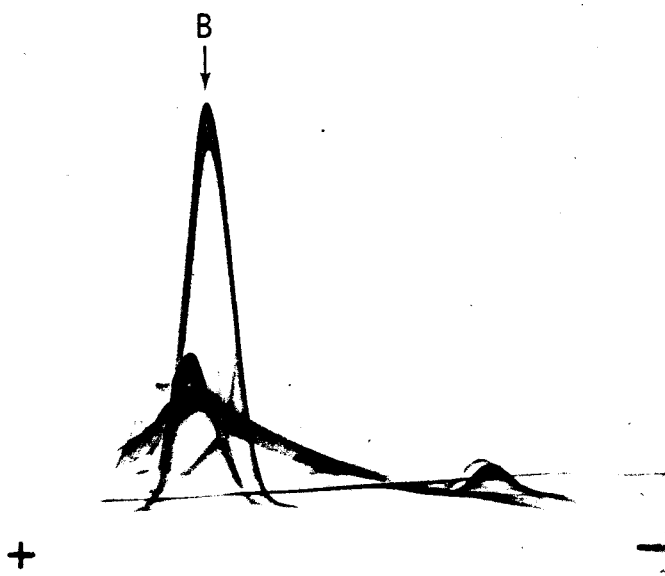


PHOTO II : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE DE
L'EXTRAIT ANTIGENIQUE S40 DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
SEROVAR 4b VIS A VIS DE L'IMMUN-SERUM ANTI-BACTERIES ENTIERES

1^o dimension : migration sous 10 V/cm pendant 60 minutes

2^o dimension : migration sous 3 V/cm pendant 16 heures

- Solution antigénique, 10 μ l à 14 mg par ml en protéines

- Immun-sérum, 8 μ l par cm^2

9 pics de précipitation dont le pic B est majeur

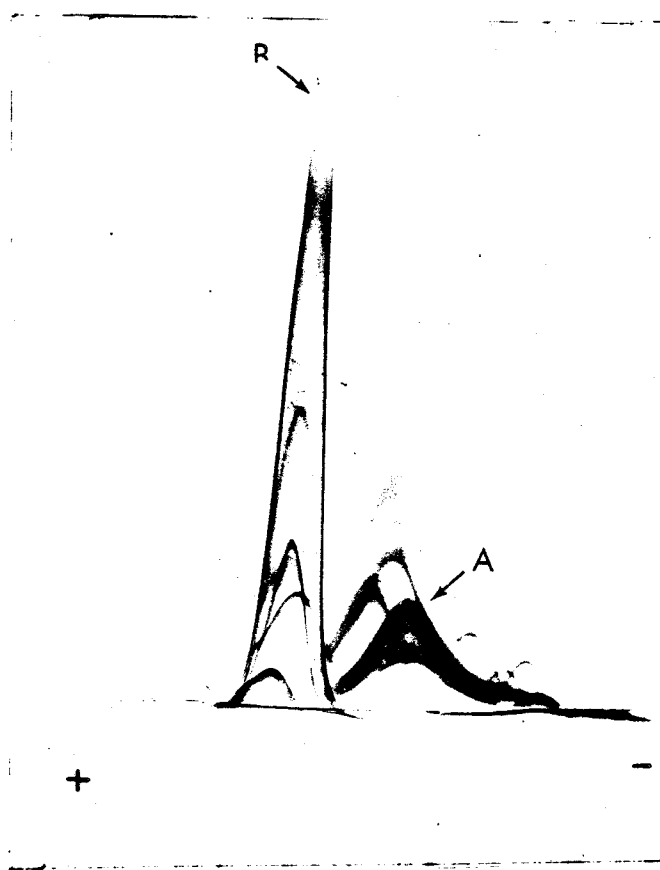


PHOTO III : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE DE
L'EXTRAIT ANTIGENIQUE S40 DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
SEROVAR 4b VIS A VIS DE L'IMMUN-SERUM POLYVALENT ANTI S40

1^o dimension : migration sous 10 V/cm pendant 60 minutes

2^o dimension : migration sous 3 V/cm pendant 16 heures

- Solution antigénique, 20 μ l à 8,8 mg par ml en protéines

- Immun-sérum, 6 μ l par cm^2

17 pics de précipitations dont deux majeurs pic A et pic B.

b) Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus en immunoélectrophorèse des extraits S40 vis à vis des immun-sérums anti S40, nous ont permis de conclure que la structure antigénique est plus complexe que ne l'avait démontrée ARMSTRONG (5).

Nos résultats confirment les travaux effectués par DELVALLEZ et coll (31) sur la structure antigénique de *Listeria monocytogenes*.

Cependant, nous avons remarqué que le nombre d'antigènes obtenus à partir de l'extrait S40 vis à vis de son sérum homologue varie d'un extrait à un autre et d'un sérum à un autre. Il est évident que la qualité des immun-sérums dépend de la préparation des extraits antigéniques et de la réponse immunologique du lapin.

Afin de vérifier la qualité de la préparation de nos extraits S40, nous avons soumis le même extrait S40 à une immunoélectrophorèse bidimensionnelle vis à vis des différents immun-sérums anti S40. Dans la majorité des cas nous avons obtenu les 17 pics de précipitation avec quelques variations d'un immun-sérum à un autre.

Il semble donc que le nombre d'antigènes révélés dépend plus de la qualité de l'immun-sérum que de la préparation antigénique.

II FRACTIONNEMENT SUR GEL DE FILTRATION

2.1 Tampons d'extraction

Notre première idée est de séparer les 17 antigènes détectés dans le S40.

Avant de passer à la filtration sur gel, nous avons effectué des essais avec différents tampons d'extraction.

a) Résultats

Trois tampons ont été utilisés pour cette étude à partir du tampon Tris 1 modifié : - Tampon a = inchangé

- Tampon b = sans chlorure de magnésium

- Tampon c = plus EDTA

La composition de ces tampons obtenus à partir de Tris 1 modifié est détaillée dans l'annexe technique.

Les extraits S40 en tampon Tris a ont donné des images similaires en immunoélectrophorèse bidimensionnelle (86) et immunodiffusion sur gélose (115) aux extraits S40 effectués en Tampon Tris b sans chlorure de magnésium. Nous avons obtenu dans les deux types d'extraits 17 antigènes contenus dans le S40.

L'essai effectué en tampon c s'est soldé par un échec. L'extrait antigénique S40, obtenu à partir du broyat en tampon c analysé en immunoélectrophorèse bidimensionnelle vis à vis de l'immun-sérum polyvalent anti S40, nous a révélé deux antigènes seulement au lieu des 17 antigènes escomptés.

Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait qu'il y a eu une dégradation des antigènes de *Listeria monocytogenes*.

Cet essai n'a été réalisé qu'une seule fois ; sans doute d'autres expériences seraient nécessaires pour déterminer l'action de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) sur les antigènes de *Listeria monocytogenes*.

b) Conclusion

Ce tampon n'a pas été retenu ultérieurement. Nous n'avons pas noté de différence dans le nombre et la séparation des antigènes avec les tampons a et b. Ces derniers ont été retenu pour nos broyats.

2.2 Sur Sépharose 4B

Plusieurs essais ont été réalisés pour la séparation des antigènes solubles contenus dans l'extrait S40.

a) Résultats

Le S40 a toujours été employé à une concentration de 10 mg en protéines injectée sous un volume de 1,5 ml, après centrifugation à 5 000 t/mn à + 4° C pendant 20 minutes à l'aide de la centrifugeuse JOUAN E96.

L'élution des différentes fractions s'effectue par 500 ml de tampon Tris 2 à un débit de 12 ml par heure.

Les fractions de 3,5 ml chacune sont recueillies suivant le profil d'élution représenté dans la FIGURE 1.

Nous avons obtenu cinq fractions ; Fraction 1, Fraction 2, Fraction 3, Fraction 4, Fraction 5.

b) Concentration des fractions par ultrafiltration

Les fractions représentant chacune des pics de protéines éluées sont :

- Fraction 1 correspond au pic A
- Fraction 2 correspond au pic B
- Fraction 3 correspond au pic C
- Fraction 4 correspond au pic D
- Fraction 5 correspond au pic E

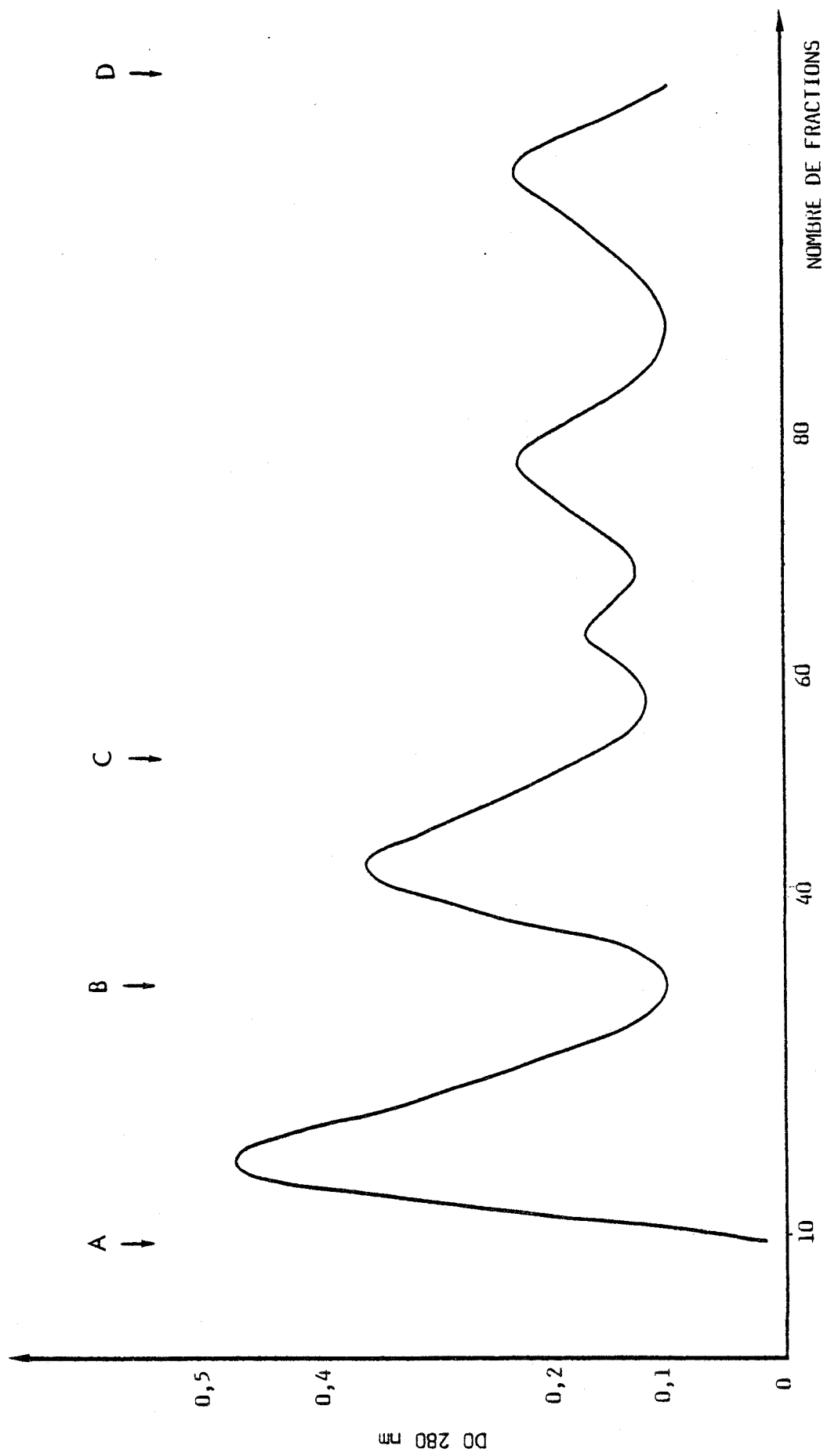


FIGURE 1 : COURBE D'ELUTION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR GEL SEPHAROSE 4B
DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE DU S40 10 mg EN PROTEINES

- A = BLEU DE DEXTRAN 2 M₃
- B = TYROGLOBULINE 660 10³
- C = CATALASE 232 10³
- D = SERUM ALBUMINE 67 10³



Les 5 fractions sont dialysées à froid contre de l'eau distillée et concentrées chacune vingt fois sur membranes DIAFLO YM 10 qui retiennent les protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 10 000 daltons.

Les fractions filtrées et concentrées sont analysées en immunodiffusion et immunoélectrophorèse bidimensionnelle pour déterminer la composition antigénique de chacune.

2.3 Détermination de la composition antigénique

a) Résultats

Les fractions 1, 2, 3, 4, 5 sont déposées dans un premier temps en immunodiffusion vis à vis de l'immun-sérum polyvalent anti S40.

Les résultats sont montrés dans la PHOTO I.

- les fractions 1 et 5 ne donnent aucun arc de précipitation ;
- la fraction 2 donne un seul arc, faible, peu visible après coloration ;
- la fraction 3 donne deux arcs dont un majeur, plus coloré ;
- la fraction 4 donne trois arcs dont un arc majeur qui ne présente aucune communauté avec l'arc majeur révélé dans la fraction 3.

b) Conclusion

Les produits élués dans les pics A et B, n'ont donné aucun arc de précipitation avec les immun-sérums polyvalents.

Ce résultat démontre que ces composés se sont révélés non antigéniques chez le lapin. Nous n'avons pas mené d'autres expériences sur ces fonctions.

Comme nous l'avons déjà constaté, la réaction d'OUCHTERLONY (115) est insuffisante pour déterminer la composition antigénique des fractions 3 et 4.

L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle de ces fractions nous a donné les résultats suivants :

- 7 antigènes dont le pic B majoritaire sont présents dans la fraction 3 comme l'indique la PHOTO IV
- 10 antigènes sont présents dans la fraction 4 comme le montre la PHOTO V

La chromatographie sur Sépharose 4B nous a donné un fractionnement des antigènes solubles de *Listeria monocytogenes* en deux groupes :

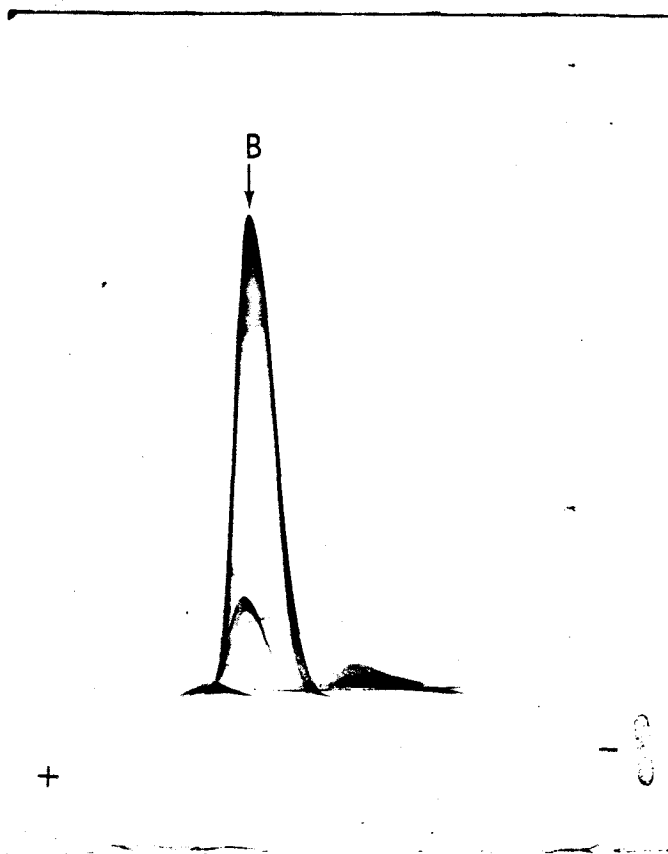


PHOTO IV : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE DE LA
FRACTION 3 DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHAROSE 4B

1^o dimension : migration sous 10 V/cm pendant 60 minutes

2^o dimension : migration sous 3 V/cm pendant 16 heures

- Fraction 3, 30 μ l à 1 mg par ml en protéines

- Immun-sérum polyvalent anti S40, 6 μ l par cm^2

7 antigènes sont détectés dont le pic B est majoritaire.

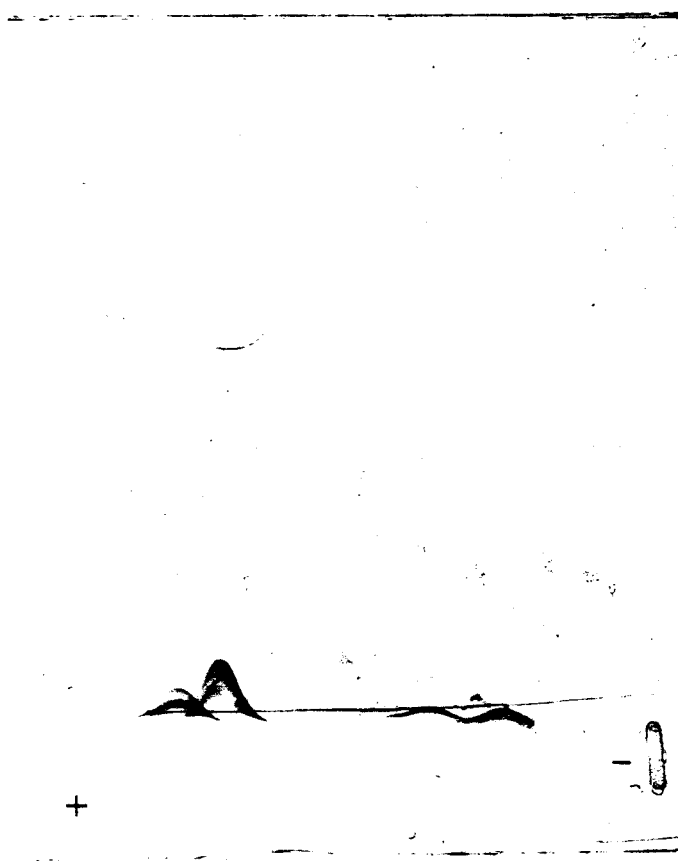


PHOTO V : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE DE LA
FRACTION 4 DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHAROSE 4B

1^o dimension : migration sous 10 V/cm pendant 60 minutes

2^o dimension : migration sous 3 V/cm pendant 16 heures

- Fraction 4, 30 μ l à 1,4 mg par ml en protéines

- Immun-sérum polyvalent anti-S40, 6 μ l par cm^2

10 antigènes principaux sont détectés.

- le premier groupe composé de 7 antigènes de poids moléculaire rapproché, élués dans les fractions 50 à 70 ;

- le deuxième groupe composé de 10 antigènes de poids moléculaire rapproché, élués dans les fractions 70 à 80.

D'après les données chromatographiques de calibration de la colonne 17 antigènes détectés ont un poids moléculaire compris entre 232.10^3 et 67.10^3 daltons. Ce qui explique nos difficultés pour obtenir une bonne séparation des antigènes. Nous n'avons pas pu obtenir d'antigène pur sur Sépharose 4B. Nous avons donc choisi un autre type de gel, le gel Séphacryl S400 qui est de texture beaucoup plus fine.

2.4 Sur Séphacryl S400

a) Résultats

Pour augmenter le pouvoir de résolution, nous avons utilisé un tampon d'éluion de force ionique plus élevée, le Tris 3. Le débit d'éluion est de 12 ml par heure comme précédemment.

Les résultats de la chromatographie sont représentés dans la FIGURE 2.

Nous avons également obtenu cinq pics.

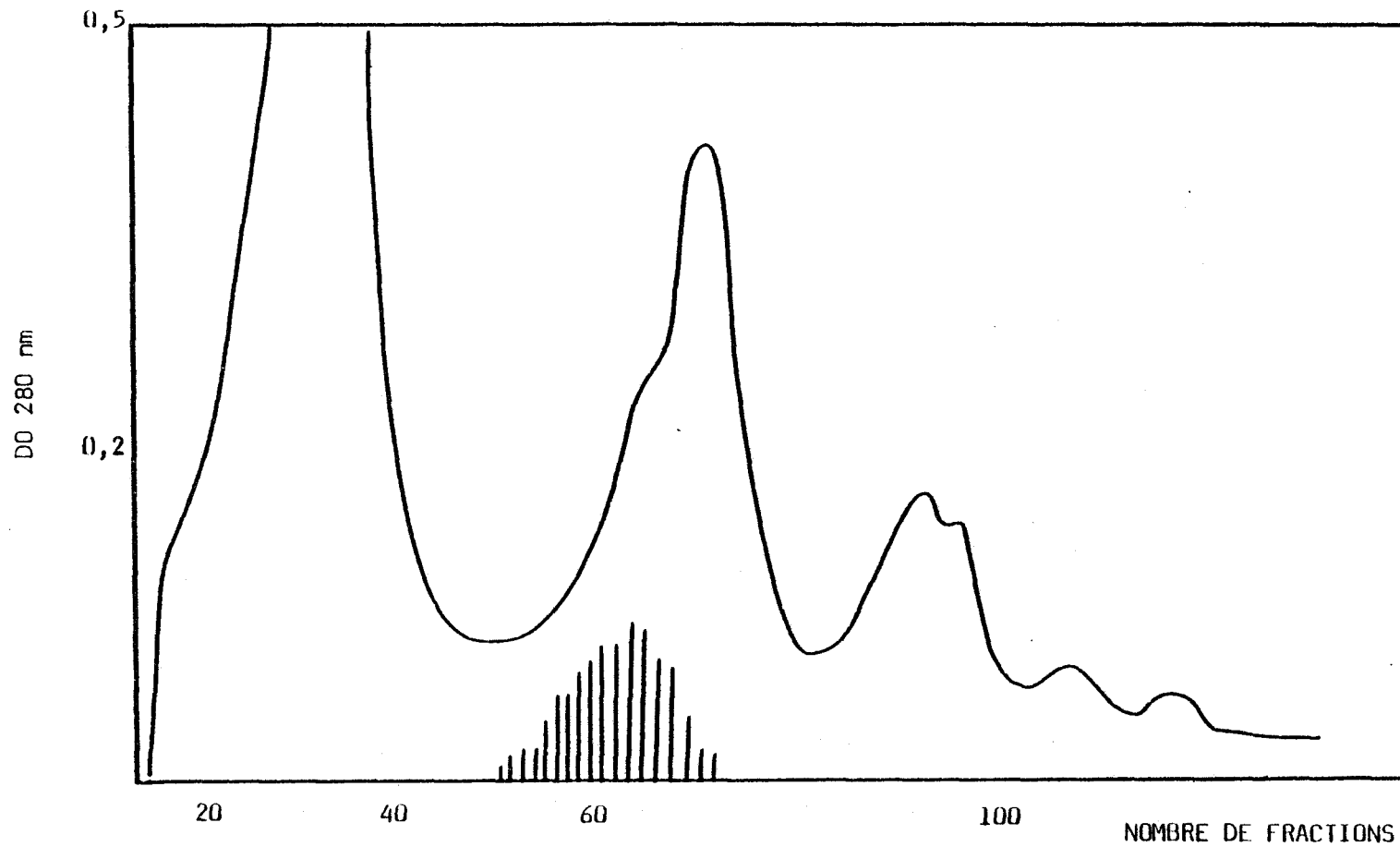


FIGURE 2 : COURBE D'ELUTION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR GEL SEPHACRYL S400
DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE DU S40 10 mg EN PROTEINES

BARES VERTICALES = HAUTEURS DES PICS DE PRECIPITATION OBSERVES EN IMMUNOELECTROPHORESE SIMPLE
"ROCKETS" DES FRACTIONS 50 A 70 VIS A VIS DU SERUM MONOSPECIFIQUE



Les fractions sont rassemblées selon le diagramme d'élution.

Les fractions représentant chacune des pics de protéines éluées sont :

- Fraction 1 correspond au pic A1
- Fraction 2 correspond au pic B1
- Fraction 3 correspond au pic C1
- Fraction 4 correspond au pic D1
- Fraction 5 correspond au pic E1

Les cinq fractions sont concentrées et dialysées de façon analogue aux fractions isolées à partir de filtration sur gel de Sépharose 4B. Les ultrafiltrats issus de chaque fraction ont été analysés en immunodiffusion sur gélose et immunoélectrophorèse bidimensionnelle vis à vis de l'immun-sérum polyvalent anti S40.

b) Conclusion

Les résultats immunologiques des fractions obtenues par filtration sur Séphacryl S400 se sont avérés identiques à ceux précédemment décrits pour la séparation sur Sépharose 4B.

Nous avons pu obtenir une constance remarquable dans nos résultats aussi bien dans les diagrammes d'élution issus des deux types de chromatographie sur Sépharose 4B et sur Séphacryl S400, que dans la régularité des résultats immunologiques d'immunodiffusion et d'immunoélectrophorèse.

La filtration sur gel est donc une méthode qui ne peut être utilisée que comme technique d'approche du fractionnement des antigènes solubles de *Listeria monocytogenes*.

Ceci nous a incité à chercher d'autres méthodes de séparation capables de nous fournir des antigènes purs de *Listeria monocytogenes*.

III L'ANTIGENE 2

L'étude de la structure antigénique de *Listeria monocytogenes* et des anticorps précipitants élaborés par les lapins immunisés par les extraits antigéniques CE, CSE, S40 nous ont permis de déceler la présence d'un antigène majeur, l'antigène 2.

Cet antigène a été déjà isolé et identifié par DELVALLEZ et coll (31).

Les observations concernant cet antigène 2 sont intéressantes : - c'est l'antigène qui paraît être présent en majorité chez la bactérie ;
- l'antigène se révélait spécifique du genre *Listeria*.

Aussi nous avons choisi d'en étudier les propriétés immunologiques et d'effectuer sa purification.

L'antigène 2 purifié devrait permettre d'aboutir à un diagnostic rigoureusement spécifique de listériose. Pour faire cette étude, nous avons effectué plusieurs essais de purification :

- par filtration sur gel Sépharose 4B, Séphacryl S400 ;
- par détection de l'antigène 2 à partir des fractions obtenues en filtration sur gel par la méthode dite des "rockets" qui est une immunoélectrophorèse simple.

Pour effectuer cette purification il nous a fallu préparer des immun-sérums monovalents anti-antigène 2.

3.1 Caractères immunologiques

a) Immun-sérums monospécifiques

Résultats

Nous avons préparé des immun-sérums monospécifiques selon les modalités décrites par DELVALLEZ (31).

Vu la complexité antigénique de l'extrait S40 que nous avons décrit précédemment, nous avons choisi d'effectuer la préparation de cet immun-sérum monovalent en deux étapes.

- Dans un premier temps, l'extrait S40 a été déposé vis à vis d'un immun-sérum polyvalent, anti S40.

Après migration, l'antigène 2 apparaît nettement sans révélation spécifique des protéines, sous forme d'un pic de précipitation antigène-anticorps. Seule la partie supérieure a été prélevée, mise en suspension et homogénéisée dans 2 ml d'adjuvant incomplet de Freund.

Les injections au lapin ont été faites par voie intradermique selon la technique (161) que nous avons employée pour la préparation des immun-sérums polyvalents (cf partie matériel et méthodes).

Le lapin a été saigné 15 jours après la deuxième injection.

- Dans un second temps : l'extrait S40 a été déposé vis à vis de cet immun-sérum monovalent. Le seul pic de précipitation en immunoélectrophorèse bidimensionnelle représentant l'antigène 2 a été prélevé et injecté à un deuxième lapin. L'immun-sérum obtenu est spécifique de l'antigène 2, comme le montre la PHOTO VI.

Conclusion

Il est évident que l'obtention d'immun-sérum monovalent est difficile, étant donné que nous partons d'un extrait S40, qui est un

complexe antigénique. Le pic prélevé sans coloration pourrait être contaminé par d'autres antigènes. C'est la raison pour laquelle nous avons préparé une série d'immun-sérums anti-antigène 2, pour augmenter la monospécificité.

b) Détection de l'antigène 2

Résultats

L'antigène 2 est détecté dans la fraction 3 obtenue par filtration sur Sépharose 4B.

L'immunodiffusion sur gélose de l'immun-sérum anti-antigène 2 ne montre qu'un seul arc de précipitation avec la fraction 3. Et qu'un seul pic de précipitation en immunoélectrophorèse bidimensionnelle comme le montre respectivement les PHOTO I et VI.

Conclusion

L'antigène 2 est présent dans la fraction 3 qui est composée de 7 antigènes ; cet antigène 2 existe en majorité comme le montre la PHOTO IV, ce qui nous a incité à faire une purification de cette fraction.



PHOTO VI : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE AVEC GEL
INTERMEDIAIRE : DETECTION DE L' ANTIGENE 2 DANS LA FRACTION 3

1^o dimension : migration sous 10 V/cm pendant 60 minutes

2^o dimension : migration sous 3 V/cm pendant 16 heures

- Fraction 3, 20 μ l à 1 mg par ml en protéines
- Immun-sérum anti-antigène, 9 μ l par cm^2 dans le gel intermédiaire
- Immun-sérum anti-S40, 8 μ l par cm^2

Un seul pic de précipitation dans le gel intermédiaire représentant
l'antigène 2.

IV PURIFICATION DE L'ANTIGENE 2

4.1 Chromatographie filtration sur gel

Avant de rassembler les fractions 50 à 70 obtenues de la filtration sur Sépharose 4B et Séphacryl S400 $4\mu\text{l}$ de chacune des fractions précédemment citées sont déposées vis à vis de $100\mu\text{l}$ d'immun-sérum anti-antigène 2. Les pics de précipitation ont une hauteur qui est fonction de la concentration en antigène 2. Seules les fractions 59 à 65 où l'antigène 2 est fort concentré, ont été regroupées, dialysées contre l'eau distillée. La fraction 3 obtenue est également concentrée par ultrafiltration sur membrane DIAFLO environ 20 fois.

a) Résultats

La fraction 3 a été contrôlée par immunoélectrophorèse bidimensionnelle vis à vis de l'immun-sérum anti S40. La fraction 3 contient l'antigène 2 en quantité appréciable. Nous avons observé la présence d'autres antigènes contaminant l'antigène 2.

b) Conclusion

L'antigène 2 est purifié de façon partielle. L'emploi d'autre technique serait indispensable pour sa purification.

4.2 Chromatographie d'échange d'ions

L'extrait antigénique S40 à 8,2 mg en protéines par ml à été injectée à la colonne mono Q ($-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) lavée et équilibrée selon les instructions décrites dans la partie matériel et méthodes, sous un volume de 1 ml après filtration de l'extrait sur filtre millipore 0,22 μm .

Nous avons choisi un tampon Tris Hcl 20 mM pH 8. Après dépôt de l'extrait antigénique S40, les protéines fixées sont ensuite éluées par un gradient linéaire de force ionique de 0 à 1 M de NaCl dans le tampon A. Le volume total du gradient est de 1 litre. Le débit d'éluion est de 60 ml/heure.

Plusieurs pics ont été obtenus sur l'enregistrement de l'éluat à une longueur d'onde de 280 nm. Nous avons représenté seulement le pic d'éluion de l'antigène 2 détecté dans les fractions 68 à 73 par la technique de "rockets" à l'aide de l'immunsérum anti-antigène 2 et élué à une concentration de 0,3M en NaCl comme le montre la figure 3.

Les fractions de 0,5 ml chacune sont rassemblées en une seule fraction A.

La fraction A est dessalée sur colonne PD 10 de Séphadex G-25 M. Cette dernière permet également de concentrer la fraction A.

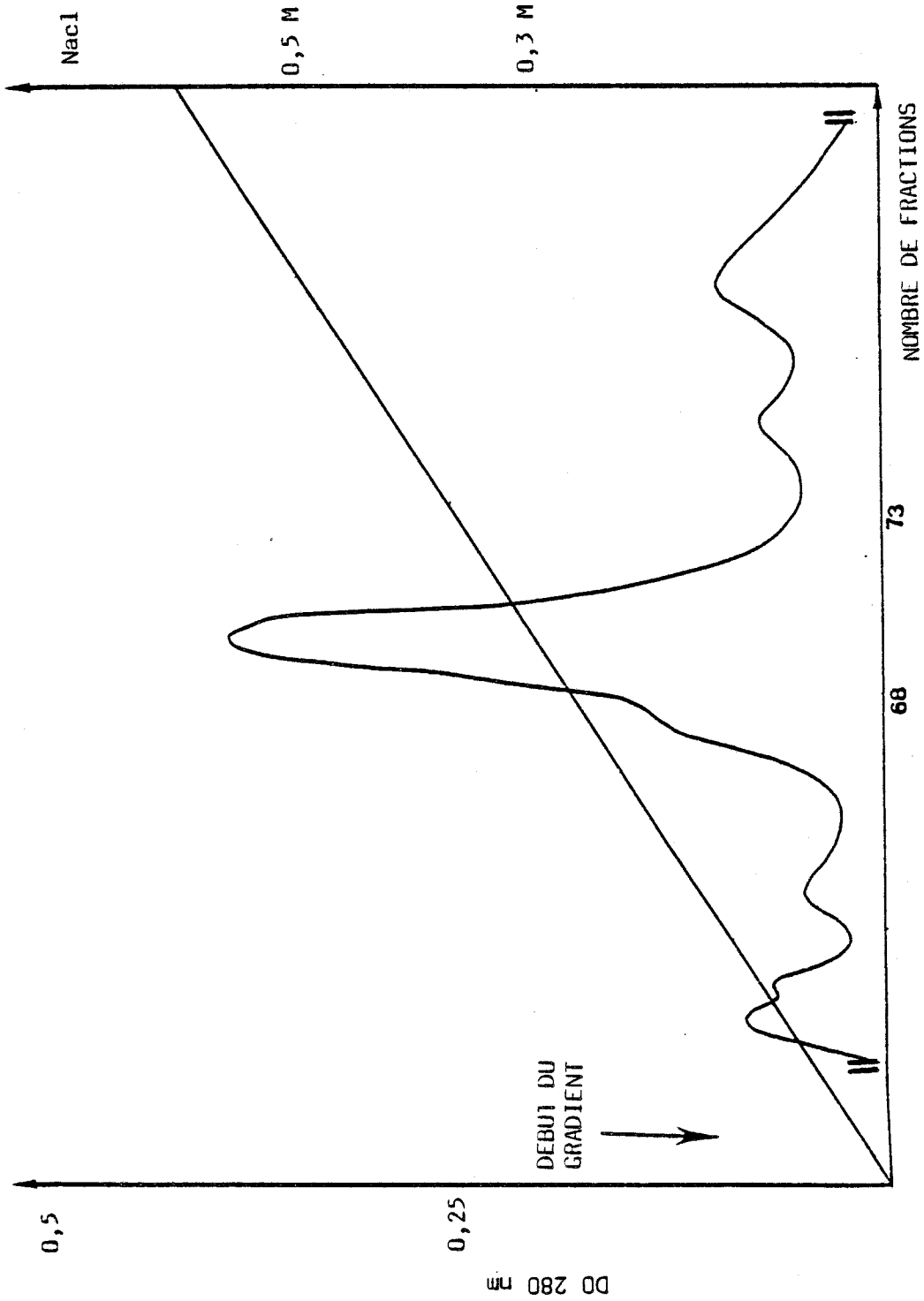


FIGURE 3 : COURBE D'ELUTION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANIONS DE L'ANTIGENE 2
PAR UN GRADIENT DE CHLORURE DE SODIUM



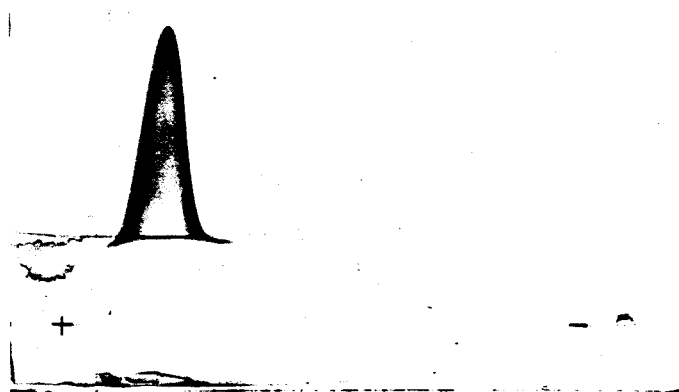


PHOTO VII : IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE DE L'ANTIGENE 2
PURIFIE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANIONS

1^o dimension : migration sous 10 V/cm pendant 60 minutes

2^o dimension : migration sous 3 V/cm pendant 16 heures

- Fraction A concentrée 5 fois sur colonne PD 10, 40 μ l

- Immun-sérum polyvalent anti S40 6 μ l par cm^2

Un seul pic de précipitation représentant l'antigène 2 pur.

a) Résultats

La fraction A dessalée et concentrée 5 fois est analysée par immunoélectrophorèse (86) vis à vis d'un immun-sérum anti S40. Nous avons obtenu un seul pic de précipitation comme l'indique la PHOTO VII.

b) Conclusion

L'échange d'ions aboutit à la purification de l'antigène 2 comme le montre le contrôle effectué en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Elle permet également l'isolement de l'antigène 2 immunologiquement pur à partir de l'extrait S40.

CHAPITRE II :
APPLICATION DE L'ETUDE ANTIGENIQUE
AU SERO-DIAGNOSTIC DE LA LISTERIOSE

APPLICATION DE L'ETUDE ANTIGENIQUE

AU SERO-DIAGNOSTIC DE LA LISTERIOSE

I TITRAGE DES ANTICORPS DANS LES SERUMS

1.1 Réaction immunoenzymatique

Les conditions optimales de la réaction ont été fixées lors des essais préliminaires.

a) Choix de l'antigène

La complexité antigénique de l'extrait S40 mise en évidence par les études d'immunodiffusion et d'immunoélectrophorèse dans le premier chapitre de notre étude antigénique de *Listeria monocytogenes* sérovar 4b, nous a incité à préparer pour la réaction immunoenzymatique, une fraction antigénique purifiée et spécifique de *Listeria*.

En effet, des travaux effectués (32) au laboratoire sur l'extrait S40 employé en E.L.I.S.A., n'ont pas permis d'obtenir une bonne différenciation entre les sérums positifs et négatifs ; c'est à la suite de ces expériences que le choix a porté sur l'antigène 2.

L'antigène 2 s'est révélé spécifique du genre *Listeria* et hautement antigénique chez le lapin et chez l'homme (31). Cet antigène 2 n'a révélé aucune réaction immunologique avec les germes *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus foecalis* qui sont à l'origine des réactions croisées avec *Listeria monocytogenes* véritable obstacle à l'interprétation du séro-diagnostic de listériose.

Nous avons choisi pour effectuer la réaction, l'antigène 2 partiellement purifié par filtration sur Sépharose 4B.

b) Choix de la concentration de l'antigène

Dosage de l'antigène

La fraction 3 contenant l'antigène 2 partiellement purifié est dosé à environ 1 mg par ml en protéines.

L'antigène 2 a été dosé également par immunoélectrophorèse simple, technique des "rockets" (10) à l'aide de l'immun-sérum monospécifique anti-antigène 2.

Nous sommes partis de différentes concentrations en protéines de l'antigène 2.

4 μ l de chaque concentration 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g, 125 μ g par ml ont été déposés vis à vis de 100 μ l de l'immun-sérum monovalent anti-antigène 2.

TABLEAU 6

Concentration en proteines	Hauteur du pic
125 $\mu\text{g/ml}$	35 mm
75 $\mu\text{g/ml}$	25 mm
50 $\mu\text{g/ml}$	19,5 mm
25 $\mu\text{g/ml}$	13,5 mm

DOSAGE DE L'ANTIGENE 2 PARTIELLEMENT PURIFIE
PAR IMMUNOELECTROPHORESE SIMPLE "ROCKETS"



Les résultats obtenus nous ont permis de tracer la courbe (FIGURE 6) de dosage représentant la hauteur des pics de précipitation en fonction de la concentration en antigène 2.

Les faibles volumes d'antigène 2 purifié obtenus au cours de chaque chromatographie sur Sépharose 4B sont insuffisants pour tous nos essais. Il nous a fallu rassembler plusieurs fractions n° 3 (contenant l'antigène 2 partiellement purifié) de concentrations équivalentes en protéines pour réaliser tous nos essais.

Choix de la concentration

Nous avons effectué des dilutions à partir de la fraction n° 3 à 1 mg par ml en protéines.

Les essais ont été faits sur les différentes concentrations de l'antigène 2 de 1 μ g à 10 μ g par ml, afin de déterminer la concentration adéquate pour l'E.L.I.S.A.

Pour cette étude préliminaire nous avons employé l'immunosérum anti-antigène 2 et le conjugué anti IgG (Chaîne lourde et légère) de lapin marqué à la phosphatase alcaline (9).

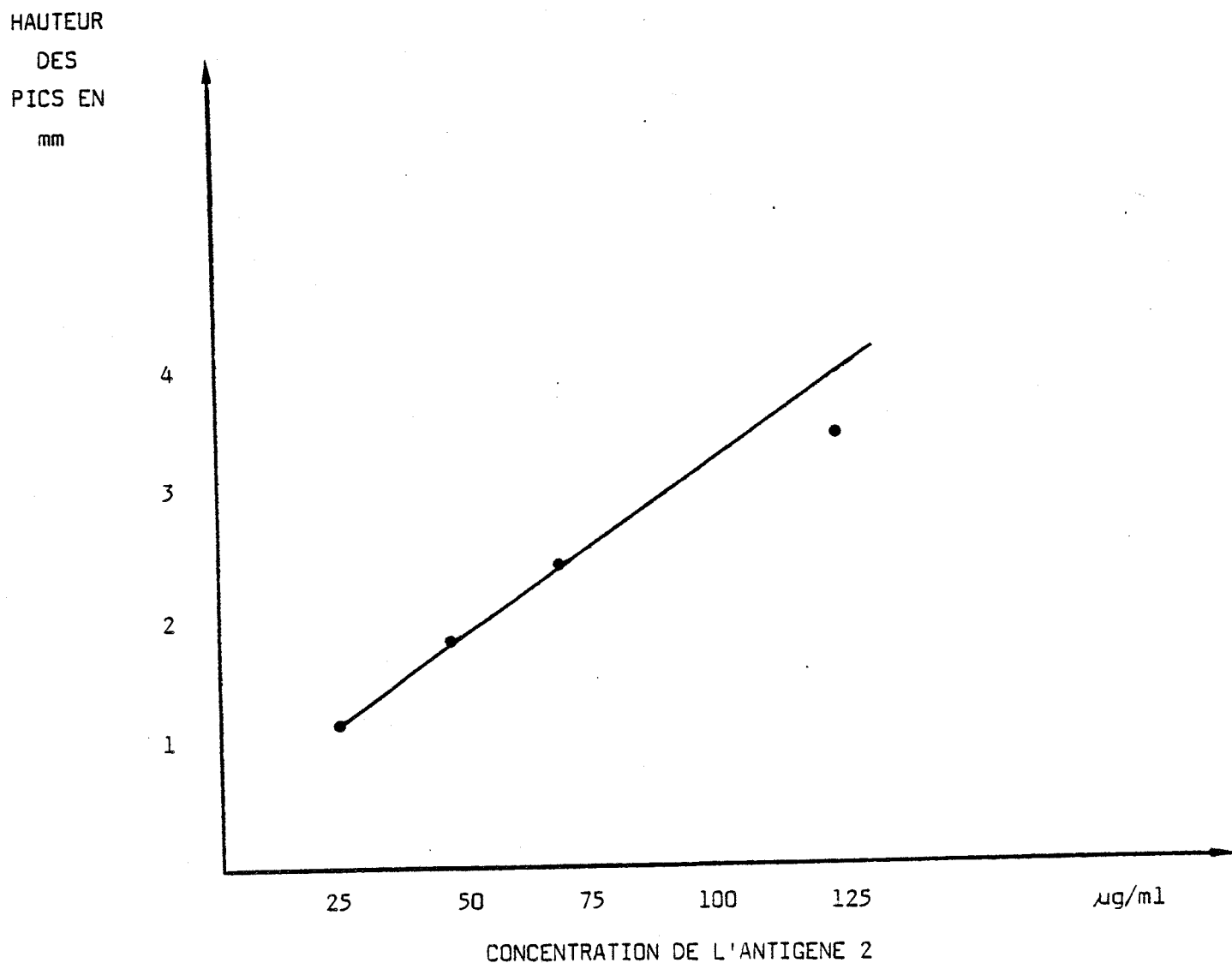


FIGURE 6 : COURBE DE DOSAGE DE L'ANTIGENE 2 PAR IMMUNOELECTROPHORESE SIMPLE
TECHNIQUE DES "ROCKETS" A L'AIDE DE L'IMMUN-SERUM ANTI-ANTIGENE 2



Chaque cupule reçoit 100 μ l de solution antigénique de chacune des concentrations suivantes 1 μ g, 2,5 μ g, 5 μ g, 7,5 μ g, 10 μ g. Après l'addition du sérum monospécifique de lapin anti-antigène 2 dilué au 1:10 suivant une progression géométrique de raison 2, on ajoute les conjugués anti-IgG de lapin dilués au 1:50 selon les instructions du fabricant (FUMOUZE). Après élimination du conjugué en excès, les réactions sont révélées par le substrat para-nitrophényl phosphate à 1 mg par ml. La coloration jaune est obtenue par action de la phosphatase alcaline qui scinde le para-nitrophényl-phosphate en phosphate et para-nitrophénol.

L'activité de la phosphatase alcaline est proportionnelle à la quantité du conjugué fixée sur les anticorps spécifiques de l'antigène 2 adsorbé sur les cupules. L'intensité de la coloration est proportionnelle à cette activité.

Les densités optiques obtenues pour les différentes concentrations d'antigène 2 sont rapportées dans le tableau 7.

Il nous est apparu que les concentrations de l'antigène 2 de 5 μ g à 7,5 μ g sont les plus adéquates pour l'E.L.I.S.A.

Nous avons obtenu des densités de 0,61 et 0,68 pour une dilution de 1:160 de l'immun-sérum anti-antigène 2, pour la concentration de 5 μ g et 7,5 μ g par ml.

TABLEAU 7

DILUTIONS DU SERUM MONOSPECIFIQUE ANTI Ag2 DE LAPIN	DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE L'ANTIGENE 2 exprimées en µg/ml				
	1	2,5	5	7,5	10
1:10	1,189	1,148	1,264	1,264	0,921
1:20	1,009	0,880	0,928	1,084	0,825
1:40	0,753	0,681	0,923	0,945	0,691
1:80	0,511	0,639	0,657	0,740	0,605
1:160	0,328	0,482	0,619	0,683	0,473
1:320	0,258	0,391	0,566	0,622	0,462
1:640	0,256	0,320	0,513	0,462	0,395
1:1280	0,197	0,295	0,413	0,344	0,335
1:2560	0,132	0,208	0,227	0,291	0,248
1:5120	0,092	0,113	0,124	0,121	0,116
Témoin Ag2	0,000	0,003	0,000	0,009	0,001

CHOIX DE LA CONCENTRATION DE L'ANTIGENE 2

La dilution du conjugué anti-IgG de lapin est égale à 1:50
sérum positif monovalent anti-antigène 2.

Densité optique à $\lambda = 405 \text{ nm}$



Nous avons fait une autre étude sur un sérum positif et un sérum négatif humains à deux dilutions différentes de 1:160 et 1:320. Nous avons effectué la réaction à l'aide des conjugués anti-IgM humain dilué au 1:45 selon les instructions du fabricant (BEHRING).

Les résultats pour ces sérums sont rapportés dans le tableau 8. La courbe représentant les différentes concentrations en antigène 2 nous montre que les concentrations 6 μg et 7,5 μg sont les valeurs de choix pour la réaction immunoenzymatique. Ces deux valeurs nous ont donné les différences de densités maximales entre le sérum positif et le sérum négatif. Nous avons choisi la valeur de 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en antigène 2 pour nos essais.

TABLEAU 8

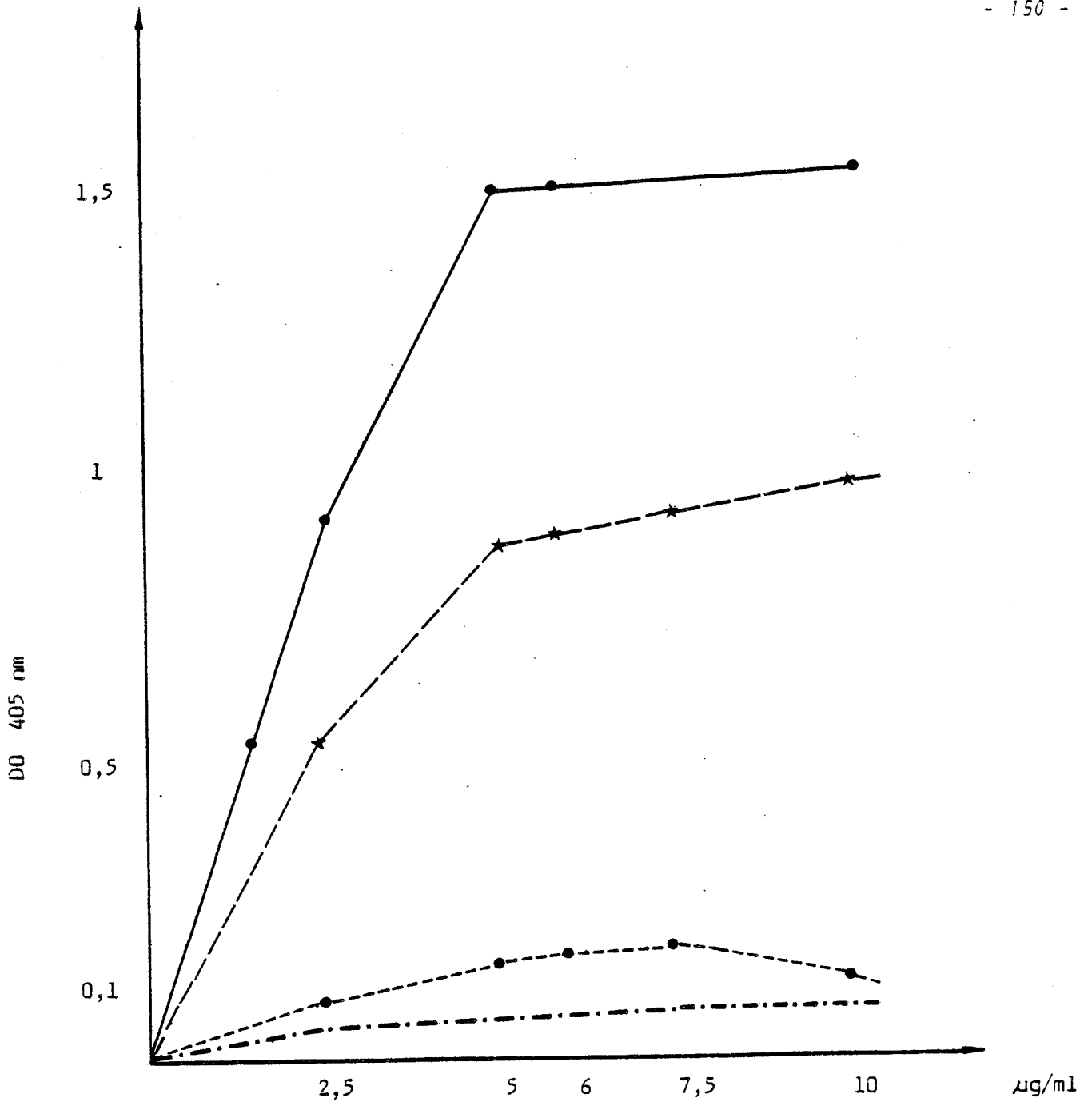
SERUMS HUMAINS	DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE L'ANTIGENE 2				
	Exprimées en $\mu\text{g/ml}$				
Sérum positif à la dilution	2,5	5	6	7,5	10
- 1:160	0,882	1,497	1,499	1,672	1,528
- 1:320	0,557	0,868	0,914	0,943	0,995
Sérum négatif à la dilution					
- 1:160	0,089	0,167	0,146	0,182	0,141
- 1:320	0,045	0,070	0,073	0,079	0,082

CHOIX DE LA CONCENTRATION DE L'ANTIGENE 2

La dilution du conjugué anti IgM humain est égale à 1:45

Densité optique à $\lambda = 405 \text{ nm}$





CONCENTRATION DE L'ANTIGENE 2

FIGURE 7 : CHOIX DE LA CONCENTRATION DE L'ANTIGENE 2

A L'AIDE D'UN SERUM POSITIF ET D'UN SERUM NEGATIF

- Sérum négatif au 1:160
- .-.-.- Sérum négatif au 1:320
- Sérum positif au 1:320
- Sérum positif au 1:160



1.2 Résultats du titrage des anticorps des sérums

289 sérums provenant du laboratoire ont été étudiés en E.L.I.S.A. (32). Ces sérums sont répartis en trois groupes A, B, C. Les titres des sérums sont exprimés par le dénominateur de la dilution la plus forte des sérums capables de former un immun-complexe avec l'antigène 2.

Pour les trois groupes de sérums nous avons calculé la moyenne géométrique des titres des sérums.

a) Calcul de la moyenne géométrique

Soit x = titre du sérum

$X = \sum_{i=1}^n x_i$ la somme de tous les titres des sérums

Calcul du logarithme à base de 2 du titre du sérum

$$\log_2 x = \frac{\log_{10} x}{\log_{10} 2}$$

La somme des logarithmes des titres

$$\log_2 X = \log_2 \sum_{i=1}^n x_i$$

Le logarithme de la moyenne géométrique

$$\log_2 X_G = \frac{\log_2 X}{n}$$

La moyenne géométrique s'exprime par

$$X_G = \text{anti log} = \frac{\log X}{n}$$

b) Résultats

La détection des IgM et IgG dans les sérums utilisant l'antigène 2 partiellement purifié nous ont donné les résultats rapportés dans le tableau emprunté à ROUSSEL-DELVALLEZ et coll (32).

27 sérums de mères de nouveau-nés chez qui a été isolé *Listeria monocytogenes* au laboratoire ont des titres de 0 à 5.120 en IgM et IgG, la moyenne géométrique est de 623,78 pour IgM et 247,55 pour les IgG. Il existe une différence significative entre ce groupe de sérum et le second groupe de 69 sérums de femmes enceintes, mères de nouveau-nés et nouveau-nés représentant une population "saine" les titres étant de 10 à 80 en IgG et IgM, la moyenne géométrique est de 18,80 en IgM et 13,29 en IgG.

Pour le troisième groupe d'individus sains représentant différentes tranches d'âge les titres varient de 10 à 80. La moyenne géométrique est de 24,25 en IgM et 17,14 en IgG.

Tous les sérums ayant un titre élevé en IgM sont négatifs en réaction d'agglutination sur les particules de latex pour la détection du facteur rhumatoïde.

TABLEAU 9

PROVENANCE DES SERUMS	NOMBRE DES SERUMS	MOYENNE GEOMETRIQUE DES TITRES	
		IgM	IgG
Sérums de mères de nouveau-nés chez qui a été isolé <i>Listeria monocytogenes</i> .	27	623,78	247,55
<u>Sérums d'individus "sains"</u>			
- nouveau-nés	13	5,87	11,73
- femmes enceintes, et mères de nouveau-nés	56	18,80	13,29
- d'autres tranches d'âge			
. 3 mois - 10 ans	41	15,26	12,46
. 11 mois - 20 ans	18	24,25	13,29
. 21 mois - 30 ans	21	13,91	11,79
. 31 mois - 40 ans	28	19,03	12,50
. 41 mois - 50 ans	25	12,14	13,57
. 51 mois - 60 ans	18	9,61	17,14
. 61 mois - 70 ans	21	9,06	14,86
. 71 mois - 90 ans	21	9,36	10,68

MOYENNE GEOMETRIQUE DES TITRES DE 289 SERUMS
ETUDIES EN E.L.I.S.A. AVEC L'ANTIGENE 2



Nous avons effectué une étude en "aveugle" en collaboration avec le laboratoire "Central Public Health Laboratory" à Londres du Dr. A.G. TAYLOR sur 60 sérums humains.

Les valeurs des densités optiques obtenues pour différentes dilutions des sérums sont rapportées dans le tableau 10. Les renseignements cliniques que le Dr. A.G. TAYLOR nous a envoyés concernant les malades pour lesquels nous avons testé les 60 sérums, nous ont permis de diviser ces sérums en deux groupes :

- Un premier groupe de 29 sérums provenant d'individus ne présentent aucun symptôme évocateur de listériose.

- Un deuxième groupe de 31 sérums, provenant d'individus chez lesquels la listériose a été diagnostiquée.

Pour ces deux groupes, nous avons calculé la moyenne ainsi que l'écart type pour les IgM et les IgG à la première dilution du sérum au 1:20 de façon à éviter les grandes variations dans nos calculs, qui seraient dûes aux fluctuations provoquées par les dilutions progressives des sérums.

* Pour la détection des anticorps IgM, la moyenne des individus "sains" est de ($m = 0,14$, $\sqrt{s} = 0,09$). Nous avons considéré la valeur de $(0,14 + 0,09) = 0,23$ comme le seuil significatif, ce qui nous donne pour les 60 sérums étudiés, les titres qui apparaissent dans le tableau 10.

TABLEAU 10

Renseignements cliniques	N° des sérums	Valeurs des densités optiques obtenues pour différentes dilutions des sérums					* Titres des sérums
INDIVIDUS SAINS		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
DONNEURS DE SANG	4	IgM 0,149	0,095	0,072	0,060	0,082	< 20
		IgG >1,5	1,069	0,479	0,325	0,228	
	19	IgM 0,092	0,072	0,059	0,055	0,053	< 20
		IgG 0,818	0,343	0,197	0,126	0,092	
	24	IgM 0,149	0,105	0,083	0,069	0,061	< 20
		IgG 0,892	0,590	0,459	0,286	0,216	
	25	IgM 0,184	0,145	0,097	0,081	0,071	< 20
		IgG >1,5	0,829	0,470	0,318	0,196	
	30	IgM 0,101	0,079	0,068	0,065	0,063	< 20
		IgG 0,717	0,333	0,295	0,231	0,150	
	32	IgM 0,098	0,046	0,023	0,012	0,005	< 20
		IgG 0,536	0,283	0,173	0,092	0,052	
	40	IgM 0,023	0,004	0,010	0,012	0,014	< 20
		IgG 0,714	0,395	0,322	0,171	0,110	
	41	IgM 0,037	0,007	-0,002	-0,006	-0,012	< 20
		IgG 0,151	0,073	0,026	0,011	0,000	
	46	IgM 0,119	0,047	0,033	0,012	0,000	< 20
		IgG 1,272	0,678	0,379	0,228	0,166	
	50	IgM 0,058	0,023	0,010	0,000	-0,004	< 20
		IgG 0,264	0,133	0,072	0,041	0,023	

* Les titres des sérums ont été déterminés en mettant le seuil significatif à une valeur de 0,23 obtenue par le calcul de la moyenne et de l'écart type $m + \sigma$

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES	N° des Sérum	VALEURS DES DENSITES OPTIQUES OBTENUES POUR DIFFERENTES DILUTIONS DES SERUMS					Titres des sérums
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
LEGIONELLOSE							
Sérums négatifs.....	6	IgM 0,139	0,101	0,080	0,068	0,006	< 20
		IgG 1,145	0,852	0,466	0,214	0,149	
	10	IgM 0,447	0,119	0,091	0,076	0,071	20
		IgG 0,990	0,559	0,359	0,244	0,171	
	26	IgM 0,288	0,195	0,149	0,104	0,081	< 20
		IgG 0,984	0,546	0,366	0,220	0,173	
	34	IgM 0,166	0,083	0,062	0,043	0,030	< 20
		IgG 0,709	0,425	0,248	0,173	0,101	
	38	IgM 0,121	0,056	0,034	0,017	0,010	< 20
		IgG 1,415	1,060	0,819	0,577	0,384	
	49	IgM 0,072	0,041	0,024	0,013	0,005	< 20
		IgG 0,686	0,413	0,259	0,133	0,093	
Sérum positifs.....	20	IgM 0,076	0,064	0,059	0,057	0,053	< 20
		IgG 0,362	0,334	0,297	0,254	0,209	
	21	IgM 0,154	0,102	0,081	0,074	0,067	< 20
		IgG 0,636	0,333	0,231	0,162	0,117	
	28	IgM 0,111	0,076	0,062	0,063	0,055	< 20
		IgG 0,588	0,345	0,239	0,150	0,139	
	45	IgM 0,226	0,110	0,048	0,025	0,013	< 20
		IgG 0,236	0,109	0,081	0,059	0,026	
	48	IgM 0,014	0	-0,006	-0,010	-0,009	< 20
		IgG 0,869	0,558	0,373	0,211	0,134	



Renseignements cliniques	N° des sérums	Valeurs des densités optiques obtenues pour différentes dilutions des sérums					Titres des sérums	
ANTISTREPTOLYSINE O POSITIVE	8	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	< 20	
		IgM 0,099	0,072	0,066	0,053	0,052		
	11	IgG 0,374	0,284	0,198	0,147	0,111	< 20	
		IgM 0,198	0,137	0,106	0,095	0,077		
	15	IgG 0,360	0,241	0,159	0,121	0,118	< 20	
		IgM 0,124	0,081	0,062	0,060	0,054		
	33	IgG 0,200	0,116	0,074	0,065	0,058	< 20	
		IgM 0,072	0,027	0,013	0,002	0,002		
			IgG 0,509	0,197	0,105	0,050	0,020	< 20
			IgM 0,099	0,075	0,067	0,058	0,057	
	INFECTION A STAPHYLOCOQUE (nucléase, α -lysine)	1	IgG 1,416	1,077	0,577	0,438	0,274	< 20
			IgM 0,135	0,105	0,086	0,078	0,069	
14		IgG 1,400	0,813	0,444	0,334	0,197	< 20	
		IgM 0,094	0,074	0,052	0,055	0,053		
18		IgG 0,404	0,240	0,137	0,106	0,087	< 20	
		IgM 0,071	0,062	0,054	0,048	0,049		
22		IgG 0,444	0,272	0,181	0,125	0,095	< 20	



Renseignements cliniques	N° des Sérums	Valeurs des densités optiques obtenues : Pour différentes dilutions des sérums						Titres des sérums
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		
INFECTIONS POSSIBLES								
Infection pulmonaire.....	13	IgM 0,078 IgG 0,105	0,066 0,077	0,060 0,056	0,058 0,054	0,052 0,051	< 20	
?	29	IgM 0,375 IgG 0,871	0,257 0,492	0,189 0,304	0,135 0,209	0,102 0,141	40	
Encéphalite.....	31	IgM 0,115 IgG 0,189	0,072 0,076	0,038 0,040	0,023 0,019	0,013 0,006	< 20	
?	44	IgM 0,226 IgG 0,426	0,113 0,236	0,069 0,140	0,031 0,080	0,013 0,043	< 20	
?	52	IgM 0,092 IgG 1,108	0,033 0,568	0,016 0,442	0,005 0,268	0,001 0,218	< 20	
Avortements à répétition.....	36	IgM 0,385 IgG 0,438	0,173 0,233	0,072 0,096	0,040 0,059	0,018 0,031	20	
Avortement spontané.....	37	IgM 0,031 IgG 0,311	0,009 0,138	0,000 0,103	-1 0,032	-5 0,018	< 20	
Avortement spontané.....	39	IgM 0,093 IgG 1,340	0,039 0,597	0,028 0,305	0,028 0,170	0,005 0,098	< 20	
Avortements à répétition.....	47	IgM 0,358 IgG 0,241	0,147 0,126	0,096 0,071	0,048 0,046	0,022 0,022	20	
Avortements à répétition Infection à lactobacille (?).....	55	IgM 0,079 IgG 0,433	0,044 0,211	0,015 0,100	0,013 0,066	0,001 0,030	< 20	



Renseignements cliniques	N° des Sérum	Valeurs des densités optiques obtenues pour différentes dilutions des sérums					Titres des sérums
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
LISTERIOSE DE TYPE 4 (adulte)							
Sépticémie	12	IgM 0,187	0,126	0,108	0,108	0,097	< 20
		IgG 0,300	0,194	0,133	0,101	0,085	
Même sérum.....	51	IgM 0,126	0,091	0,079	0,042	0,023	< 20
		IgG 0,288	0,114	0,057	0,035	0,015	
	2	IgM 0,224	0,174	0,156	0,132	0,110	< 20
		IgG 0,476	0,290	0,197	0,147	0,106	
	42	IgM 0,085	0,039	0,016	0,070	0,030	20
		IgG 0,236	0,093	0,056	0,022	0,011	
	5	IgM 0,293	0,186	0,158	0,123	0,098	20
		IgG 0,487	0,309	0,203	0,160	0,116	
Méningite	27	IgM 0,370	0,187	0,133	0,105	0,090	20
		IgG 0,319	0,176	0,127	0,087	0,072	
Bactériémie	43	IgM 0,168	0,110	0,065	0,056	0,024	20
		IgG 0,598	0,433	0,361	0,291	0,230	
Méningite	56	IgM 0,270	0,162	0,097	0,063	0,053	20
		IgG 0,838	0,423	0,289	0,176	0,102	



Renseignements cliniques	N° des Sérums	Valeurs des densités optiques obtenues pour différentes dilutions des sérums					Titres des sérums
LISTERIOSE DE TYPE 1 (adulte)		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
Méningite	9	IgM 0,421	0,316	0,236	0,172	0,131	80
		IgG 0,379	0,201	0,141	0,106	0,086	
Méningite, septicémie	17	IgM 0,235	0,162	0,124	0,103	0,078	20
		IgG 1,379	1,139	0,945	0,742	0,502	
Septicémie	35	IgM 0,049	0,025	0,008	0,000	0,027	< 20
		IgG 0,109	0,047	0,019	0,010	0,08	
Même sérum.....	7	IgM 0,098	0,072	0,064	0,056	0,052	< 20
		IgG 0,178	0,117	0,095	0,133	0,066	
Même sérum.....	53	IgM 0,031	0,009	0,000	-0,05	-0,09	< 20
		IgG 0,116	0,055	0,030	-0,014	-0,005	



Renseignements cliniques	N° des Sérum	Valeurs des densités optiques obtenues pour différentes dilutions des sérums					Titres des sérums	
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		
LISTERIOSE DE TYPE 1								
Mère 1 } nouveau-né	54	IgM	0,070	0,032	0,015	0,008	0,001	< 20
Mère 2 } Infection croisée (fièvre)		IgG	0,370	0,168	0,107	0,052	0,028	
	59	IgM	0,054	0,040	0,010	0,000	0,001	< 20
		IgG	0,705	0,506	0,316	0,239	0,140	
LISTERIOSE DE TYPE 4								
Mère avortement	3	IgM	0,815	0,406	0,230	0,159	0,115	80
		IgG	1,166	0,641	0,419	0,260	0,199	
Mère 1 } (fièvre)	23	IgM	0,700	0,335	0,233	0,167	0,117	80
Mère 1 } Nouveau-né infection croisée		IgG	>1,5	>1,5	1,176	0,956	0,663	
Mère 2 } même sérum.....	58	IgM	0,509	0,208	0,068	0,040	0,018	20
Mère 2 }		IgG	>1,5	>1,5	1,234	0,839	0,582	
	16	IgM	0,224	0,140	0,102	0,084	0,070	< 20
		IgG	0,469	0,347	0,223	0,186	0,138	
	57	IgM	0,239	0,148	0,082	0,064	0,043	20
		IgG	0,732	0,337	0,186	0,122	0,064	
Enfant de mère 2	60	IgM	0,078	0,036	0,018	0,030	0,000	< 20
		IgG	0,696	0,358	0,238	0,105	0,137	



La différence entre les individus "sains" et les individus atteints de listériose est hautement significative dans les deux groupes :

- Septicémie, méningite : moyenne ($m = 0,27$, $\sigma = 0,27$)
($t = 1,71$ $p < 0,001$)

- Listériose néo-natale ($m = 0,37$, $\sigma = 0,29$) ($t = 2,23$
 $p < 0,001$)

* Pour la détection des anticorps IgG la moyenne des individus "sains" est de ($m = 0,76$, $\sigma = 0,42$), l'écart à la moyenne est grand ce qui expliquerait les variations que nous avons obtenues pour les différentes valeurs des densités optiques.

Si nous étudions plus précisément les cas de listériose néo-natale : nous avons observé dans les deux types de *Listeria* 1 et 4 deux cas d'infections croisées : deux mères 1 et 2 dont l'une seule a développée une listériose, et seul l'enfant de l'autre mère a été infecté.

Dans le cas de listériose de type 1 : aucune des deux mères ne présente d'anticorps IgM, même la mère pour laquelle le diagnostic de listériose a été posé. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous n'avons disposé que d'un seul sérum, sans doute trop proche de la phase aiguë de la maladie.

Dans le cas de la listériose de type 4, nous disposons de deux sérums pour chacune des deux mères.

Pour la mère 1, chez laquelle la listériose a été diagnostiquée il s'agit de deux sérums pris à des temps différents par rapport au pic fébrile. On observe une légère diminution des IgM entre le premier et le deuxième sérum.

Chez la mère 2, qui n'a pas fait d'infection il s'agit du même sérum, référé sur deux numéros différents et on note le même titre ce qui prouve bien la fiabilité de la méthode. Nous disposons du sérum de l'enfant de cette mère 2. Cet enfant semble avoir été contaminé par la mère 1 mais il n'a pas été possible de mettre en évidence d'IgM chez cet enfant. Bien que l'on a vu qu'il était difficile d'interpréter la présence des IgG, on peut quand même noter que dans le cas présent, l'enfant possède le même titre que sa mère.

Par ailleurs, les titres en anticorps de la mère ayant présenté un avortement confirme le diagnostic clinique d'avortement listérien.

c) Conclusion

Les résultats semblent satisfaisants en ce qui concerne la détection des IgM dans les sérums. Nous avons obtenu une bonne corrélation entre les résultats sérologiques et les résultats bactériologiques. Par ailleurs, une amélioration s'impose en ce qui concerne la détection des IgG.

Néanmoins, ces études ayant été réalisées avec un antigène 2 partiellement purifié, on peut espérer qu'avec le nouvel antigène 2 immunologiquement pur, issu de la chromatographie d'échange d'ions le nombre des discordances obtenues pour la détection des IgG sera amoindri.

DISCUSSION ET CONCLUSION

I DISCUSSION ET CONCLUSION

De nombreuses méthodes immunologiques (65 - 142) ont été proposées pour la recherche des anticorps anti-*Listeria* dans les sérums. De nombreuses techniques (27 - 34 - 97 - 101) ont été mises au point ; de même, différentes préparations antigéniques ont été réalisées à partir de bactéries entières (114). Pourtant, bien que l'antigène le plus fréquemment utilisé soit des bactéries entières utilisées en réaction d'agglutination complétée ou non par une réaction de fixation du complément, une grande confusion subsiste encore et les résultats sont parfois contradictoires avec le diagnostic clinique :

- soit par des réactions faussement positives qui peuvent s'expliquer par des réactions croisées (168 - 141 - 142) avec d'autres bactéries : Staphylocoque, Streptocoque, etc.

- soit par des réactions faussement négatives pouvant être dues à l'antigène ne correspondant pas à la fraction majeure, immunogène.

Le but de notre travail était donc de préparer un antigène spécifique de *Listeria monocytogenes* (31) qui soit un antigène majeur chez l'homme et qui puisse être utilisé pour le séro-diagnostic de la listériose.

Cet antigène devait répondre aux critères suivants.

a) Il devait être spécifique d'espèce ou de genre.

b) Etant donné le manque de spécificité des extraits bruts en E.L.I.S.A. (48), l'antigène devait être obtenu sous une forme purifiée pour pouvoir être utilisé ultérieurement dans une technique telle que l'E.L.I.S.A., qui était employée au laboratoire et qui avait en outre l'avantage de permettre la détection des IgM et des IgG sans technique préalable de séparation.

c) Il devait induire des anticorps de même spécificité chez l'homme et le lapin. En effet, comme il est très difficile de se procurer des sérums humains provenant de patients dont le diagnostic de listériose avait été prouvé bactériologiquement, cette étude ne pouvait être menée qu'avec des sérums de lapins hyperimmunisés.

L'étude a porté sur les antigènes hydrosolubles libérés lors du broyage à la X-press. Cette technique est intéressante car elle ne fait intervenir aucun produit chimique supplémentaire, produit difficile parfois à éliminer et nécessitant souvent une étape de dialyse des extraits obtenus. Le rendement a été de 90p100. Cette technique convient aux petites quantités de matériel bactérien. En effet, une dizaine de grammes environ de *Listeria* sont suffisants pour effectuer un broyat. Cependant, les faibles quantités obtenues dans l'extrait soluble S 40 ont nécessité la préparation de 22 broyats pour réaliser tous les essais.

1. Détection des antigènes

L'extrait antigénique S 40 a été étudié par immuno-précipitation. SEELIGER (142) et MURASCHI (103) ont démontré l'avantage de cette méthode par rapport à la réaction d'agglutination du fait qu'il existe moins de réactions croisées avec d'autres bactéries. L'immunodiffusion a révélé trois arcs de précipitation correspondant à trois fractions antigéniques. Devant le petit nombre d'antigènes mis en évidence par l'immunodiffusion, nous avons utilisé, pour notre étude antigénique, l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle de LAURELL (86) et de WEEKE (166). Les profils obtenus varient suivant l'immun-sérum employé : 9 fractions antigéniques sont détectées dans l'extrait S 40 à l'aide de l'immun-sérum anti-bactéries entières ; par contre, les immun-sérums anti CSE et anti CE mettent en évidence 17 fractions antigéniques. Ces résultats confirment les travaux de DELVALLEZ et coll (31) sur la structure de *Listeria monocytogenes*. Ils ont également permis de conclure que la structure antigénique est plus complexe que ne l'avait démontré ARMSTRONG (5). Nos résultats sont à rapprocher de ceux de COOPER (28) qui obtient 16 fractions antigéniques par extraction au chloroforme des cultures de *Listeria monocytogenes* sérovar 5. Parmi les 17 fractions antigéniques mises en évidence dans l'extrait soluble S 40, un antigène est nettement majoritaire. Cet antigène, retrouvé dans la bactérie et le contenu cellulaire est dénommé l'antigène 2 par DELVALLEZ et coll (31).

L'application de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle pour la détection des antigènes solubles de *Listeria monocytogenes* a été une méthode intéressante aussi bien pour déterminer la composition antigénique des extraits CE, CSE, S40, que pour le choix de l'antigène majeur.

2. Méthodes de purification

Les essais de purification ont porté sur l'antigène 2 qui induit des anticorps chez l'homme et chez le lapin. La technologie de séparation utilisée a été essentiellement la filtration sur gel de Sépharose 4B. Cette dernière n'a permis d'isoler aucune fraction immunologiquement pure d'antigène 2. 17 antigènes sont élués dans deux fractions ; la fraction 3 et la fraction 4.

Nous avons donc envisagé de modifier les conditions opératoires essentiellement les trois paramètres connus pour influencer sur la résolution de la chromatographie : la hauteur du lit du gel et le débit d'élution ainsi que la force ionique du tampon d'élution. En ce qui concerne le premier paramètre nous n'avons pas pu modifier les conditions opératoires, car nous étions déjà dans des conditions maximales : colonne de 1 m de haut. Il était possible d'effectuer la séparation à un débit inférieur à 12 ml par heure. L'essai effectué n'a montré aucune amélioration de la technique.

Les résultats obtenus avec un autre type de gel, le gel Séphacryl avec un tampon d'élution de force ionique plus élevée se sont avérés identiques à ceux obtenus par le premier gel avec la force ionique de départ.

La filtration sur gel ne permet donc pas la séparation de l'antigène 2 des autres antigènes du fait des poids moléculaires proches. Les 17 antigènes détectés ont un poids moléculaire compris entre $232 \cdot 10^3$ daltons et $67 \cdot 10^3$ daltons.

La filtration sur gel ne permet d'obtenir qu'une fraction fortement enrichie en antigène 2.

La détection de l'antigène 2 dans les fractions obtenues par filtration sur gel, ainsi que le dosage ont été effectués grâce à l'immun-sérum anti-antigène 2 par l'immunoélectrophorèse simple "technique des rockets". Cette technique a permis d'établir une relation linéaire entre la concentration en protéines et la concentration en antigène 2.

Récemment, l'utilisation de la chromatographie d'échange d'ions avec l'appareillage "FPLC" (PHARMACIA) chromatographie rapide a permis la purification de l'antigène 2. Le critère de pureté immunologique a été prouvé par immunoélectrophorèse bidimensionnelle qui a révélé un seul pic de précipitation. La préparation de l'antigène 2 par chromatographie d'échange d'ions a permis d'obtenir l'antigène 2 à une concentration cinq fois plus élevée que l'antigène 2 partiellement purifié.

3. Propriétés physico-chimiques de l'antigène 2

Les connaissances de ses propriétés physico-chimiques sont beaucoup plus restreintes, la faible quantité d'antigène obtenu n'ayant

pas permis une étude approfondie. L'antigène 2 est une glycoprotéine de poids moléculaire de 160 000 daltons déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (26) et par la présence d'un pic de 160 000 daltons en gel de filtration.

L'électrofocalisation donne un point isoélectrique de 4,2 ; cette molécule ne possède aucune activité enzymatique (26). L'antigène 2 est chargé négativement à pH 8 car il est retenu sur colonne mono Q ($-\text{CH}_2 - \overset{+}{\text{N}} - (\text{CH}_3)_3$) d'échange d'anions, ce qui pourrait expliquer sa migration anodique en immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

4. Spécificité de l'antigène 2

Il est spécifique du genre *Listeria* (31). Des extraits de tous les sérotypes de *Listeria monocytogenes* ont été testés ; ils contiennent l'antigène dans la même proportion.

Aucune réaction croisée n'a été obtenue avec des immun-sérums préparés contre les extraits de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis*.

5. Localisation de l'antigène 2

Les tests d'immunofluorescence réalisés avec l'immun-sérum anti-antigène 2 (31) ont montré sa localisation en surface, mais il n'a pas pu être déterminé si l'antigène est associé à la paroi ou à la capsule de *Listeria monocytogenes*.

6. Application de l'antigène 2 au séro-diagnostic

Les essais de séro-diagnostic ont été effectués avec la fraction enrichie en antigène 2 obtenue par filtration sur gel. Le choix a porté sur la technique E.L.I.S.A., réaction immunologique très sensible et peu consommatrice d'antigène.

349 sérums ont été étudiés par la technique E.L.I.S.A. Elle répond aux critères de qualité essentiels à une méthode de diagnostic : la sensibilité, la maniabilité puisque toutes les étapes que requiert la technique, dilution des sérums, lavages, lecture des résultats sont directement applicables à l'automatisation.

Dans cette mesure l'E.L.I.S.A. est à la portée de tout laboratoire de diagnostic. Ce test ne nécessite ni appareil coûteux, ni emploi des radioisotopes tout en offrant la sensibilité et la spécificité des réactions radio-immunologiques (135). Les très faibles quantités d'antigène requises (6μ pour l'antigène 2) sont compatibles avec l'utilisation d'antigènes purifiés.

Les résultats obtenus pour la détection des IgM et IgG dans les sérums ont été satisfaisants pour les IgM sur le plan de la spécificité : tous les sérums positifs ont donné des valeurs significativement plus hautes que les sérums négatifs. Les résultats bactériologiques sont en concordance avec les résultats de l'E.L.I.S.A. La possibilité des réactions croisées avec *Staphylococcus aureus* a été prise en considération. Des absorptions des sérums sur *Staphylococcus* ont été effectuées selon la méthode de LARSEN (85). Les sérums absorbés ont été testés en E.L.I.S.A.

Les sérums ont gardés leurs titres avant l'absorption dans la majorité des cas. Cependant pour certains sérums la baisse du titre du sérum a été d'une dilution. Donc la possibilité des réactions croisées semble être exclue par l'emploi de l'antigène 2 spécifique de *Listeria monocytogenes*.

Pour les sérums positifs en IgM, la recherche du facteur rhumatoïde a été effectuée sur les sérums précédemment cités. Les réactions se sont révélées négatives.

Il a été possible de suivre la cinétique d'évolution d'anticorps de deux patients, mères de nouveaux-nés chez qui a été isolé *Listeria monocytogenes*. L'E.L.I.S.A. a permis d'observer une décroissance de la positivité des titres des sérums en IgM et une élévation des titres en IgG. Cependant la détection des IgG n'a pas été très spécifique dans tous les sérums. Des densités optiques relativement élevées ont été observées chez des individus "sains" ou ne présentant pas de symptômes évocateurs de listériose. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les essais de séro-diagnostic ont été effectués à l'aide de l'antigène 2 partiellement purifié. L'obtention en quantité suffisante de l'antigène 2 immunologiquement pur par chromatographie d'échange d'ions devrait permettre la mise au point d'une réaction plus spécifique. Toutefois, les premiers essais de titrage des anticorps IgG et IgM qui ont été effectués à 1 μ g par ml en antigène 2, se sont révélés non concluants. Les valeurs des densités optiques sont très faibles pour les sérums positifs. Cet échec peut s'expliquer soit par une adhérence faible de l'antigène 2 à la surface des plaques de microtitrages, soit par une compétition des anticorps IgG et IgM vis à vis de l'antigène fixé, soit par une combinaison de ces deux facteurs.

Des essais sont en cours pour mettre en oeuvre une réaction immuno-enzymatique en double "sandwich" avec des plaques anti-immunoglobulines anti μ humains, dans cette technique, les anticorps anti μ servent à la capture des IgM des sérums à examiner. L'antigène 2 ensuite ajouté se fixe sur les IgM homologues. La quantité d'antigène 2 fixé est alors déterminée par un système révélateur (sérum de lapin anti-antigène 2, sérum marqué anti-immunoglobulines de lapin). Cette méthode aura l'avantage de faire disparaître la concurrence entre IgG et IgM et d'éviter la fixation des anticorps facteurs rhumatoïdes (IgM anti-immunoglobulines) (114b).

RESUME

Au cours de ce travail, nous avons démontré la possibilité d'isoler et de purifier un antigène spécifique de *Listeria* pour l'utiliser dans le séro-diagnostic de la listériose.

Nous avons préparé un extrait antigénique S40 de *Listeria monocytogenes* sérovar 4b par passage à la X-press et centrifugation différentielle.

L'étude antigénique de l'extrait a été réalisée par les différentes méthodes immunologiques : immunodiffusion sur gel, immunoélectrophorèse bidimensionnelle qui nous a révélé la présence de 17 antigènes, dont un majoritaire l'antigène 2 a fait l'objet de notre étude. La détection de cet antigène dans les fractions obtenues par filtration sur gel, ainsi que le dosage ont été effectués grâce à l'immun-sérum anti-antigène 2 par l'immunoélectrophorèse simple, technique des "rockets". La purification de l'antigène 2 a été possible par la chromatographie d'échange d'ions. L'antigène, s'est révélé très immunogène chez le lapin et l'homme, spécifique du genre *Listeria*.

Nous avons examiné 349 sérums humains par la technique E.L.I.S.A. (Enzyme linked Immunosorbent Assay) pour la détection des anticorps IgG et IgM anti-antigène 2. Les résultats obtenus sont en bonne corrélation avec les résultats bactériologiques. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour augmenter la spécificité et la fiabilité de cette réaction sérologique.

ANNEXE TECHNIQUE

I LES MILIEUX DE CULTURE

1.1 Milieux de culture SP₂

- Peptones.....	22 g
- Phosphate de potassium monobasique K_2HPO_4 , $7H_2O$	18 g
- Phosphate de potassium dibasique KH_2PO_4	2 g
- Extrait de levure (Bacto Yeast Extract Difco).....	4 g
- Glucose.....	15 g
- Eau distillée.....	qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,3 par KOH ou H_3PO_4 . Autoclavage 20 minutes à 118° C. Ce milieu est utilisé pour les cultures en masse en fermenteur.

1.2 Milieu de culture DTB

- Bacto tryptose (DIFCO).....	10 g
- Extrait de viande (DIFCO).....	3 g
- Glucose (Dextrose).....	4 g
- Chlorure de sodium (PROLABO).....	5 g
- Phosphate bipotassique (PROLABO).....	1 g
- Extrait de levure (Bacto Yeast Extract Difco).....	3 g
- Eau distillée.....	qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,2 Autoclavage 20 minutes à 118° C.

1.3 Milieu d'isolement ; gélose au sang

Pour la fabrication de ce milieu, nous utilisons la gélose Columbia qui est un milieu riche, bien adapté à la culture des germes exigeants. La gélose au sang est un excellent milieu pour l'isolement bactériologique de *Listeria monocytogenes*.

- Gélose Columbia

. Peptones (pastone + pastose).....	23 g
. Amidon soluble.....	1 g
. Chlorure de sodium.....	5 g
. Pastagar.....	15 g
. Eau distillée.....	qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,3.

- Gélose au sang

. Gélose Columbia [*]	44 g
. Sang de cheval.....	50 ml
. Eau distillée.....	qsp 1 000 ml

* La gélose Columbia nous est fourni par l'Institut Pasteur de Lille (BIO SERVICE).

- Mode opératoire

Après l'autoclavage à 118° C pendant 20 minutes, la gélose est refroidie à 50° C pour ajouter 50 ml de sang de cheval. Le mélange

se fait stérilement en agitant délicatement pour éviter d'inclure des bulles d'air dans la gélose. Le milieu est coulé en boîte de Pétri. La conservation se fait à + 4° C pendant 15 jours.

II LES TAMPONS

2.1 Tampon Tris 1

- Tris (hydroxy-méthyl aminométhane) $C_4H_{10}N_3$ (MERCK)..... 1,211 g
- Chlorure de magnésium $MgCl_2, 6H_2O$ (PROLABO)..... 2,033 g
- Azide de sodium NaN_3 (MERCK)..... 0,2 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,2 à l'aide de l'acide chlorydrique.

- . Tampon a = Tampon Tris 1 non modifié
- . Tampon b = Tampon Tris 1 sans $MgCl_2$
- . Tampon c = Tampon Tris 1 + 20 mM EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique)

2.2 Tampon Tris 2

- Tris (hydroxy-méthyl aminométhane) $C_4H_{10}NO_3$ (MERCK)..... 2,422 g
- Azide de sodium NaN_3 (MERCK)..... 0,2 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,2 à l'aide de l'acide chlorydrique.

2.3 Tampon Tris 3

- Tris (hydroxy-méthyl aminométhane) $C_4H_{10}NO_3$ (MERCK).... 12,11 g
- Azide de sodium NaN_3 (MERCK)..... 0,2 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 8 à l'aide de l'acide chlorydrique.

2.4 Tampon A

- Tris (hydroxy-méthyl aminométhane) $C_4H_{10}NO_3$ (MERCK).... 2,422 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 8 à l'aide de l'acide chlorydrique.

2.5 Tampon B

- Tampon A..... 1 000 ml
- Chlorure de Sodium (NaCl)..... 58,44 g

2.6 Tampon véronal

- Diéthylmalonylurée sodée (PROLABO)..... 4,123 g
- Diéthylmalonylurée (PROLABO)..... 0,8 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

La dissolution se fait au bain marie à une température de 56° C. Le pH est ajusté à 8,6 avec de l'acide chlorydrique ou de la soude.

2.7 Tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,6

On prépare une solution de carbonate 0,1 M :

- Carbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)..... 28,614 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On prépare une solution de bicarbonate 0,1 M :

- Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) (PROLABO)..... 8,4 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On mélange les 2 solutions jusqu'à obtention d'un pH de 9,6. On ajoute l'azide de sodium (NaN_3) (MERCK)..... 0,2 g

2.8 Tampon phosphate tween

- Chlorure de sodium NaCl (PROLABO)..... 8,0 g
- Chlorure de potassium KCl (PROLABO)..... 0,2 g
- Potassium dihydrogénophosphate $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (PROLABO)..... 0,2 g
- Di-sodium hydrogénophosphate $\text{PO}_4\text{12H}_2\text{ONa}_2$ (PROLABO)..... 0,29 g
- Tween 20 (PROLABO)..... 0,5 g
- Azide de sodium NaN_3 (MERCK)..... 0,2 g
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

On ajuste le pH à 7,2. Le tampon est conservé à +4° C.

2.9 Tampon diéthanolamine

- Diéthanolamine $C_4H_{11}NO_2$ (MERCK).....	9,7	g
- Eau distillée.....	80,0	ml
- Azide de sodium NaN_3 (MERCK).....	0,02	g
- Chlorure de magnésium $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (PROLABO).....	10,0	mg
- Eau distillée.....qsp	100	ml

On ajuste le pH à 9,8 avec l'acide chlorydrique normal (environ 10 ml), le tampon est conservé à l'obscurité à + 4° C.

a) Substrat de la phosphatase alcaline

- para-nitrophénylphosphate (SIGMA).....	1	mg
- Tampon diéthanolamine pH9,8.....	1	ml

La préparation de ce réactif se fait extemporanément.

b) Solution du réactif du biuret

Solution A : Carbonate de sodium sodée

Carbonate de sodium $CO_3Na_2 \cdot 10H_2O$ (PROLABO)

Soude NaOH 0,1 N

<u>Solution B</u> : Tartrate de sodium et de potassium.....	2	g
Eau distillée.....qsp	100	ml

<u>Solution C</u> : Sulfate de cuivre $CUSO_4 \cdot 5H_2O$ (PROLABO).....	2	g
Eau distillée.....qsp	100	ml

Réactif du biuret : dans l'ordre 100 ml de solution "A"

1 ml de solution "B"

1 ml de solution "C"

Le mélange est agité pour bien homogénéiser.

III PREPARATION DES GELS ET SOLUTIONS DE COLORATION

3.1 Gel d'agarose (Indubiose)

- Agarose (Indubiose A₃₇) (Industrie BIOLOGIQUE FRANCAISE)... 8 g
- Tampon véronal.....qsp 1 000 ml

3.2 Gel d'agar

- Agar noble (DIFCO)..... 10 g
- Tampon véronal.....qsp 1 000 ml
- Merseptyl (MERCK)..... 0,1 g

3.3 Les solutions de coloration et décoloration

a) Solution de décoloration

- Méthanol..... 450 ml
- Acide acétique..... 100 ml
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

b) Solution de coloration

- Amidoschwarz 10 B (MERCK)..... 5 g
- Solution de décoloration.....qsp 1 000 ml

Cette solution est préparée 24 heures avant l'emploi et filtrée sur papier Whatman.

c) Solution de coloration au bleu de Coomassie

- Bleu de Coomassie R 250 (SIGMA)..... 5 g
- Méthanol..... 450 ml
- Acide acétique..... 100 ml
- Eau distillée.....qsp 1 000 ml

Cette solution est préparée et filtrée comme précédemment.

3.4 Solution de citrate

- tri-Sodium citrate $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PROLABO)..... 5 g
- Eau distillée.....qsp 100 ml

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AALUND, O., J.W. OSEBOLD, F.A. MURPHY, and R.A. DI-CAPUA. 1966.
Antibody heterogeneity in experimental listeriosis.
J. Immunol. 97 : 150-157.

- 2 - ANTON, W. 1934 (cité par GRAY, M.L., and A. H. KILLINGER)

- 3 - ARMSTRONG, A.S., and C.P. SWORD. 1964.
Cellular resistance in listeriosis.
J. Inf. Dis. 114 : 258-264.

- 4 - ARMSTRONG, A.S., and C.P. SWORD. 1966.
Immunoglobulin response in listeriosis in "Proc of the 3th
symposium international on listeriosis" Utrecht.

- 5 - ARMSTRONG, A.S., and C.P. SWORD. 1967.
Antibody responses in experimental infections with *Listeria
monocytogenes*.
J. Immunol. 98 : 510-520.

- 6 - ARNAUD, R., A. AUDURIER, et PH. MAUPAS. 1971
Le diagnostic de la listériose au laboratoire.
Sem. Hôp. Paris. 47 : 2499-2502.

- 7 - ATKINSON, E. 1917.
Meningitis associated with gram - positive bacilli of
diphtheroid type.
Med. J. Australia. 1 : 115-118.

- 8 - AUDURIER, A., R. CHATELAIN, F. CHALONS, et M. PIECHAUD. 1979.
Lysotypie de 823 souches de *Listeria monocytogenes* isolées en
France de 1958 à 1978.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 130B : 179-189.
- 9 - AVRAMEAS, S. 1969.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde : use of
the conjugates for the detection of antigens and antibodies.
Immunochem. 6 : 43-52.
- 10 - AXELSEN, N.H. 1971.
Human precipitins against a microorganism (*Candida albicans*)
demonstrated by means of quantitative immunoelectrophoresis.
Clin. Exp. Immunol. 9 : 749-752.
- 11 - BAKER, L.A., and P.A. CAMPBELL. 1978.
Listeria monocytogenes cell walls induce decreased resistance
to infection.
Infect. Immun. 20 : 99-106.
- 12 - BARTLEMA, H.C., and R. BRAUNIUS. 1971.
Studies on vaccination against *Listeria* infections.
J. Microbiol. Serol. 37 : 261-262.

- 13 - BEERENS, H., et M.M. TAHON-CASTEL. 1966.
Milieu à l'acide nalidixique pour l'isolement des streptocoques,
D. Pneumoniae, *Listeria*, *Erysipelothrix*.
Ann. Inst. Pasteur. 111 : 90-92.
- 14 - BIND, J.L., Ph. MAUPAS, J.P. CHIRON, and B. RAYNAUX. 1975.
Passive immunohaemolysis applied to serological diagnosis of
listeriosis. in "Problems of *listeriosis*".
Ed. M. Woodbine leicester. University Press : 242-250.
- 15 - BOJSEN-MØLLER, J. 1967.
Variations in the hoemolysis of *Listeria monocytogenes*.
Acta. Path. Microbiol. Scand. 187 (suppl) 8-9.
- 16 - BOUCKAERT, A. 1969.
La listériose.
Biol. Med. 58 : 133-170.
- 17 - BREED, R.S.E., E.G.D. MURRAY, and N.T. SMITH. 1957.
in "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 7th.
Ed. the Williams, and Wilkins CO. Baltimore.
- 18 - BRET, A.J., and R. DURIEUX. 1960.
Les infections maternelles et néonatales à *Listeria monocytogenes*.
Press. Med. 68 : 2031-2032.

19 - BRET, A.J. 1963.

Infections néo-natales - ses modes de transmission de la mère
à l'enfant.

Arch. Franç. Pédiat. 20 : 321-339.

20 - BURDIN, J.C., et M. WEBER. 1972.

Aspects actuels de la listériose humaine.

Bull. Inst. Pasteur. 70 : 79-109.

21 - BURN, C.G. 1936.

Clinical and pathological features of an infection caused by
a new pathogen of the genus *Listerella*.

Am. J. Pathol. 12 : 341-348.

22 - CAMPBELL, P.A., G.E. RODRIGUEZ, and C. SCHUFFLER. 1975.

Listeria cell wall fraction : adjuvant activity in vivo and
in vitro.

Cellular. Immunol. 17 : 418-422.

23 - CAMPBELL, P.A., C. SCHUFFLER, and G.E. RODRIGUEZ. 1976.

Listeria cell wall fraction : a B cell adjuvant.

J. Immunol. 116 : 590-594.

- 24 - CANTON, P., G. PERCEBOIS, M. KESSLER, J.L. ANDRE, E. LE GALL,
and C. HURIET. 1976.
Complication méningo-encéphaliques à germes rares chez les
transplantés rénaux : cryptococcose et listériose, d'évolution
favorable.
Sem. Hôp. Paris. 52 : 1393-1395.
- 25 - CARLIER, Y., D. BOUT, and A. CAPRON. 1979.
Automation of enzyme linked immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.)
J. Immunol. Meth. 31 : 237-246.
- 26 - CARLIER, Y., D. BOUT, A. CAPRON, M. DELVALLEZ, G. MARTIN,
G. STECKER, and T. DURIEZ. 1980.
Physicochemical characteristics of *Listeria* specific antigen 2.
J. Gen. Microbiol. 116 : 549-552.
- 27 - CHERRY, W.B., and M.D. MOODY. 1965.
Fluorescent antibody techniques in diagnostic bacteriology.
Bacteriol. Rev. 29 : 222-250.
- 28 - COOPER, R.F., S.M. DENNIS, and J.O. HARPIS. 1973.
Fraction of *Listeria monocytogenes*.
Am. J. Vet. Res. 34 : 1093-1099.

29 - COULOMBIER, G. 1955.

Un cas de méningite à *Listeria monocytogenes* chez un nouveau-né.

Thèse. Méd. (Paris). 116.

30 - COULOMBIER, G., S. SARRUT, F. ALISON, et A. ROSSIER. 1956.

La listériose du nouveau-né.

Arch. Franç. Pediat. 13 : 943-960.

31 - DELVALLEZ, M., Y. CARLIER, D. BOUT, A. CAPRON, and G.R. MARTIN. 1979.

Purification of a surface specific soluble antigen from *Listeria monocytogenes*.

Infect. Immun. 25 : 971-977.

32 - DELVALLEZ-ROUSSEL, M., Y. CARLIER, R.J. COURCOL, and G.R. MARTIN. 1981.

Enzyme linked immunosorbent assay applied to serodiagnosis of human listeriosis in "Abstracts Book 8th symposium on the problems of listeriosis" Madrid.

33 - DESPIERRES, M. 1971.

Isolement de *Listeria monocytogenes* dans un milieu défavorable à *Streptococcus faecalis*.

Ann. Inst. Pasteur. 121 : 493-501.

34 - DESPIERRES, M. 1971.

Diagnostic sérologique des listérioses à l'aide d'une réaction d'agglutination sur gélose.

Ann. Inst. Pasteur. 121 : 503-526.

35 - DONKER-VOET, J. 1959.

A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes*, isolated in Michigan.

Am. J. Vet. Res. 20 : 176-179.

36 - DREW, R.M. 1946.

Occurrence of two immunological groups within the genus *Listeria*. Studies based upon precipitation reactions.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 61 : 30-33.

37 - DREAN, J.P., Cl. DUVAL, et H. BOIRON. 1974.

A propos de la recherche de *Listeria monocytogenes* dans les placentas humains.

Quest. Med. 27 : 1807-1808.

38 - DUBOIS, M. 1969.

Sensibilisation des hématies à un antigène protidique (prolactine ovine) par le chlorure de chrome : constantes relatives à la réaction de couplages étudiées par l'immunohémolyse passive.

Rech. Vet. 2 : 59-84.

- 39 - DUMONT, J., et L. COTONI. 1921.
Bacille semblable au bacille du rouget du porc rencontré dans
le liquide céphalo-rachidien d'un méningitique.
Ann. Inst. Pasteur. 35 : 626-635.
- 40 - DUMONT, M. 1965.
Listériose et grossesse.
Rev. Path. Comp. 65 : 583-588.
- 41 - DURST, J., and G. BERENCSI. 1976.
Contributions to further sero-variants of *Listeria monocytogenes*.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 236 : 531-532.
- 42 - DUSTOOR, M., C. WILLIAM, A. FULTON, and A. BLAZKOUEC. 1977.
Bacteriological and histopathological evaluation of guinea pigs
after infection with *Listeria monocytogenes*.
Infect. Immun. 15 : 916-924.
- 43 - DUVAL, Cl., S. SARRUT, J. HENRY-SUCHET, Cl. BINARD, H. BOIRON,
R. MERGER, B. AGUESSY, et J.P. PEZ. 1976.
La listériose de la femme enceinte. Fréquence et moyens de
diagnostic.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr. 5 : 271-288.

- 44 - EDMAN, D.C., M.B. POLLOCK, and E.R. HALL. 1968.
Listeria monocytogenes L forms.
I. Induction, maintenance and biological characteristics.
J. Bacteriol. 96 : 352-357.
- 45 - ELISCHEROVA, K., and J. CJZNAR. 1970.
Phosphatase activity of *Listeria* : preliminary report.
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 14 : 119-120.
- 46 - EMMELING, P., H. FINGER, and J. BOCKEMUHL. 1975.
Listeria monocytogenes infection in nude mice.
Infect. Immun. 12 : 437-439.
- 47 - EMODY, L., and B. RALOVICH. 1975.
Listeria infection in mice.
in "Problems of listeriosis".
Ed. M. Woodbine leicester University Press : 131-133.
- 48 - ENGVALL, E., P. PERLMANN. 1972.
Enzyme linked Immunosorbent Assay E.L.I.S.A.
J. Immunol. 109 : 129-135.
- 49 - ESPAZE, E.P., M. GASSIN, S. BILLAUDEL, et A.L. COURTIEU. 1976.
Rôle du laboratoire de bactériologie dans les listérioses
humaines.
Med. Mal. Infect. 6 : 34-42.

50 - EVELAND, W.C. 1963.

Demonstration of *Listeria monocytogenes* by direct examination of spinal fluid by fluorescent antibody technique.

J. Bacteriol. 85 : 1448-1450.

51 - FABIANI, G., F. CARTIER, B. LAUNOIS, M. CORMIER, et J.P. CAMPION. 1975.

Infection listérienne et transplantation rénale.

Sem. Hôp. Paris. 51 : 1719-1723.

52 - FABIANI, G. 1976.

La listériose humaine. Certitudes et inconnues.

Med. Mal. Infect. 6 : 323-328.

53 - FILICE, G.A., H.F. CANTREIL, A.B. SMITH, P.S. HAYES, F. FEELEY, and D.W. FRASER. 1978.

Listeria monocytogenes infection in neonates investigation of an epidemic.

J. Infect. Dis. 138 : 17-23.

54 - FÜZI, M., and I.PILLIS. 1961

Preparation of stable *Listeria monocytogenes* O antigen.

J. Bacteriol. 32 : 155-156.

- 55 - GALSWORTHY, S.B., S.M. GUROFSKY, and R.G.E. MURRAY. 1977.
Purification of a monocytosis-producing-activity from
Listeria monocytogenes.
Infect. Immun. 15 : 500-509.
- 56 - GIRARD, K.F., A.J. SBARRA, and W.A. BARDAWIL. 1963.
Serology of *Listeria monocytogenes*. I Characteristics of the
soluble hemolysin.
J. Bacteriol. 85 : 349-355.
- 57 - GIROUD, J.R., et F. DENIS. 1973.
Listériose et grossesse.
Nouv. Press. Med. 2 : 211-213.
- 58 - GORET, P., et J. OUDAR. 1965.
Les listérioses animales. Fréquence et incidence éventuelle
chez l'homme.
Rev. Path. Comp. 65 : 604-622.
- 59 - GRAHAM, R., H.R. HESTER, and L. NORMAND. 1940.
Studies on *Listerella* stain isolated from premature bovine foetus.
J. Infect. Dis. 66 : 91-96.
- 60 - GRAY, M.L., H.J. STAFSETH, F. THORP, L.R. SCHOL, and
W.F. RILEY. 1948.
A new technique for isolating *Listerella* from the bovine brain.
J. Bacteriol. 55 : 471-476.

- 61 - GRAY, M.L., H.J. STAFSETH, and F. THORP. 1950.
The use of potassium tellurite, sodium azide, and acetic acid
in a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol. 59 : 443-444.
- 62 - GRAY, M.L., H.J. STAFSETH, and F. THORP. 1951.
A four year study of listeriosis in Michigan.
J. Am. Vet. Med. Ass. 118 : 242-252.
- 63 - GRAY, M.L. 1957.
A rapid method for the detection of colonies of *Listeria
monocytogenes*.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 169 : 373-377.
- 64 - GRAY, M.L. 1960.
Genital listeriosis as a cause of repeated abortion.
Lancet. 2 : 315-317.
- 65 - GRAY, M.L., and H.A. KILLINGER. 1966.
Listeria monocytogenes and listeric Infection.
Bacteriol. Rev. 30 : 309-382.
- 66 - GRIFFIN, A.M., and M.L. ROBBINS. 1944.
The flagellation of *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol. 48 : 114-115.

- 67 - HASENCLEVER, J.F., and W.W. KARAKAWA. 1957.
Immunization of mice against *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol. 74 : 584-586.
- 68 - HENRY, B.S. 1933.
Dissociation in the genus *Brucella*.
J. Infect. Dis. 52 : 374-402.
- 69 - HERBERT, D., and E.W. TODD. 1941.
Purification and properties of a haemolysin produced by
Group A haemolytic streptococci (streptolysin O).
Biochem. J. 35 : 1124-1139.
- 70 - HOLLOSS, S. 1975.
Listérioses maternelles et néo-natales.
Thèse Doct. Méd. (Tours) 110.
- 71 - HÜLPHERS, G. 1911 (cité par GRAY, M.L., and A.H. KILLINGER)
- 72 - HUMBERT, G., Cl. DUVAL, Cl. FRESSARD, M. MEUNIER, et A.
LEDOUX. 1976.
Les listérioses en France. Résultats d'une enquête nationale
(824 cas).
Med. Mal. Infect. 6 : 60-70.

- 73 - JAEGER, R.F., and D.M. MYERS. 1954.
Listeria monocytogenes : a study of two strains isolated from human listeriosis.
Can. J. Microbiol. 1 : 12-21.
- 74 - JAIN, N.C., and N.K. CHANDIRAMANI. 1978.
Studies on *Listeria* antigens by agar gel double diffusion tests.
Ind. J. Amin. Sci. 48 : 167-172.
- 75 - JAKONIUK, P., A. BOROWSKI, A. SZPAK, and A. JARZYNA. 1973.
The effect of lipids from *Listeria monocytogenes* on immune response in mice.
Experientia. 29/7 : 872-874.
- 76 - JENKINS, E.M., A.N. NJOKU-OBI, and E.W. ADAMS. 1964.
Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol. 88 : 418-424.
- 77 - JULIANELLE, L.A., and C.A. PONS. 1939.
Identification of *Listerella monocytogenes*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 40 : 362-363.
- 78 - KAMPELMACHER, E.H., and L.M. VAN NOORLE JANSEN. 1969.
Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals.
Zen. Bakt. I. Abt. Orig. 211 : 353-359.

- 79 - KAUTTER, D.A., S.J. SILVERMAN, W.G. ROESSLER, and J.F. DRAWDY. 1963.
Virulence of *Listeria monocytogenes* for experimental animals.
J. Infect. Dis. 112 : 167-180.
- 80 - KEELER, R.F., and M.L. GRAY. 1960.
Antigenic and related biochemical properties of *Listeria monocytogenes*.
I preparation and composition of cell wall material.
J. Bacteriol. 80 : 683-692.
- 81 - KHAN, M.A., A. SEAMAN, and M. WOODBINE. 1977.
Immunofluorescent identification of *Listeria monocytogenes*.
Zen. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 239A : 62-69.
- 82 - KLASKY, S., and M.J. PICKETT. 1968.
Immunogenicity and specificity of *Listeria monocytogenes* cell walls.
J. Infect. Dis. 118 : 65-75.
- 83 - KORN, R.J., V.J. YAKULIS, C.E. LEMKE, and B. CHAMET. 1957.
Cold agglutinins in *Listeria monocytogenes*.
Arch. Internal. Med. 99 : 573-580.

- 84 - LARSEN, S.A., J.C. FEELEY, and W.L. JONES. 1974.
Immune response to *Listeria monocytogenes* in rabbits and humans.
Appl. Microbiol. 27 : 1005-1013.
- 85 - LARSEN, S.A., WIGGINS, G.L. and W.L. ALBRITTON. 1976.
Immune response to *Listeria*.
Manual of Clinical Immunology. Am. Soc. Microbiology. P 318-323.
- 86 - LAURELL, G.B. 1965.
Antigen-antibody crossed-immunoelectrophoresis.
Anal. Biochem. 10 : 358-361.
- 87 - LEMELAND, J.F., R. ALLAIRE, et H. BOIRON. 1974.
Contribution à l'étude de l'hémolysine de *Listeria monocytogenes*
(listériolysine).
Path. Biol. 22 : 763-770.
- 88 - LIU, P.V., and J.L. BATES. 1961.
An extracellular haemorrhagic toxin produced by *Listeria*
monocytogenes.
Can. J. Microbiol. 7 : 107-108.
- 89 - LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL. 1951.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

- 90 - MACKANESS, G.B. 1962.
Cellular resistance to infection.
J. Exp. Med. 116 : 381-406.
- 91 - MACKANESS, G.B. 1971.
Resistance to intracellular infection.
J. Infect. Dis. 123 : 439-445.
- 92 - M'ARA, M., J. JU'AK, K. KOTELKO, J. HOFMAN, and H. VESELSK'A. 1980.
Phenol extracted lipopeptidopoly-saccharide (LPPS) complex from
Listeria monocytogenes.
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 24 : 164-176.
- 93 - MARRA, S., and E. BALISH. 1974.
Immunity to *Candida albicans* induce by *Listeria monocytogenes*.
Infect. Immun. 10 : 72-82.
- 94 - MAUPAS, PH., J.P. CHIRON, and J.L. BIND. 1976.
Nouveaux aspects épidémiologiques et pathogéniques de la listériose.
Med. Mal. Infect. 6 : 172-179.
- 95 - Mc ILWAIN, P., D.F. EVELETH, and J.A. DOUBLY. 1964.
Pharmacologic studies of a toxic cellular component of *Listeria
monocytogenes*.
Am. J. Vet. Res. 25 : 774-781.

- 96 - METZGER, J.F., and C.W. SMITH. 1962.
Serologic typing of *Listeria monocytogenes* by gel diffusion
using thermostable antigens.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110 : 903-906.
- 97 - MEYER, S., H. BRUNNER. 1981.
Enzyme-immuno-assay in listeriosis : detection of antibody
and antigen.
Zen. Bakt. 248 : 469-478.
- 98 - MIKI, K., and G.B. MACKANESS. 1964.
The passive transfer of acquired resistance to *Listeria
monocytogenes*.
J. Exp. Med. 120 : 93-103.
- 99 - MONNET, P. 1965.
Listériose néo-natale. Considération sur ses modalités de
transmission.
Pediat. 20 : 709-718.
- 100 - MONNET, P. 1965.
Listérioses néo-natales.
Rev. Path. Comp. 65 : 555-581.
- 101 - MOREL, A., J.F. LEMELAND, and H. BOIRON. 1978.
Intérêt de la séro-agglutination dans le diagnostic de la
listériose.
Med. Mal. Infect. 8 : 339-342.

102 - MURRAY, E.G.D., R.A. WEBB, M.B.R. SWANN. 1926.

A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed *bacillus bacterium monocytogenes* (*n sp*).

J. Pathol. Bacteriol. 29 : 407-439.

103 - MURASCHI, T.F., and N.V. TOMPKINS. 1963.

Somatic precipitinogens in the identification and typing of *Listeria monocytogenes*.

J. Infect. Dis. 113 : 151-154.

104 - NETER, E., H. ANZAI, and E.A. GORYNSKI. 1960.

Identification of an antigen common to *Listeria monocytogenes* and other bacteria.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105 : 131-134.

105 - NJOKU-OBI, A.N., and J.W. OSEBOLD. 1962.

Studies on mechanisms of immunity in listeriosis.

I Interaction of peritoneal exudate cells from sheep with *Listeria monocytogenes* in vitro.

J. Immunol. 89 : 187-194.

106 - NJOKU-OBI, A.N., E.M. JENKINS, J.A. NJOKU-OBI, and V. COUVINGTON. 1963.

Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysins.

J. Bacteriol. 86 : 1-8.

- 107 - NYFELDT, A. 1929.
Etiologie de la mononucléose infectieuse.
Compt. Rend. Soc. Biol. 101 : 590-591.
- 108 - NORTH, R.J. 1970.
The relative importance of blood monocytes and fixed
macrophages to the expression of cell-mediated immunity
to infection.
J. Exp. Med. 132 : 521-534.
- 109 - OBINNA, A., and M.D. ISIADJNSO. 1975.
Listeria sepsis and meningitis.
JAMA. 234 : 842-843
- 110 - OFFENSTADT, G., E. CORMIER, V. DJUROVIC, J.C. COLAU,
et G. LE LORIER. 1977.
A propos d'un cas de septicémie à *Listeria* chez une femme enceinte.
Med. Mal. Infect. 7 : 187-190.
- 111 - OSEBOLD, J.W., and M.T. SAWYER. 1957.
Immunization studies on listeriosis mice.
J. Immunol. 78 : 262-268.
- 112 - OSEBOLD, J.W., O. AALUND, and C.E. CHRISP. 1965.
Chemical and immunological composition of surface structures
of *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol. 89 : 84-88.

- 113 - OSEBOLD, J.W., and O. AALUND. 1968
Interpretation of serum agglutinating antibodies to *Listeria monocytogenes* by immunoglobulin differentiation.
J. Infect. Dis. 118 : 139-148.
- 114 - OSTRENSKY, H., and A. MOSTRATOS. 1975.
Some serologic studies with : *Listeria monocytogenes*
"Problems of listeriosis". Ed. M. Woodbine. Leicester
University Press. 262-268.
- 114b- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. 1981.
Techniques rapides de laboratoire pour le diagnostic
des infections virales.
Rapports techniques. 661 : 5-66.
- 115 - OUCHTERLONY, O. 1958.
Diffusion in gel methods for immunological analysis.
Prog. Allergy. 5 : 1-78.
- 116 - PATERSON, J.S. 1940.
The Antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*.
J. Pathol. Bacteriol. 51 : 427-436.
- 117 - PATOCKA, F., M. MA'RA, and J. SCHINDLER. 1959.
Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*.
II Influence of substances isolated from cells of *Listeria*
monocytogenes on experimental listeriosis in white mice.
Zbl. Bakt. Orig. 174 : 586-592.

- 118 - PATOCKA, F., J. SCHINDLER, and M. MA'RA. 1959.
Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*.
I: Protein substance isolated from cells of *Listeria monocytogenes* enhancing listeric infection.
Zbl. Bact. Orig. 174 : 573-585.
- 119 - PEASE, P.E., L. NICHOLLS, and M.R. STUART. 1972.
Evidence that precipitin cross-reactions between *Listeria*,
Erysipelothrix and *Bacillus licheniformis* are not due to
the Rantz Antigen.
J. Gen. Microbiol. 73 : 567-569.
- 120 - PETIT, J. cl., et G.L. DAGUET. 1977.
Immunité cellulaire dans deux infections expérimentales :
listériose et ectomélie.
Path. Biol. 25 : 413-424.
- 121 - PIRIE, J.H.H. 1927.
A new disease of veld rodents.
"Tiger River Disease".
Publ. S. African. Inst. Med. Res. 3 : 163-186.
- 122 - PONS. C.A., and L.A. JULIANELLE. 1939.
Isolation of *Listerella monocytogenes* from infectious
mononucleosis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 40 : 360-362.

- 123 - PONTE, C., G. MARTIN, P. LEQUIEN, A.P. BLANC-GARIN,
C. DUQUENNOY et A. FRUCHART. 1976.
Septicémie et méningites du nouveau-né circonstances de
survenue et résultats bactériologiques de 214 observations.
Ann. Pediat. 23 : 723-731.
- 124 - POTEL, J., and L. DEGEN. 1960 (cité par GRAY, M.L., and
A.H. KILLINGER).
- 125 - POTEL, J. 1975.
Immunisation of guinea pigs and mice with *Listeria monocytogenes*
as useful models for investigations on immuno-suppression and
induction of immuno-suppression and induction of immune tolerance.
in "Problems of listeriosis".
Ed. M. Woodbine. Leicester University Press. 225-228.
- 126 - RALOVICH, B., A. FORRA, E. MERÖ, H. MALOVICS, and I. SZAZADOS.
1971.
New selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*.
Zbl. Bakt. Parasitk. Abt. I. Orig. 216 : 88-91.
- 127 - RALOVICH, B., and L. EMODY. 1975.
Some thoughts on listeric immunity.
in "Problems of listeriosis".
Ed. Woodbine. Leceister University Press. 229-233.

128 - RANTZ, L.A., E. RANDALL, and A. ZUCKERMAN. 1956.

Hemolysis and hemagglutination by normal and immune serums of erythrocytes treated with a nonspecies specific bacterial substance.

J. Infect. 98 : 211-222.

129 - RAPPAPORT, F., M. RABINOVITZ, R. TOAFF, and N. KROCHIK. 1960.

Genital listeriosis as a cause of repeated abortion.

Lancet. 1 : 1273-1275.

130 - RAYNAUX, M. 1973.

Les toxines microbiennes. Généralités.

Med. Mal. Infect. 3 : 141-150.

131 - REISS, H.J., J. POTEL, and A. KREBS. 1951.

(cité par GRAY, M.L., A.H. KILLINGER)

Granulomatosis infantiseptica.

Z. GRS. Inn. Med. 6 : 451-454.

132 - ROBBINS, M.L., and A.M. GRIFFIN. 1945.

Studies on *Listeria monocytogenes*. III Antibody response to individual components of the antigen mosaic during immunization.

J. Immunol. 50 : 247-254.

- 133 - ROBINSON, B.B., and A.N. NJOKU-OBI. 1964.
Preparation and characterization of a toxic polysaccharide
from *Listeria monocytogenes*.
Bacteriol. Proc. 64 : 82-92
- 134 - RODRIGUEZ, G.E., K.J. Mc CLATCHY, and P.A. CAMPBELL. 1974.
Induction of resistance by *Listeria monocytogenes* cell
wall fraction.
Infect. Immun. 10 : 1163-1169.
- 135 - ROUSSEL-DELVALLEZ, M., et G.R. MARTIN. 1982.
Recherche des antigènes bactériens solubles dans les
liquides biologiques.
NPN Med. 32 : 1005-1011.
- 136 - SALTON, M.R.J. 1964.
The bacterial cell wall.
New-York. elsevier Publishing Co. p 133.
- 137 - SASCHSE, H., and J. POTEL. 1957 (cité par GRAY, M.L. and
H.A. KILLINGER).
- 138 - SCHULTZ, E.W., M.C. TERRY, A.T. BRICE, and L.P. GEBHARDT. 1938.
Listeria monocytogenes : a cause of meningo-encephalitis in man.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38 : 605-608.

- 139 - SCHULTZ, E.W. 1945 (cité par GRAY, M.L., and A.H. KILLINGER)
- 140 - SEASTONE, C.V. 1935.
Pathogenic organisms of the genus *Listerella*.
J. Exp. Med. 62 : 203-212.
- 141 - SEELIGER, H.R.R., and F. SULZBACHER. 1956.
Antigenic relationships between *Listeria monocytogenes* and
Staphylococcus aureus.
Can. J. Microbiol. 2 : 220-231.
- 142 - SEELIGER, H.P.R. 1961.
Listeriosis.
Hafner Publishing Co. Inc. New-York.
- 143 - SEELIGER, H.P.R., H.J. WELSHIMER. 1974.
in "Bergey's manual of determinative bacteriology".
8th Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 144 - SEELIGER, H.P.R. 1975.
Serovariants of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria*
species.
Acta. Microbiol. Acad. Sci. hung. 22 : 179-181.

- 145 - SEELIGER, H.P.R. 1976.
Notion actuelle sur l'épidémiologie de la listériose.
Med. Mal. Infect. 6 : 6-14.
- 146 - SEELIGER, H.P.R., and G. PONGRATZ. 1981.
Haemolysin of *Listeria monocytogenes* serovar 5. in "Abstracts
book 8th symposium on the problems of listeriosis" Madrid.
- 147 - SIDDIQUE, H., L.C. YING, and R.A. CHUNG. 1970.
Studies on diphosphopyridine nucleotidase and platelets
damaging factor in an extracellular product of *Listeria
monocytogenes*.
Can. J. Microbiol. 16 : 909-916.
- 148 - SILVERMAN, S.I., L. ELWELL, and D.A. KAUTTER. 1961.
A mortality enhancing extract isolated from *Listeria
monocytogenes*.
J. Immunol. 86 : 669-674.
- 149 - SKAMENE. E., and CHAYASIRISOBHON. 1977.
Enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* in splenectomized
mice.
Immunol. 33 : 851-858.

- 150 - SMITH, C.W., J.D. MARSHALL, Jr. and W.C. EVELAND. 1960.
Identification of *Listeria monocytogenes* by the fluorescent antibody technic.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103 : 842 -845.
- 151 - SMITH, C.W., and J.F. METZER. 1962.
Demonstration of a capsular structure on *Listeria monocytogenes*.
Path. Microbiol. 25 : 499-506.
- 152 - SMITH, E.M., M.L. GRAY, and F. THORP. 1957.
Reaction of splenic tissue in culture to *Listeria monocytogenes*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94 : 162-166.
- 153 - SRIVASTAVA, K.K., and I.H. SIDDIQUE. 1973.
Quantitative chemical composition of peptidoglycan of
Listeria monocytogenes.
Infect. Immun. 7 : 700-703.
- 154 - STANLEY, N.F. 1949.
Studies on *Listeria monocytogenes*.
I Isolation of a monocytosis producing agent (MPA).
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 27 : 123-131.

- 155 - SUC, C., N. MOATTI, R. LEVRAT, J. ICART, et J. NOGARO. 1973.
Les aspects bactériologiques de la listériose. A propos de
22 cas rencontrés chez l'homme en 1970 et 1971.
Med. Mal. Infect. 3 : 97-110.
- 156 - SWORD, C.P., and M.J. PICKETT. 1961.
The isolation and characterization of bacteriophages from
Listeria monocytogenes.
J. Gen. Microbiol. 25 : 241-248.
- 157 - SZATALOWICZ, F.T., D.C.B. LENDEN, and M.S. KHAN. 1970.
Occurrence of *Listeria* antibodies in select occupational groups.
Can. J. Publ. Heath. 61 : 402-406.
- 158 - TINELLI, R. 1965.
Etude des constituants de la paroi de *Listeria monocytogenes*.
CR. Acad. Sci. 261 : 4265-4267.
- 159 - TOURAINE, J.L., C. TOUSSAINT, N. BLANC, et J. TRAEGER. 1972.
Listériose après transplantation rénale.
Nouv. Press. Med. 1 : 2813-2817.
- 160 - UHR, J.W., and M.S. FINKELSTEIN. 1963.
Antibody formation.
IV Formation of rapidly and slowly sedimenting antibodies and
immunological memory to bacteriophage X 176.
J. Exp. Med. 117 : 457-477.

- 161 - VAITUKAITIS, J., J.B. ROBBINS, E. NIESCLAG, and
T.G. ROSS. 1971.
A method for producing specific antisera with small doses
of immunogen.
J. Clin. Endocr. Metabol. 33 : 988-991.
- 162 - VIGNES, P. 1965.
Les listérioses en gynécologie.
Rev. Path. Comp. 65 : 633-636.
- 163 - WATSON, B.B., W.C. EVELAND. 1965.
The application of phage fluorescent antiphage staining system
in specific identification of *Listeria monocytogenes*.
I Species specificity and immunofluorescent sensitivity of
Listeria monocytogenes phage observed in smear preparation.
J. Infect. Dis. 115 : 363-369.
- 164 - WATSON, B.B., and W.C. EVELAND (cité par GRAY, M.L., and
H.A. KILLINGER).
- 165 - WATSON, B.B., and J.C. LAVIZZO. 1973.
Extracellular antigens from *Listeria monocytogenes*.
II Cytotoxicity of hemolytic and lipolytic antigens of
Listeria for cultured mouse macrophages.
Infect. Immun. 7 : 753-758.

- 166 - WEEKE, B. 1973.
Crossed immunoelectrophoresis.
Scand. J. Immunol. 2 (suppl 1) : 47-56.
- 167 - WELSHIMER, H.J., and N.G. WINGLEWISH. 1959.
Listeriosis summary of seven cases of *Listeria meningitis*.
J. Am. Med. Assoc. 171 : 1319-1323.
- 168 - WELSHIMER, H.J. 1960.
Staphylococcal antibody production in response to injections
with *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol. 79 : 456-457.
- 169 - WELSHIMER, H.J., A.L. MEREDITH. 1971.
Listeria murrayi sp.n : a nitrate-reducing mannitol-fermenting
Listeria.
Int. J. Syst. Bacteriol. 21 : 3-7.
- 170 - ZINKERNAGEL, R.M., R.V. BLENDEN, and R.E. LANGMAN. 1974.
Early appearance of sensitized lymphocytes in mice infected
with *Listeria monocytogenes*.
J. Immunol. 112 : 496-501.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	2
HISTORIQUE.....	4
<u>CHAPITRE I : BACTERIOLOGIE</u>	7
I POSITION TAXONOMIQUE.....	8
II CARACTERES CULTURAUX.....	9
III CULTURES.....	11
3.1 Milieux.....	11
3.2 Caractères cultureux.....	12
3.3 Exigences respiratoires.....	15
3.4 Mobilité.....	15
3.5 Résistance.....	16
3.6 Caractères biochimiques.....	16
3.7 Formes L.....	17
3.8 Sensibilité aux bactériophages.....	18

<u>CHAPITRE II : LES ANTIGENES DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....</u>	20
I STRUCTURE ANTIGENIQUE.....	21
II L'ANTIGENE DE RANTZ.....	25
III LES SUBSTANCES A CARACTERE ANTIGENIQUE SECRETEES PAR LA BACTERIE.....	26
3.1 Substances toxiques extracellulaires.....	27
a - Production d'hémolysine.....	27
b - Une autre toxine extracellulaire.....	29
3.2 Substances toxiques de la cellule bacterienne.....	30
IV LES ANTIGENES DE PAROI ET LEURS PROPRIETES BIOLOGIQUES.....	33
<u>CHAPITRE III : POUVOIR PATHOGENE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....</u>	36
I POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL.....	37
II POUVOIR PATHOGENE CHEZ L'HOMME.....	38
<u>LA LISTERIOSE DE LA FEMME ENCEINTE.....</u>	41
I MANIFESTATIONS CLINIQUES CHEZ LA FEMME ENCEINTE.....	42
II LES CONSEQUENCES DE LA LISTERIOSE MATERNELLE.....	43
III MODE DE CONTAMINATION DE LA FEMME ENCEINTE.....	44

IV	CONSEQUENCE SUR L'AVENIR OBSTETRICAL DE LA FEMME ;	
	AVORTEMENT A REPETITION.....	44
	<u>LA LISTERIOSE NEO-NATALE.....</u>	47
I	MODE DE CONTAMINATION DES NOUVEAU-NES.....	48
 <u>CHAPITRE IV : IMMUNITE CELLULAIRE.....</u>		50
I	IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE.....	51
II	IMMUNITE NON SPECIFIQUE.....	52
 <u>CHAPITRE V : DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA LISTERIOSE.....</u>		56
I	REACTION D'AGGLUTINATION.....	57
	1.1 Propriétés des antigènes flagellaires et	
	somatiques.....	58
	1.2 Préparation des antigènes flagellaires H et	
	somatiques O pour la production des sérums	
	et des tests d'agglutination.....	59
	1.3 Séro-agglutination.....	60
	a - Résultats.....	60
	b - Conclusions.....	62
	c - "Les agglutinines froides".....	63

II	REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT.....	64
	2.1 Résultats.....	65
	2.2 Conclusion.....	66
III	REACTION DE PRECIPITATION.....	67
IV	REACTION D'HEMAGGLUTINATION.....	68
V	REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE.....	68
VI	TEST DE CROISSANCE.....	69
VII	CONCLUSION.....	70

MATERIEL ET METHODES	74
----------------------------	----

CHAPITRE I : CULTURE BACTERIENNE ET PREPARATION DES ANTIGENES..... 75

I SOUCHES BACTERIENNES ET CONSERVATION.....	76
1.1 Les souches bactériennes.....	76
1.2 Conservation des souches.....	76
II LES CULTURES BACTERIENNES.....	78
2.1 Culture en erlenmeyer.....	78
2.2 Culture en masse.....	79
III PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES.....	80
3.1 Broyage à la X-press.....	80
a - Principe de la méthode.....	80
b - Mode opératoire.....	80
3.2 Homogénéisation du broyat.....	81
3.3 Préparation de l'extrait antigénique par centrifugation.....	81
IV OBTENTION DES SERUMS.....	83
4.1 Procédés d'immunisation des lapins.....	83
4.2 Sérums humains.....	85
V DOSAGE DE PROTEINES.....	85
5.1 Gamme de sérum albumine bovine.....	86
5.2 Mode opératoire.....	86

<u>CHAPITRE II : METHODES IMMUNOLOGIQUES.....</u>	88
<u>METHODES DE DETECTION DES ANTIGENES.....</u>	89
I IMMUNODIFFUSION EN GELOSE PAR LA METHODE D'OUCHTERLONY.....	89
1.1 Mode opératoire.....	89
a - Préparation des lames.....	89
b - Immunodiffusion.....	90
II IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENTIONNELLE D'APRES LAURELL....	91
2.1 Mode opératoire.....	91
a - Préparation des lames.....	91
b - Première dimension.....	92
c - Deuxième dimension.....	92
III IMMUNOELECTROPHORESE SIMPLE "TECHNIQUE DES ROCKETS" D'APRES AXELSEN.....	93
<u>METHODES DE TITRAGE DES ANTICORPS.....</u>	94
I SERO-AGGLUTINATION.....	94

II	IMMUNOENZYMATIQUE.....	95
2.1	Mode opératoire.....	95
a	- Tapissage des cupules.....	95
b	- Incubation avec les sérums.....	96
c	- Incubation avec les conjugués.....	96
d	- Mesure de l'intensité de la réaction enzyme-substrat.....	96
III	DETECTION DU FACTEUR RHUMATOIDE.....	98
3.1	Mode opératoire.....	98
<u>CHAPITRE III : METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.....</u>		100
I	CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE FILTRATION.....	101
II	CHROMATOGRAPHIE ECHANGE D'IONS.....	103
III	DESSALAGE ET CONCENTRATION SUR COLONNE PD 10.....	104

RESULTATS	105
------------------------	-----

CHAPITRE I : ETUDE ANTIGENIQUE DE LISTERIA MONOCYTOGENES

SEROVAR 4b.....	106
I ANALYSE ANTIGENIQUE.....	107
1.1 Les extraits antigéniques.....	107
a - Résultats.....	107
b - Conclusion.....	109
1.2 Détection des antigènes.....	110
a - Résultats.....	110
- Immun-sérums de lapins.....	110
- Analyse des antigènes.....	112
b - Conclusion.....	118
II FRACTIONNEMENT SUR GEL DE FILTRATION.....	119
2.1 Tampons d'extraction.....	119
a - Résultats.....	119
b - Conclusion.....	120
2.2 Sur Sépharose 4B.....	120
a - Résultats.....	121
b - Concentration des fractions par ultrafiltration.....	121

2.3 Détermination de la composition antigénique.....	123
a - Résultats.....	123
b - Conclusion.....	124
2.4 Sur Séphacryl S 400	127
a - Résultats.....	127
b - Conclusion.....	129
III L'ANTIGENE 2.....	130
3.1. Caractères immunologiques.....	131
a - Immun-sérums monospécifiques.....	131
- Résultats.....	131
- Conclusion.....	132
b - Détection de l'antigène 2.....	133
- Résultats.....	133
- Conclusion.....	133
IV PURIFICATION DE L'ANTIGENE 2.....	135
4.1 Chromatographie filtration sur gel.....	135
a - Résultats.....	135
b - Conclusion.....	135
4.2 Chromatographie d'échange d'ions.....	136
a - Résultats.....	139
b - Conclusion.....	139

CHAPITRE II : APPLICATION DE L'ETUDE ANTIGENIQUE AU SERO-DIAGNOSTIC

<u>DE LA LISTERIOSE.....</u>	140
I TITRAGE DES ANTICORPS DANS LES SERUMS.....	141
1.1 Réaction immunoenzymatique.....	141

a - Choix de l'antigène.....	141
b - Choix de la concentration de l'antigène.....	142
1.2 Résultats du titrage des anticorps des sérums....	151
a - Calcul de la moyenne géométrique.....	151
b - Résultats.....	152
c - Conclusion.....	163
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	164
RESUME.....	174
ANNEXE TECHNIQUE.....	176
BIBLIOGRAPHIE.....	185

