

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° attribué par la bibliothèque



THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Présentée et soutenue publiquement

le 9 novembre 2002 par

Catherine RAGIMBEAU

Caractérisation des populations de *Listeria monocytogenes* dans la filière poisson fumé :

Etude de la variabilité génétique et

influence de la matrice sur l'expression de la virulence

Rapporteurs :

Pr. Gwennola ERMEL
Dr. Philippe VELGE

Examineurs :

Dr. Jocelyne ROCOURT
Dr. Pierre MALLE

Directeur de thèse :

Pr. Jean-Pierre BOHIN



Ce travail a été réalisé au laboratoire d'études et de recherches sur les produits de la pêche de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - site de Boulogne sur mer et a bénéficié d'un cofinancement Afssa - Région du Nord Pas de Calais et d'une subvention de l'Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture (OFIMER) pour une partie des travaux.

Je tiens à remercier sincèrement,

Gwennola ERMEL, Professeur à l'Université de Rennes 1, d'avoir accepté spontanément d'examiner ce travail et d'en être rapporteur,

Philippe VELGE, Chargé de Recherches à l'INRA de Tours, de m'avoir accueillie au sein de son équipe pour mon initiation à la culture cellulaire, pour ses conseils, ses encouragements et pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier, Jocelyne ROCOURT, Medical Officer à l'OMS et Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Paris de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

J'exprime mes vifs remerciements à

Pierre MALLE, Directeur du laboratoire Afssa - site de Boulogne sur mer de m'avoir donné l'opportunité de préparer ce Doctorat, de la confiance dont il m'a témoigné et pour tous les moyens qu'il a mis à ma disposition.

Jean-Pierre BOHIN, Professeur de Génétique Moléculaire à l'Université de Lille 1 et Directeur de cette thèse, pour son encadrement scientifique et pour toutes les discussions constructives qui ont permis incontestablement de faire évoluer ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Guylaine LELEU qui a travaillé à mes côtés au laboratoire de Boulogne sur mer tout au long de ces trois années, pour tout l'investissement personnel qu'elle a mis au service de ce projet, pour la qualité de son travail et pour son soutien quotidien. Qu'elle soit assurée de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

Je remercie très vivement Sylvie ROCHE de l'INRA de Tours, de m'avoir enseigné avec dynamisme et rigueur le test de plages de lyse en culture cellulaire. Qu'elle soit assurée de toute ma gratitude pour sa disponibilité, son soutien et la qualité du transfert de son savoir et de son savoir-faire.

J'adresse tous mes remerciements à Annaëlle KEROUANTON-LE GALL de l'Afssa – site de Maisons Alfort pour avoir mis à ma disposition les informations associées à sa base de données de profils génétiques pour le travail des comparaisons inter-filières. Je la remercie pour ses conseils et son soutien durant ces trois années.

Je tiens à remercier Catherine DERVIN de l'INRA-INAPG, Thiverval-Grignon d'avoir mis au service de ce projet ses compétences en analyse statistique avec tant de « positivisme » qui a assurément contribué à un grand soutien moral.

Un grand merci à Marielle GAY, Anita METIVIER, Anne BOUTTEFROY et Corinne JABY de l'ASEPT pour avoir accepté si spontanément de participer au projet OFIMER. Je les remercie pour cette collaboration qui s'est avérée fructueuse.

Merci à Gwenaëlle DAUPHIN, désormais à l'Afssa de Maisons Alfort pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail qui a fait suite à son DEA et pour son soutien.

Que le personnel de l'Afssa de Boulogne sur mer et tous les stagiaires qui ont apporté directement ou indirectement leur contribution trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Enfin, je voudrais remercier mes proches,

Merci à Frédéric d'être mon rayon de soleil, et pour son aide précieuse en informatique. Je remercie mes parents pour leur soutien et leur patience...

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I - LISTERIA MONOCYTOGENES.	1
1- Description – caractères généraux.	1
2- Taxonomie.	3
2-1 <i>Taxonomie supragénérique</i>	3
2-2 <i>Taxonomie infragénérique</i>	7
3- Données génomiques.	8
4- Structure antigénique.	13
5- Virulence.	15
5-1 <i>Entrée de la bactérie dans les tissus et les cellules des mammifères</i>	15
5-2 <i>Le cycle infectieux</i>	15
5-3 <i>Support génétique de la virulence</i>	16
5-3-1 <i>Entrée de la bactérie dans la cellule</i>	16
5-3-2 <i>Sortie du phagosome</i>	18
5-3-3 <i>Mouvement intracellulaire</i>	18
5-3-4 <i>Lyse de la vacuole à double membrane</i>	19
5-4 <i>Régulation</i>	21
5-4-1 <i>Déterminisme génétique</i>	21
5-4-2 <i>Conditions environnementales</i>	23
II ÉPIDÉMIOLOGIE.	29
1- La listériose : principaux aspects chez l'homme.	29
1-1 <i>Transmission par voie alimentaire</i>	29
1-2 <i>Formes invasives et non invasives</i>	29
1-3 <i>Sérotypes impliqués</i>	31
1-4 <i>Système de surveillance Français</i>	34
1-5 <i>La position de l'Afssa</i>	36
2 - Risque sanitaire dans le poisson fumé et réglementation.	37
2-1 <i>Production en France</i>	37
2-2 <i>Prévalence en Listeria monocytogenes et voies de contamination</i>	38

2-3 <i>Risque sanitaire et position des aliments dans la classification de l'Afssa...</i>	40
2-4 <i>Classification dans la Réglementation Française.....</i>	42
III LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE CARACTERISATION DES ISOLATS.	45
1- Caractérisation phénotypique.....	45
1-1 <i>Le sérotypage.....</i>	45
1-2 <i>Le lysotypage.....</i>	47
1-2-1 Principe.....	47
1-2-2 Points critiques et données épidémiologiques associées	48
2- Caractérisation génotypique.....	49
2-1 <i>Electrophorèse d'iso-enzymes.....</i>	49
2-1-1 Principe.....	49
2-1-2 Points critiques.....	51
2-1-3 Données épidémiologiques associées.....	52
2-2 <i>Systèmes de typage moléculaire basés sur une empreinte génétique.....</i>	52
2-2-1 Introduction.....	52
2-2-2 La macrorestriction.....	53
2-2-3 Autres méthodes développées.....	56
3- Caractérisation de la virulence.....	59
IV AXES DE RECHERCHES.....	63
MATÉRIELS ET MÉTHODES	
V MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	64
1- Souches bactériennes.....	64
1-1 <i>Souches de Listeria monocytogenes.....</i>	64
1-2 <i>Autres souches.....</i>	65
1-3 <i>Mode de conservation.....</i>	65
2- Lignée cellulaire.....	65
3- Type de souris	66
4- Base de données profils génétiques <i>L. monocytogenes</i> "inter-filières".....	66
5- Matrices alimentaires.....	66

5-1	<i>Matrices saumon</i>	66
5-1-1	Fabrication.....	66
5-1-2	Caractéristiques physico-chimiques.....	66
5-2	<i>Autres matrices</i>	67
5-2-1	Rillettes de porc.....	67
5-2-2	Lait.....	67
6-	Extraits de fumée	67
6-1	<i>Fabrication d'un extrait de fumée</i>	67
6-2	<i>Caractéristiques de la fumée liquide commerciale</i>	67
7-	Récolte d'isolats dans le poisson fumé	68
7-1	<i>Origine des prélèvements</i>	68
7-2	<i>Plans d'échantillonnage des suivis de fabrication</i>	70
7-3	<i>Modes de prélèvements</i>	70
7-3-1	Prélèvements réalisés par l'application d'une chiffonnette.....	70
7-3-2	Prélèvements de produits en cours de fabrication et produits finis.....	72
7-3-3	Prélèvements de saumure.....	72
8-	Méthodes microbiologiques de recherche des <i>L. monocytogenes</i>	72
8-1	<i>Analyses des surfaces, des produits en cours de fabrication et produits finis...</i>	72
8-2	<i>Analyse de la saumure</i>	73
9-	Méthodes de biologie moléculaire	73
9-1	<i>Identification de l'espèce <i>L. monocytogenes</i> par PCR multiplex</i>	73
9-1-1	Purification des isolats.....	73
9-1-2	Réalisation d'une culture pure.....	74
9-1-3	Préparation de la suspension d'ADN pour la réalisation de la PCR.....	74
9-1-4	Réalisation de la PCR multiplex.....	74
9-1-5	Conditions d'électrophorèse et interprétation des résultats.....	74
9-2	<i>Méthode de criblage rapide des isolats par RAPD</i>	76
9-2-1	Amorces HLWL74 et UBC 127.....	76
9-2-2	Amorce M13.....	76
9-2-3	Conditions d'électrophorèse.....	77
9-3	<i>Méthode de typage par macrorestriction</i>	77
9-3-1	Préparation des inserts.....	77
9-3-2	Macrorestriction.....	78

9-3-3 Conditions de migration.....	78
9-4 Digestion du génome par Sau3AI/MboI.....	79
10- Test de génotoxicité.....	79
10-1 Mise en culture de la souche test <i>E. coli</i> PQ37.....	79
10-2 Préparation du milieu de base M63.....	79
10-3 Préparation des boîtes STA.....	80
10-4 Mise en œuvre du test.....	80
11- Caractérisation du phénotype.....	81
11-1 Sérotypage.....	81
11-1-1 Antigènes somatiques.....	81
11-1-1 a Agglutination sur lame avec des sérums de type O polyvalents.....	81
11-1-1 b Agglutination sur lame avec les sérums de type O monovalents.....	82
11-1-2 Détermination de l'antigène flagellaire.....	82
11-2 Mise en œuvre des tests de croissance.....	83
11-2-1 Souches sélectionnées.....	83
11-2-2 Préparation des inoculum.....	83
11-2-3 Contamination des matrices pour le test.....	84
11-2-4 Réalisation des dénombrements après stockage des matrices à +8°C.....	84
12- Caractérisation de la virulence.....	84
12-1 Méthodes de culture cellulaire.....	84
12-1-1 Entretien de la lignée, conditions de culture.....	84
12-1-2 Test plages de lyse en microplaque P96.....	85
12-1-2 a Préparation des microplaques.....	85
12-1-2 b Préparation des inoculum de <i>L. monocytogenes</i>	85
12-1-2 c Etape d'infection des cellules.....	86
12-1-2 d Lecture des résultats.....	87
12-2 Protocoles de recherche d'un effet de la matrice saumon.....	87
12-2-1 Souches sélectionnées.....	87
12-2-2 Contamination des matrices pour une incubation de 8-14 jours.....	87
12-2-3 Contamination pour une incubation d'1 heure.....	87
12-2-3-a Incubation des bactéries en broyats de saumon.....	87
12-2-3-b Incubation des bactéries en filtrats de saumon.....	88
12-2-3-c Incubation des tapis cellulaires en matrice saumon.....	88

12-3 Protocole de recherche d'un effet de la matrice rillettes de porc.....	88
12-4 Protocole de recherche d'un effet de la matrice lait.....	89
12-5 Tests de virulence sur souris.....	89
13- Analyse statistique.....	90
14-Analyse des profils électrophorétiques.....	90
14-1 Profils générés au laboratoire.....	90
14-2 Profils publiés.....	90

RÉSULTATS

VI SPECIFICITE DE LA CONTAMINATION DES POISSONS FUMES PAR <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	92
1- Choix entre 3 méthodes RAPD pour le criblage des souches.....	94
1-1 Caractérisation par macrorestriction.....	94
1-2 Caractérisation avec l'amorce HLWL74.....	96
1-3 Caractérisation avec l'amorce UBC127.....	96
1-4 Caractérisation avec l'amorce M13.....	96
1-5 Comparaison des résultats RAPD avec les résultats de macrorestriction <i>ApaI</i>	96
1-6 Synthèse des résultats.....	98
2- Prévalence en <i>L. monocytogenes</i> dans les poissons fumés et étude des voies de contamination	100
2-1 Suivis de fabrication auprès de 2 ateliers de fumaison.....	100
2-1-1 Contamination des deux sites de production étudiés.....	100
2-1-2 Diversité génétique des isolats récoltés.....	102
2-1-3 Distribution des génotypes en fonction de la méthodologie.....	104
2-1-4 Performance des milieux d'isolement.....	106
2-1-5 Origine des matières premières de hareng du site E1.....	106
2-2 Poissons fumés prélevés dans la grande distribution.....	110
2-2-1 Prévalence.....	110
2-2-2 Niveaux de contamination.....	110
2-2-3 Diversité génétique des isolats récoltés.....	110
2-2-4 Synthèse des résultats.....	112
3- Caractérisation de souches isolées des produits de la pêche.....	114

3-1	<i>Caractérisation par macrorestriction avec 3 enzymes</i>	114
3-3-1	Empreintes générées.....	114
3-3-2	Pouvoir discriminant.....	114
3-3-3	Groupes génétiques et variants identifiés.....	120
3-3-4	Stratégie appliquée pour la suite de l'étude.....	120
3-2	<i>Caractérisation du panel de souches "produits de la pêche"</i>	122
3-2-1	Caractérisation par macrorestriction.....	122
3-2-1-a	Répartition des pulsotypes dans le panel.....	122
3-2-1-b	Répartition par sites industriels.....	124
3-2-1-c	Répartition des groupes génétiques par espèces de poisson....	128
3-2-2	Caractérisation par sérotypage.....	130
3-2-2-a	Sérotypes identifiés.....	130
3-2-2-b	Relation groupes génétiques et sérotypes.....	130
3-2-3	Caractérisation d'un niveau de virulence.....	132
3-2-3-a	Résultats des tests <i>in vitro</i>	132
3-2-3-b	Résultats des tests de confirmation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	134
3-2-4	Synthèse des résultats.....	136
4-	Comparaison des profils génétiques du panel "produits de la pêche" avec ceux issus de souches cliniques et "autres filière".....	138
4-1	<i>Comparaisons avec le panel "autres filières"</i>	138
4-1-2	Typage d'une collection de souches "autres filières".....	138
4-1-3	Comparaison par analyse de profils.....	140
4-2	<i>Comparaisons avec des profils de souches cliniques</i>	142
4-2-1	Profils de souches épidémiques.....	142
4-2-2	Profils de souches isolées de cas sporadiques.....	142
4-2-3	Profils de souches à l'origine de listériose animale.....	144
4-2-4	Comparaison des profils avec 3 enzymes.....	144
4-2-5	Caractérisation des groupes génétiques 4b/e par <i>MboI/Sau3AI</i>	146
4-2-6	Analyse de l'ensemble des pulsotypes.....	146
4-3	<i>Synthèse des résultats</i>	148
VII	INFLUENCE DE LA MATRICE SAUMON FUME SUR LE PHENOTYPE	150
1-	Induction du système SOS par les composés de la fumée.....	152

1-1 <i>Comparaison entre la fumée traditionnelle et la fumée liquide commercialisée..</i>	152
1-2 <i>Synthèse des résultats.....</i>	152
2-Influence de la matrice fumée sur la croissance.....	154
2-1 <i>Résultats des dénombrements et reproductibilité.....</i>	154
2-2 <i>Comparaison des valeurs relevées pour les trois souches.....</i>	156
2-3 <i>Analyse des courbes de croissance.....</i>	156
2-4 <i>Synthèse des résultats.....</i>	158
3-Influence de la matrice saumon fumé sur l'expression de la virulence.....	160
3-1 <i>Dilution de la matrice saumon fumé et niveaux de virulence détectés in vitro..</i>	160
3-2 <i>Appréciation de l'effet de la matrice poisson fumé sur les bactéries et sur les cellules HT-29.....</i>	162
3-2-1 <i>Effet de la matrice saumon sur le tapis cellulaire.....</i>	162
3-2-2 <i>Effet de la matrice sur les bactéries</i>	164
3-2-3 <i>Effet de la matrice sur les bactéries après 20 jours ou 1 h d'incubation...</i>	164
3-3 <i>Influence d'une incubation prolongée des bactéries en matrices alimentaires..</i>	166
3-4 <i>Influence d'un filtrat de saumon sur le niveau de virulence détecté in vitro....</i>	170
3-4-1 <i>Répétabilité.....</i>	170
3-4-2 <i>Effet du filtrat de saumon sur le tapis cellulaire.....</i>	170
3-4-3 <i>Effet du filtrat de saumon sur les bactéries.....</i>	170
3-4-4 <i>Comparaison des différentes séries.....</i>	171
3-5 <i>Synthèse des résultats.....</i>	172

DISCUSSION

VII DISCUSSION.....	174
1- Analyse d'une stratégie pour la récupération de la diversité génétique des populations de <i>L. monocytogenes</i> dans les poissons fumés.....	176
2- Prévalence, origine et profil de la contamination des poissons fumés.....	182
3- Des types de <i>L. monocytogenes</i> non spécifiques de la filière poisson fumé.....	188
4- Une possible incidence de la matrice poisson fumé sur l'expression de la virulence.....	196

5- Perspectives.....	202
-----------------------------	------------

RÉFÉRENCES

VII RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	204
VIII PUBLICATIONS DE DIVERSES INSTANCES.....	220
IX DOCUMENTS ÉLECTRONIQUES.....	221

Liste des abréviations

AFCM : Analyse factorielle des correspondances multiples
AFLP : Amplified fragment length polymorphism
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFNOR : Association française de normalisation
BEH : Bulletin épidémiologique hebdomadaire
BHI : Broth heart infusion
CNR : Centre national de référence
CAC : Codex alimentarius commission
CDC : Centers for disease control and prevention
CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène publique française
DDASS : Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DGAL : Direction générale de l'alimentation
DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DGS : Direction générale de la santé
DLC : Date limite de consommation
DO : Déclaration obligatoire
EPIBAC : Surveillance des méningites et des bactériémies à *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*.
EPT : eau peptonée tamponnée
FAIR : Federal agriculture improvement and reform.
FAO : Food and agriculture organization of the united nations
FDA : Food and drug administration.
HACCP : Hazard analysis and critical control point
InVS : Institut de veille sanitaire
INRA : Institut national de la recherche agronomique.
LA : Listeria selective agar
LPI-1 : *Listeria* pathogenicity island 1
LLO : Listeriolysin O (hémolysine)
LMBA : *Listeria monocytogenes* blood agar
LRB : *Listeria* repair broth
MEE : Multilocus enzyme electrophoresis
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORF : Open reading frames
PCR : Polymerase chain reaction
PC-PLC : Phosphatidylcholine phospholipase C
PI-PLC : Phosphatidylinositol phospholipase C
PFGE : Pulsed field gel electrophoresis
RAPD : Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
SVF : Sérum de veau foetal
UHT : Ultra haute température
UPGMA : Unweighted pair group method with arithmetic mean

PRÉAMBULE

La listériose est une maladie d'origine alimentaire rare mais majeure par la gravité des symptômes engendrés (30 % de létalité) et l'ampleur des coûts entraînés (retraits du produit de la vente, arrêts maladie, hospitalisations, conséquences économiques pour les entreprises agro-alimentaires incriminées). En France, l'incidence oscille entre 200 et 300 cas/an avec une majorité de cas sporadiques dont l'origine n'est pas clairement définie (hors transmission nosocomiale). Ces dernières années, les aliments incriminés lors des épisodes épidémiques concernent les produits de la charcuterie (rillettes, langue de porc en gelée) et les fromages à pâte molle (Brie, Pont l'Evêque, Livarot, Epoisse). Même si leur implication dans les listérioses est seulement suspectée, les produits de la mer sont fréquemment contaminés par *L. monocytogenes* (second taux d'incidence de *Listeria* après les viandes). Les études menées récemment en France montrent notamment que la prévalence générale de *L. monocytogenes* dans les poissons fumés à froid se situe aux alentours des 10-20 % de la production, ce qui représente au moins 10 fois le taux de contamination des produits laitiers à la distribution.

Dans ce contexte et dans une logique de caractérisation du risque "*Listeria*" pour la filière, il paraissait légitime de s'interroger sur cette image décalée que véhiculent les poissons fumés en n'ayant jamais été incriminés lors de cas groupés de listériose bien que significativement contaminés.

Le présent travail a eu pour objectif d'apporter des éléments de réponses qui pourraient face à ce constat le justifier ou bien au contraire suggérer que le décalage perçu n'est qu'apparent et résulte d'une difficulté à déterminer l'origine des listérioses.

Les travaux se sont orientés sur 2 axes de recherche. Le premier a eu pour objectif de vérifier si les poissons fumés étaient contaminés ou non par un type particulier de souches de *L. monocytogenes*. Dans cette optique, un état des lieux sur la variabilité des souches et de leur virulence a été mis en œuvre.

Puis, pour expliquer la faible implication des poissons fumés dans les cas de listériose, une deuxième hypothèse s'est orientée sur la mise en évidence d'une possible virulence atténuée des souches résultant d'un effet de la matrice alimentaire "poisson fumé".

I - LISTERIA MONOCYTOGENES

1- Description – caractères généraux

Listeria monocytogenes est l'agent étiologique de la listériose, une maladie grave responsable d'avortements, de septicémies et de méningites dont la transmission est essentiellement alimentaire. Les bactéries du genre *Listeria*, qui comprend 5 autres espèces non pathogènes pour l'homme (*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. grayi*), sont ubiquitaires, très répandues dans l'environnement et se présentent sous la forme de petits bacilles à Gram positif, non capsulés et non sporulés. Ce sont des bâtonnets réguliers de 0,5-2,0 µm de longueur sur 0,4-0,5 µm de diamètre aux extrémités arrondies, associés en courtes chaînes, en palissades ou par paires sous forme de V. L'aspect morphologique est en fait influencé par le milieu dans lequel pousse la bactérie, et dans les cultures âgées, des filaments de 6 à 20 µm peuvent être observés. Elle se développe en aérobiose ou anaérobiose et forme des colonies à reflets bleutés en lumière oblique sur géloses nutritives incubées à 37°C. D'un point de vue physiologique, *L. monocytogenes* se caractérise par une possibilité de croissance sur une plage de température très étendue, expérimentalement démontrée entre -2°C et +45°C avec une croissance optimum pour des températures comprises entre 30 et 37°C. Par ailleurs, en conditions *in vitro* contrôlées, elle peut se multiplier pour des valeurs de pH comprises entre 4,6 et 9,6 et est reconnue pour son halotolérance. La bactérie peut survivre dans des saumures et peut se développer dans des solutions salines jusqu'à 10%. Ces différentes caractéristiques expliquent son caractère ubiquitaire et son aptitude à coloniser de nombreuses niches écologiques. La catalase est positive et le test oxydase est négatif. La bactérie produit de l'acide à partir du glucose, essentiellement de l'acide L(+) lactique. Le métabolisme fermentatif ne s'accompagne pas de production de gaz à partir de la plupart des sucres. Sur gélose au sang de cheval ou de mouton, après 24 h d'incubation, une hémolyse de type β est

observée avec les espèces *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* et *L. seeligeri*. Toutefois, hormis *L. ivanovii*, l'hémolyse n'est parfois visible que sous la colonie pour les deux autres espèces. La mobilité est un caractère important pour le diagnostic car la bactérie est toujours mobile lorsqu'elle est cultivée à 20-25°C grâce à l'implantation de quelques flagelles péritriches (1-4). En revanche, elle est immobile ou faiblement mobile à 37°C.

(Seeliger *et al.* 1986, Audurier *et al.* 1989, Euzéby 2000, Larpent 2000, Rapport *Listeria* Afssa, 2000).

Sur le plan moléculaire, la taille du génome des *Listeria*, initialement évaluée par macrorestriction et récemment déterminée plus exactement par séquençage (*L. monocytogenes* et *L. innocua*) est d'environ 3 Mb (Michel *et al.* 1992, Von Both *et al.* 1999, Glaser *et al.* 2001). La présence de plasmides est peu fréquente (Rocourt *et al.* 2000) mais cette observation n'est peut-être pas le reflet de la réalité. En effet, la majorité des milieux de culture utilisés pour la recherche des *L. monocytogenes* contiennent de l'acriflavine, un agent chimique utilisé par ailleurs pour ses propriétés de déstabilisation du maintien des plasmides chez les micro-organismes ("curage de plasmides"), (Farber *et al.* 1991). Néanmoins, une des études les plus récentes indique que 34 % de souches prélevées au hasard hébergent des plasmides dont la présence est significativement associée au séro groupe 1/2, lui conférant des propriétés de résistance au cadmium (Mc Lauchlin *et al.* 1997). Les gènes codant cette résistance seraient localisés sur un transposon Tn5422 de type Tn3 à l'origine de délétions dans les séquences plasmidiques (Lebrun *et al.* 1994). Très peu de transposons ont été décrits pour le genre *Listeria*, les données récentes du séquençage complet du génome *Listeria* n'en ont mis qu'un seul en évidence, proche de Tn916 (Glaser *et al.* 2001). En revanche, la lysogénie est assez fréquente au niveau du genre (Seeliger *et al.* 1986) et l'étude de sensibilité des souches aux bactériophages (lysotypie) a été d'un intérêt certain lors de grandes épidémies pour la mise en évidence d'une source commune de contamination (Rocourt *et al.* 2000). Enfin, les facteurs de virulence de *L. monocytogenes* sont principalement regroupés sous formes d'îlots de pathogénicité et sont d'origine chromosomique. Le plus important d'entre eux, appelé LIPI-1 pour L*isteria* Pathogenicity Island 1 est un segment d'environ 9 kb (Vasquez-Boland *et al.* 2001) totalement absent chez les espèces *L. innocua*, *L. welshimeri* et *L. grayi*.

2- Taxonomie

2-1 Taxonomie supragénérique

Historiquement, le genre *Listeria* a été rapproché de la famille des *Corynebacteriaceae* sur la simple base de traits morphologiques : petit bacille à Gram positif, asporogène (Leclerc 1995, Rocourt 1996). Ainsi, dans la huitième édition de Bergey's Manual de 1974, le genre *Listeria* est classé avec *Brochothrix*, *Erysipelothrix* et *Corynebacterium* sous la rubrique "Genres d'affiliation incertaine" soulignant ainsi l'ambiguïté de ce regroupement longtemps controversé (Audurier *et al.* 1989). A partir des caractéristiques phénotypiques, utilisées uniquement dans un but d'identification, le genre *Listeria* est classé dans le Bergey's Manual of Determinative bacteriology de 1994 (9^{ème} édition) dans le groupe 19 comprenant : *Caryophanon*, *Erysipelothrix*, *Kurthia*, *Renibacterium*, *Lactobacillus*, *Brochothrix* et *Carnobacterium*. Les trois derniers genres de cette liste avec les *Listeria* sont fréquemment rencontrés et d'intérêt certain en agroalimentaire au niveau sanitaire ou technologique (altération, acidification, production de bactériocine...).

L'introduction des méthodes moléculaires et en particulier le séquençage de l'ADN ribosomique 16S en 1983 a permis de définir le statut taxonomique du genre *Listeria* qui s'apparente alors à la branche phylogénétique dite des *Clostridium*, comprenant des espèces dont le C+G est inférieur à 50 % (alors que les *Corynebacterium* appartiennent à la subdivision "actinomycètes" avec un C+G supérieur à 50 %). Le genre *Listeria* est donc positionné d'un point de vue génomique avec les genres *Clostridium*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* pour les plus couramment rencontrés en microbiologie alimentaire (figure 1, p 4). Cette branche regroupe à la fois des bacilles et des coques à Gram positif dont certains sont sporulés (*Clostridium*, *Bacillus*) et d'autres non sporulés comme notamment les *Listeria*. Ces bactéries ont néanmoins en commun au niveau de leur paroi la présence d'acides lipoteichoïques et l'absence d'acides mycoliques (présents dans les parois des mycobactéries et corynébactéries). A l'intérieur du phylum *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus*, les *Listeria* forment un taxon indépendant se définissant notamment suivant les propriétés chimiotaxonomiques suivantes : G+C % compris entre 36-42 %, peptidoglycane de type A1 gamma associé à des acides teichoïques de type polymères de ribitol phosphate, acides gras non ramifiés et saturés et la ménaquinone majeure est de type MK-7 (Rocourt, 1996).

Bacteria

- Actinobacteria (bactéries à Gram + et fort % G+C)
 - Aquificae
 - Bacteroidetes/Chlorobi (groupes)
 - Chlamydiales/Verrucomicrobia (groupes)
 - Chloroflexi
 - Chrysiogenetes
 - Cyanobacteria (algues bleues-vertes)
 - Deferribacteres
 - Dehalococcoides (groupe)
 - Dictyoglomus (groupe)
 - Fibrobacter/Acidobacteria (groupe)
 - Firmicutes (bactéries à Gram + et faible % G+C)
 - ❖ Bacilli
 - Bacillales
 - Alicyclobacillaceae
 - Bacillaceae
 - Caryophanaceae
 - Listeriaceae
 - ◆ *Brochothrix*
 - ◆ *Listeria*
 - *Listeria grayi*
 - *Listeria innocua*
 - *Listeria ivanovii*
 - ***Listeria monocytogenes***
 - *Listeria seeligeri*
 - *Listeria welshimeri*
 - Paenibacillaceae
 - Planococcaceae
 - Pseudobacillus
 - Sporolactobacillaceae
 - Staphylococcaceae
 - Thermoactinomycetaceae
 - Bacillales non classés
 - Lactobacillales
 - Aerococcaceae
 - Carnobacteriaceae
 - Enterococcaceae
 - Lactobacillaceae
 - Leuconostocaceae
 - Streptococcaceae
 - Lactobacillales non classés
 - ❖ Clostridia
 - ❖ Mollicutes
 - ❖ Groupes Bacillus/Clostridium non classés
- Fusobacteria
- Nitrospirae
- Planctomycetales
- Proteobacteria (bactéries pourpres et relatives)
- Spirochaetales
- Thermodesulfobacteria
- Thermomicrobia
- Thermotogae
- Groupes Thermus/Deinococcus

Figure 1 : Positionnement de *L. monocytogenes* dans l'arbre phylogénétique du domaine Bacteria.

Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>

• = Phylum, ❖ = Classe, ○ = Ordre, ▪ = Famille, ◆ = Genre, → = Espèce

Le séquençage complet de 2 génomes de *Listeria* (*L. monocytogenes* et *L. innocua*) a fait apparaître une similarité certaine avec l'espèce *B. subtilis* au niveau des gènes codant les protéines, suggérant une origine commune (Glaser *et al.* 2001). D'après les données extraites de ce travail, les paires de gènes orthologues avec *B. subtilis* représenteraient environ 50 % des gènes identifiés chez *L. monocytogenes* (tableau 1). Une des plus surprenantes découvertes est notamment la mise en évidence de gènes homologues à ceux de *B. subtilis* impliqués dans l'état de compétence. Le genre *Listeria* n'étant pas naturellement transformable, il semblerait que ces gènes aient perdu leur fonction d'origine mais cette observation suggère que ce mécanisme de compétence a certainement été à l'origine des différences génomiques entre *Listeria* et *B. subtilis*. (Glaser *et al.* 2001).

Tableau 1 : Répartition des gènes de *L. monocytogenes* EGDe suivant leur fonction et nombre de paires de gènes orthologues avec *B. subtilis*.

Gènes classés par catégorie suivant leur fonction	Total gènes identifiés dans cette catégorie chez <i>L. mono.</i>	Nbre de gènes orthologues <i>L. mono.</i> chez <i>B. subtilis</i> (%)	Total gènes identifiés dans cette catégorie chez <i>B. subtilis</i> .
Enveloppe Structure-processus cellulaire	620	319 (51)	928
Voies métaboliques	615	382 (62)	774
Information génétique De l'ADN aux protéines	468	318 (68)	528
Autre fonction	149	65 (44)	332
Protéines inconnues	747	421 (56)	921
Sans similarité	261	0	623
Total	2853	1505 (52)	4106

Notes : Données extraites du Web tableau 1 sur le site : <http://www.sciencemag.org/cgi/data/294/5543/849/DC1/1>

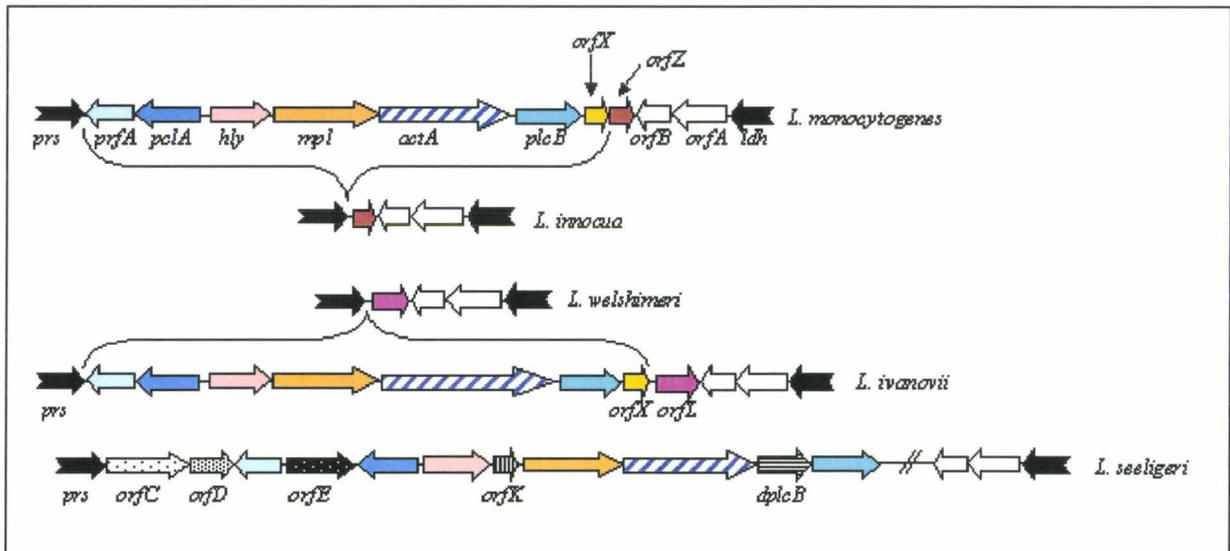


Figure 2 : Structure génétique de la région chromosomique contenant l'îlot de pathogénicité LIPI-1 chez *Listeria* spp. (Vazquez-Boland *et al.* 2001)

Les gènes appartenant à LIPI-1 se trouvent entre les accolades. Le gène *actA* montrant le plus de divergence dans sa séquence est hachuré. LIPI-1 est inséré dans une région chromosomique bordée par les gènes domestiques *prs* et *ldh* codant respectivement la phosphoribosyl-pyrophosphate synthase et la lactate déshydrogénase. Dans la région intergénique entre *ldh* et *plcB*, deux ORF, *orfA* et *orfB* sont retrouvées chez toutes les espèces *Listeria* spp indiquant que le point d'insertion de LIPI-1 se situe entre les locus de *prs* et *orfB*. Entre *plcB* et *orfB*, 2 petites ORF ont été identifiées, *orfX* et *orfZ* qui délimitent le point d'excision potentielle de LIPI-1 chez *L. innocua*. A l'intérieur de la région intergénique *plcB-orfB* chez *L. ivanovii*, il y a également deux petites ORF, *orfX* et *orfL* qui délimitent le point de délétion de LIPI-1 chez *L. welshimeri*. Dans ce cas, *orfX* code un homologue de *orfX* chez *L. monocytogenes* alors que *orfL* est vraiment distinct de *orfZ*. Chez *L. seeligeri*, *dplcB* est une version tronquée du gène *plcB* dupliqué tandis que *orfK* code pour une protéine présentant 39% de similarité celle issue du gène *plcA*.

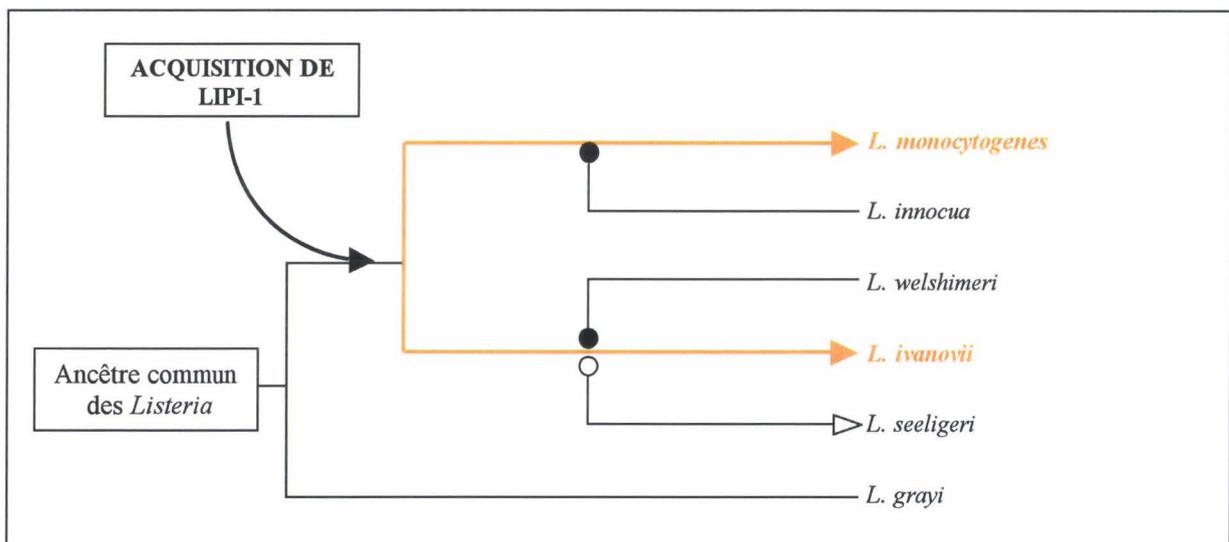


Figure 3 : Arbre phylogénétique du genre *Listeria* et modèle d'une possible évolution de la cassette LIPI-1 (Vazquez-Boland *et al.* 2001).

Après son acquisition au niveau d'un ancêtre commun, la fonction de cette cassette a été conservée chez les deux espèces *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*. Les cercles noirs indiquent des événements de délétion à l'origine de la non pathogénicité des deux espèces *L. innocua* et *L. welshimeri*. Le cercle blanc indique une altération de la cassette conduisant à une inactivation fonctionnelle chez l'espèce non pathogène *L. seeligeri*. Les dimensions des branches ne reflètent pas de distances génétiques.

2-2 Taxonomie infragénérique

Le genre *Listeria* comprend actuellement 6 espèces : *L. monocytogenes* dont le nom a pour origine la monocytose, signe clinique initialement observé en 1926 dans le sang d'un lapin de laboratoire infecté par cette bactérie (Schlech, 2000); *L. innocua* du latin *innocuus* signifiant inoffensif en raison du caractère non pathogène de cette espèce pour l'homme et les animaux; *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* et *L. grayi* portent les noms des scientifiques à l'origine ou ayant contribué à leur découverte (Seeliger *et al.* 1986). En microbiologie clinique, seule l'espèce *L. monocytogenes* est isolée de cas pathologiques humains tandis que chez les animaux les deux espèces *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* peuvent être à l'origine d'épizooties (ou de cas isolés de listériose) notamment chez les ovins (Rapport intermédiaire AFSSA, 2000).

L'analyse des séquences d'ADN ribosomiques 16S-23S et les hybridations ADN/ADN ont fait apparaître deux branches phylogénétiques distinctes à l'intérieur du genre : *L. grayi* se différencie nettement des 5 autres espèces qui restent regroupées ensemble (Rocourt, 2000). De plus, le pourcentage en G+C pour *L. grayi* se situe autour de 41-42 % alors qu'il oscille entre 37 et 39 % pour *L. monocytogenes* et les espèces associées (Seeliger *et al.* 1986). En se basant sur la structure génétique de la région chromosomique contenant l'îlot de pathogénicité LIPI-1 chez *Listeria* spp., Vazquez-Boland *et al.* (2001) ont récemment proposé un modèle de l'organisation phylogénétique à l'intérieur du genre *Listeria*. L'étude de ce locus suggère en effet l'existence d'un ancêtre commun à l'origine de toutes les espèces. L'îlot de pathogénicité se définit en fait comme une cassette composée des gènes indispensables à la survie intracellulaire (figure 2), dont les fonctions seront explicitées dans les paragraphes sur la virulence. Chez *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*, l'organisation des gènes à l'intérieur de cette cassette est identique mais les séquences en ADN divergent et présentent un degré d'identité de 73 à 78 % compatible avec la distance génétique entre ces deux espèces. La différence la plus importante se situe au niveau du gène *actA* avec seulement 34 % d'identité. Chez *L. seeligeri*, la cassette LIPI-1 est également présente mais non fonctionnelle en raison de séquences d'insertions situées notamment entre les gènes *plcA* et *prfA*. Pour les espèces *L. innocua* et *L. welshimeri*, la cassette est absente mais le locus est présent. En d'autres termes, en examinant les gènes et les ORF (open reading frames, séquences potentiellement traduisibles en protéines) présentes dans cette région chromosomique pour ces deux espèces, les séquences bordant les cassettes des espèces *L. monocytogenes* ou *L. ivanovii* sont respectivement retrouvées (figure 2).

Ces indices témoignent que les cassettes ont été d'abord acquises puis totalement excisées vraisemblablement à la suite d'un seul événement génétique qui pourrait être un transfert par un élément mobile dont on ne retrouve pas de trace. Cependant, les séquences des *orfZ* (commun à *L. monocytogenes* et *L. innocua*) et *orfL* (commun à *L. ivanovii* et *L. welshimeri*) présentent des similarités avec des séquences phagiques suggérant une acquisition par transduction comme l'avaient déjà proposé Charkraborty *et al.* (2000) dans leurs travaux. *L. grayi*, serait restée en dehors de ces évolutions et représenterait la branche phylogénétique dérivant de l'ancêtre commun n'ayant jamais acquis la cassette. En prenant compte de ces divers éléments, Vazquez-Boland *et al.* (2001) ont construit un dendrogramme phylogénétique présenté dans la figure 3.

3- Données génomiques

Le séquençage complet des génomes de deux souches de *Listeria* s'est achevé très récemment et les premières données publiées (Glaser *et al.* 2001) ont permis la comparaison entre les deux espèces proches *L. monocytogenes* (sérotypage 1/2a) et *L. innocua* (sérotypage 6a). La taille et le pourcentage en G+C des deux chromosomes comparés sont similaires à savoir 2 944 528 pb et 39 % pour *L. monocytogenes* et 3 011 209 pb et 37 % pour *L. innocua*. Au total, en excluant les gènes issus de prophages, 270 gènes (9,5 %) sont apparus spécifiques de la souche EGDe *L. monocytogenes* et 149 gènes (5 %) spécifiques de *L. innocua* (figure 4, p 11). Les différences significatives entre les deux espèces se situent notamment au niveau des protéines de surfaces qui peuvent être potentiellement traduites à partir des gènes identifiés. Celles-ci peuvent être classées en 6 familles (figure 5).

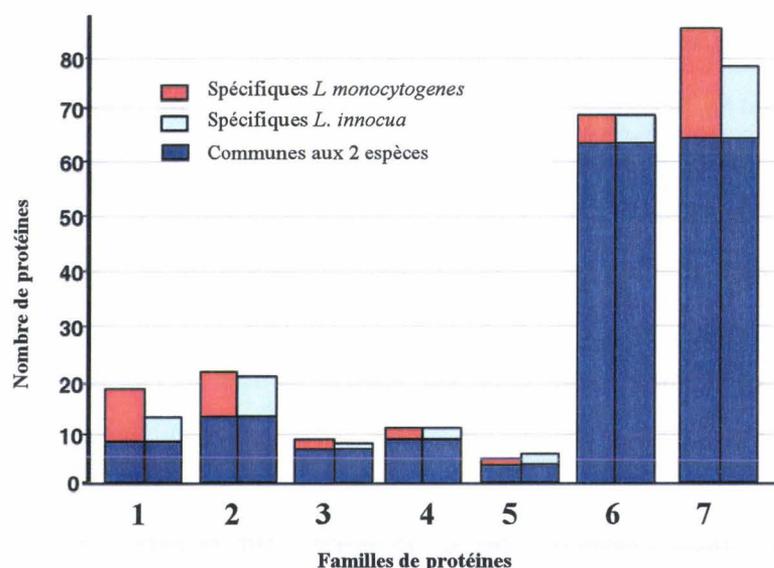


Figure 5

Protéines de surface et secrétées chez *L. monocytogenes* et *L. innocua* et leur répartition dans les différentes catégories.

Familles de protéines de surface :

- 1 = Internalines avec un motif LPXTG,
- 2 = Autres protéines LPXTG,
- 3 = Motif GW,
- 4 = Région terminale hydrophobe,
- 5 = Similaire à P60,
- 6 = Lipoprotéines.

La famille 7 correspond aux protéines secrétées

(Données extraites du site : <http://www.sciencemag.org/cgi/data/294/5543/849/DC1/1>)

- ♦ Les internalines représentent une famille multigénique de protéines ayant la particularité de contenir une région répétée d'oligopeptides composés de leucine ou isoleucine notée LRR pour Leucine Rich Repeats. Cette caractéristique conduit à une structure spatiale impliquée dans des interactions protéines-protéines se présentant sous forme d'un arrangement de brins β parallèles en "hélices". Certaines internalines présentent également un motif LPXTG précédant le domaine C terminal. Ce pentapeptide est impliqué dans la liaison covalente de la protéine au peptidoglycane à la surface de la bactérie et est communément retrouvé pour d'autres types de protéines chez *Listeria* et chez un bon nombre d'autres Gram +. Parmi les 41 protéines contenant le motif LPXTG chez *L. monocytogenes*, 19 présentent également un domaine LRR et 11 ne sont pas retrouvées chez *L. innocua* (Vazquez-Boland *et al.* 2001, Glaser *et al.* 2001).
- ♦ D'autres protéines présentent un motif GW répété en tandem qui correspond également à un système d'ancrage à la surface de la bactérie via un attachement aux acides lipoteichoïques. Jusqu'à présent, seulement deux protéines avaient été identifiées avec ce motif. L'internaline InlB et une protéine Ami présentant une activité d'autolysine. Cette dernière serait potentiellement impliquée dans l'adhésion aux cellules eucaryotes. Avec les résultats du séquençage, 7 autres protéines de cette famille ont été identifiées chez *L. monocytogenes* dont une n'est pas retrouvée chez *L. innocua* (Braun *et al.* 1997, Milohanic *et al.* 2000, Glaser *et al.* 2001).
- ♦ Certaines protéines présentent une région C terminale hydrophobe qui pourrait être à l'origine de leur attachement à la surface de la bactérie. La plus connue est la protéine ActA chez *L. monocytogenes* impliquée dans le cycle infectieux et codée par le gène du même nom localisé dans la cassette LIPI-1 (absente du génome de l'espèce *L. innocua*).
- ♦ Les protéines de type P60 (60 kiloDa) font référence à la protéine codée par le gène *iap* (pour invasion associated protein, en raison de son possible rôle dans la virulence). C'est une muréine hydrolase, protéine majeure extracellulaire présente chez toutes les espèces de *Listeria* (excepté *L. grayi*). En coupant le peptidoglycane, son rôle est essentiel au niveau de la division cellulaire et son absence est létale pour la bactérie. En revanche, la protéine présente une séquence spécifique chez *L. monocytogenes* qui la distingue des autres espèces et qui se compose de motifs TN répétés et arrangés de façon symétrique (Wuenschel *et al.* 1993).

- ♦ Les résultats du séquençage ont permis de mettre en évidence 68 gènes supposés coder des lipoprotéines chez les deux espèces.

Des différences significatives apparaissent au niveau des protéines excrétées (figure 5 p 8). Une partie de celles-ci avaient déjà été mises en évidence pour leur rôle important dans la virulence (LLO, PlcA, PlcB, InlC, voir paragraphe virulence). Il est intéressant de noter alors que sur les 86 protéines détectées, 23 sont absentes chez *L. innocua* (Glaser *et al.* 2001).

Une des particularités concerne la forte proportion de gènes de régulation représentant 7,3 % et identifiés à partir des deux espèces. Avec ce score les *Listeria* se placent en deuxième position derrière *P. aeruginosa* (8,4 %). Parmi les gènes de régulation que l'on a jusqu'à présent le mieux caractérisés, le gène *prfA* (de la famille Crp/Fnr), qui active la plupart des gènes de virulence connus est absent de *L. innocua*. Cependant des gènes précédés d'un site potentiel de reconnaissance de cet activateur ont été identifiés à partir des deux génomes (Glaser *et al.* 2001).

Enfin, 3 gènes impliqués dans les mécanismes de résistances aux acides ont été identifiés chez *L. monocytogenes* dont 1 paire paralogue n'est pas retrouvée chez *L. innocua*. De la même façon, 3 gènes uniquement présents chez l'espèce pathogène seraient impliqués dans la dégradation des sels biliaires. De surcroît, un site de reconnaissance du gène de régulation *prfA* a été mis en évidence en amont de l'un de ces gènes suggérant son possible rôle dans la virulence (Glaser *et al.* 2001).

Parmi les régions identifiées comme spécifiques de *L. monocytogenes*, certaines contiennent des pourcentages en G+C significativement différents du reste du génome qui les encadre suggérant leur récente acquisition par des transferts horizontaux (figure 4). Néanmoins, les deux souches de *Listeria* ont affiché une organisation conservée entre leurs chromosomes et une synténie inattendue a été observée avec les génomes de deux autres espèces à Gram + *B. subtilis* et *S. aureus*. Ce dernier point suggère une stabilité marquée pour ce groupe de bactéries (Glaser *et al.* 2001).

Une équipe allemande a, en parallèle, recherché les régions génomiques qui pouvaient être spécifiques des souches épidémiques de *L. monocytogenes* (Herd *et al.* 2001). Pour détecter ces *locus*, la stratégie a consisté à soustraire le génome de la souche EGD (sérovar 1/2a), qui représente le prototype virulent, à celui d'une souche isolée lors d'un épisode épidémique (sérovar 4b). Au total, 5 % du génome 4b n'est pas présent chez EGD (soit approximativement 150 à 190 kb). Environ la moitié des fragments n'ont pas pu être identifiés au niveau de leur fonction mais parmi ceux présentant des similitudes avec des protéines

connues, 41 % s'apparentent à des protéines de surface. Là encore, ce serait des molécules à la périphérie de la bactérie qui feraient la différence en conférant un avantage sélectif dans l'environnement ou dans les mécanismes de virulence au niveau de l'invasion, l'adhésion ou l'échappatoire au système immunitaire (Herd *et al.* 2001).

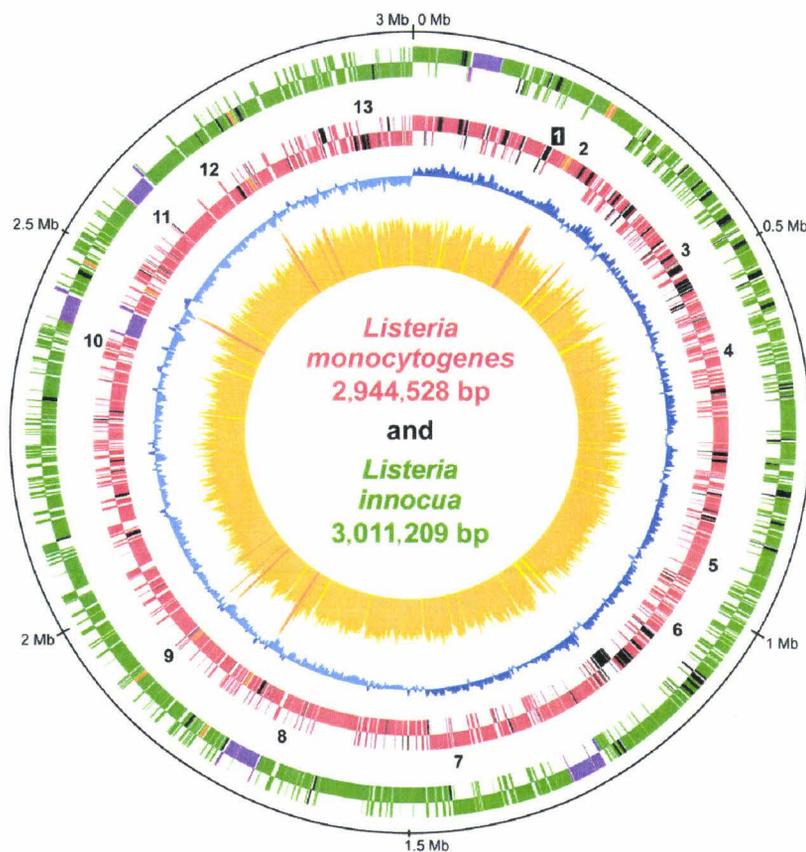


Figure 4 : Cartes physiques des génomes de *L. monocytogenes* (souche EGDe) et *L. innocua* (souche CLIP11262) montrant les positions et les orientations des gènes (Glaser *et al.* 2001). Les cercles 1 et 2 comportent les gènes présents respectivement chez *L. innocua* et *L. monocytogenes* sur les brins + et -.

Code couleur :

vert, gènes *L. Innocua*

rouge, gènes *L. monocytogenes*

noir, gènes spécifiques pour chacune des espèces

orange, opérons des ARN ribosomiques

mauve, prophage

Les nombres indiquent la position de certains gènes de virulence : 1 = locus de LIPI-1, 2 = *clpC*, 3 = *inlAB*, 4 = *iap*, 5 = *dal*, 6 = *clpE*, 7 = *lisRK*, 8 = *dat*, 9 = *inlC*, 10 = *arpJ*, 11 = *clpP*, 12 = *ami*, 13 = *bvrABC*.

Le cercle 3 indique le biais C/G (C+G/G-C) de *L. monocytogenes*.

Le cercle 4 indique la composition en G+C de *L. monocytogenes*, en jaune clair = <32 %, en jaune = de 32,5 à 43,5 %, en jaune foncé = >43,5 %.

L'échelle est indiquée en mégabases sur le cercle extérieur avec l'origine de répliation à la position 0.

Tableau 2 : Répartition des sérotypes chez les espèces *Listeria* et caractères bactériologiques associés.

Groupes phénotypiques	espèces	sérotypes	β hémolyse	xylose
I	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7	+	-
II	<i>L. ivanovii</i> ¹	5	+	+
III	<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b	-	-
IV	<i>L. welshimeri</i>	1/2b, 4c, 6a, 6b	-	+
V	<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4c, 4d, 6b	+	+
VI	<i>L. grayi</i>		-	-

¹ 2 sous espèces, *ivanovii ivanovii* et *ivanovii londoniensis*.

Tableau 3 : Structure antigénique de chaque sérotype de *L. monocytogenes* d'après le tableau publié dans Farber *et al.* 1991.

Sérotypes	Antigènes somatiques (O)								Antigènes flagellaires (H)
1/2a	I	II	(III)						AB
1/2b	I	II	(III)						ABC
1/2c	I	II	(III)						B D
3a		II	(III)	IV					AB
3b		II	(III)	IV			(XII)	(XIII)	ABC
3c		II	(III)	IV			(XII)	(XIII)	B D
4a			(III)	(V)		VII		IX	ABC
4ab			(III)	V	VI	VII		IX X	ABC
4b			(III)	V	VI				ABC
4bX ¹			(III)	V	VI	VII			ABC
4c			(III)	V		VII			ABC
4d			(III)	(V)	VI		VIII		ABC
4e			(III)	V	VI		(VIII)	(IX)	ABC
7			(III)					XII XIII	ABC

¹ identifié lors d'un épisode épidémique en Grande Bretagne (McLauchlin *et al.* 1989 et 1991).

Les parenthèses indiquent que l'antigène n'est pas toujours exprimé.

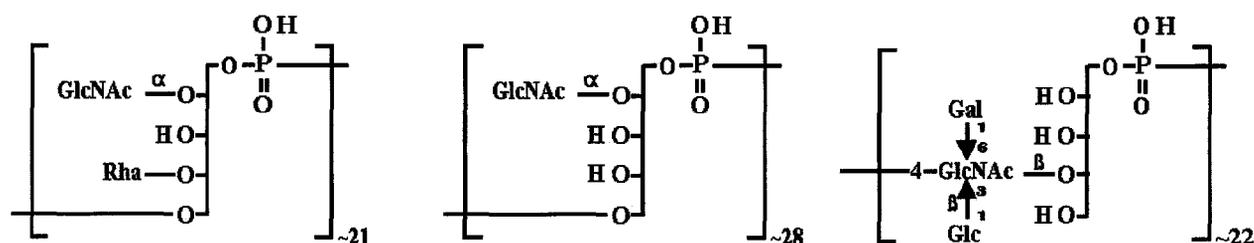


Figure 6 : Représentation schématique de la composition des acides teichoïques chez les différents sérotypes de *L. monocytogenes*. (A) type 1/2, (sérotype 1/2a, 1/2b, 1/2c); (B) type 3 (sérotypes 3a, 3b et 3c); (C) sérotype 4b. D'après Uchikawa *et al.* 1986 et Promadej *et al.* 1999.

4- Structure antigénique

La caractérisation des antigènes de surface est à l'origine de la méthode de typage phénotypique connue sous le nom de sérotypage. Elle est basée sur la détection de 15 antigènes somatiques (I à XV) et 5 antigènes flagellaires (A à E), (Larpent, 2000). La combinaison de ces différents facteurs permet de distinguer une vingtaine de sérotypes pour l'ensemble du genre *Listeria*, lesquels sont désignés suivant une nomenclature unique et internationale par des chiffres associés ou non à des lettres en minuscules (tableaux 2 et 3). Le schéma actuel pour la détermination des sérotypes est issu de celui proposé par Seeliger et Donker-Voet (Farber *et al.* 1991).

Au niveau de la paroi, ce sont les acides teichoïques exposés à la surface externe de la couche de peptidoglycane qui ont des propriétés antigéniques. Chez les *Listeria*, les acides teichoïques sont majoritairement des polymères de molécules de ribitol phosphate liées en 1,5. Pour les sérogroupe de type 1/2 et 3, l'unité de ribitol phosphate est associée à de la *N*-acétylglucosamine (groupe 3) et du rhamnose (groupe 1/2). Pour le sérogroupe 4, les résidus de *N*-acétylglucosamines sont directement incorporés au niveau de la chaîne de ribitol phosphate et portent, suivant les sérotypes, du galactose et/ou du glucose. Le sérotype 4b se distingue des autres en étant le seul où figurent à la fois du galactose et du glucose sur les résidus de *N*-acétylglucosamine intégrés dans la chaîne des acides teichoïques (Uchikawa *et al.* 1986, Promadej *et al.* 1999), (figure 6). Parmi les antigènes somatiques identifiés chez *Listeria*, certains sont en communs avec *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* et *Bacillus* (Audurier et Berche, 1989a). A l'intérieur du genre, certains sérotypes sont communs à plusieurs espèces, notamment le sérotype 1/2b retrouvé à la fois chez *L. monocytogenes*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri* et le sérotype 4b, commun à *L. monocytogenes* et *L. seeligeri*. En associant au sérotype d'autres caractères phénotypiques comme la β hémolyse et la fermentation du xylose, il est possible de s'orienter sur une des espèces (tableau 2). Le sérotype 4b rassemble à lui seul 50 à 70 % des souches cliniques d'origine humaine (Rocourt *et al.* 2000). Une équipe américaine a récemment identifié une partie des régions génomiques spécifiques de ce sérogroupe qui sont impliquées dans l'expression des antigènes de surface : le gène *gtcA* (pour galactose-glucose in teichoic acid, Promadej *et al.* 1999) et une "cassette" d'environ 3 kb nommée *gltA-gltB* (pour glucose in teichoic acid, Lei *et al.* 2001). La fonction précise de cette dernière n'est pas encore élucidée mais le fragment d'ADN en question présente un pourcentage G+C sensiblement inférieur à celui du genre *Listeria* (34 % au lieu de 38%) et est encadré par des séquences répétées inversées. Ces éléments suggèrent un possible transfert horizontal de cette région d'une source non identifiée à ce jour. Un transposon ou un phage pourrait en être à l'origine.

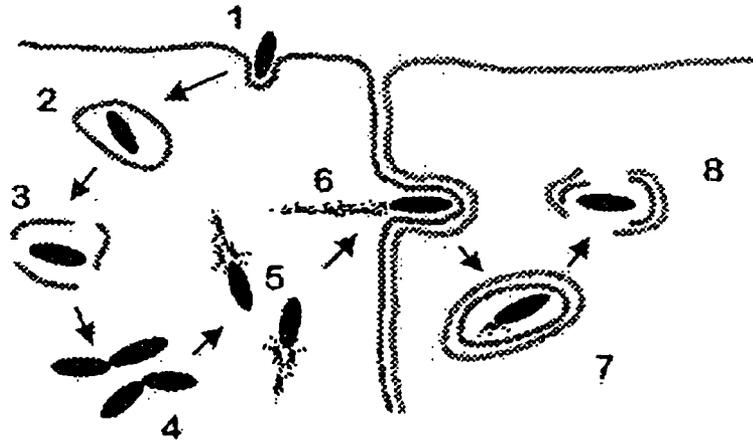


Figure 7 : Etapes successives du cycle infectieux chez *L. monocytogenes*.

(Figure extraite de Vazquez *et al.* 2001).

- | | |
|--|--|
| <p>1, entrée de la bactérie dans la cellule hôte</p> <p>2, survie dans la vacuole formée</p> <p>3, lyse de la vacuole et libération dans le cytosol</p> <p>4, multiplication</p> | <p>5, mouvement intracellulaire généré par la queue d'actine</p> <p>6, dissémination dans la cellule voisine</p> <p>7, survie dans la vacuole à double membrane</p> <p>8, lyse, libération et ré-initiation d'un nouveau cycle</p> |
|--|--|

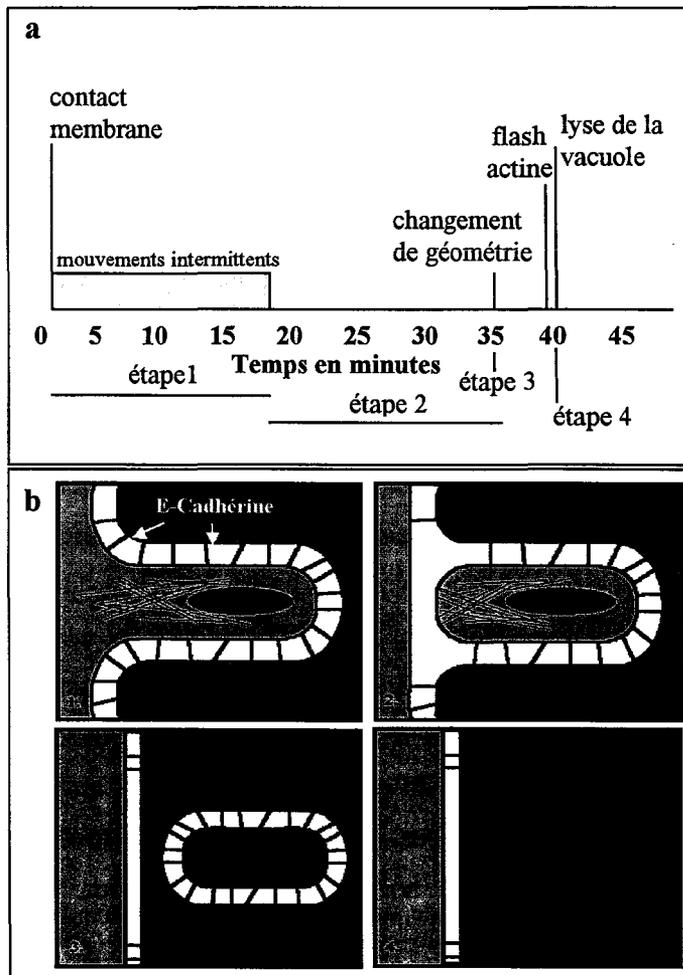


Figure 8 : Modèle et échelle de temps de la phase de protusion endocytée permettant à la bactérie la dissémination intracellulaire.

Reproduit d'après Robbins *et al.* 1999

(a) échelle de temps requis pour le mouvement intracellulaire permettant le passage de cellule à cellule. Pendant 15 min, des mouvements dirigés intermittents sont observés puis la bactérie s'immobilise pendant 20 min jusqu'à la formation complète de la vacuole à double membrane (changement de géométrie). Celle-ci est ensuite lysée en 3-5 min. Cette étape est précédée quelquefois d'un "flash" d'actine.

(b)

- 1, la protusion stabilisée par la E-cadhérine, des mouvements intermittents sont produits par la bactérie.
- 2, puis il y a immobilisation.
- 3, la vacuole est formée, détachée de la membrane cellulaire et il y a acidification (et activation de LLO et PI-LPC).
- 4, la lyse de la double membrane libère la bactérie. Les filaments d'actine subsistants du "flash" précédent la lyse restent stables mais la bactérie ne retrouvera sa mobilité qu'après division.

5- Virulence

5-1 *Entrée de la bactérie dans les tissus et les cellules des mammifères*

La voie alimentaire représentant le principal mode de contamination chez l'homme, l'entrée de la bactérie dans l'organisme s'opère principalement par le franchissement de la barrière intestinale. A cette fin, le passage de la muqueuse à l'échelle cellulaire se fait *via* l'envahissement des entérocytes et/ou des cellules M des plaques de Peyer. Après cette étape, elles se retrouvent dans les cellules phagocytaires de la *lamina propria* où elles survivent et se multiplient. Par la suite *via* la lymphe et le courant sanguin elles infectent le foie et la rate. Dans ces organes, et notamment le foie, les bactéries sont rapidement phagocytées et tuées dans leur grande majorité. Chez la souris, les expérimentations ont montrées que seulement 10 % de l'inoculum survivait à ce niveau. Les bactéries non détruites infectent alors les hépatocytes et si dans les jours qui suivent, l'état immunitaire de l'hôte n'est pas en mesure de contrôler l'infection, le processus se poursuit et les bactéries se disséminent par voie sanguine jusqu'au cerveau ou au placenta (Rocourt *et al.* 2000, Euzéby 2000).

5-2 Le cycle infectieux (figure 7).

Quelque soit la cellule hôte (macrophage ou cellule épithéliale par exemple), la dissémination intracellulaire de la bactérie implique des événements successifs qui se reproduisent sous forme de cycles hautement reproductibles. Plusieurs étapes composent donc ce processus infectieux qui comprend une internalisation de la bactérie, une multiplication intracytoplasmique après lyse de la vacuole, un déplacement de la bactérie dans le cytoplasme jusqu'à la membrane de la cellule adjacente, une protusion endocytée et formation d'une nouvelle vacuole à double membrane, lyse de celle-ci et initiation d'un nouveau cycle. Ce mode de dissémination dans les tissus sans jamais quitter le cytoplasme permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire. L'étape relative au passage d'une cellule à l'autre se déroule en approximativement 40-50 min, ce qui correspond au temps de génération de la bactérie bien que celle-ci ne se divise pas durant cette étape (figure 8a). Les travaux de Robbins *et al.* (1999) par vidéo microscopie sur cellules non phagocytaires, ont abouti à un modèle des mécanismes impliqués dans la protusion (protubérances cellulaires) et sa phagocytose par la cellule adjacente.

Il est suggéré que le terme le mieux approprié pour décrire ce phénomène serait la paracytrophagie dans la mesure où la cellule "ingère" un élément "enrobé" par sa propre membrane (figure 8b p 14). Dans ce modèle, l'étape initiale de contact dure 15 min pendant lesquelles la bactérie induit son entrée et produit des mouvements intermittents. Puis elle reste immobile pendant 20 min jusqu'à ce que la vacuole soit complètement formée. A ce moment là, la lyse de cette dernière se produit très rapidement en moins de 5 min. La bactérie est libérée dans le cytoplasme mais doit d'abord entamer un cycle de division avant que sa mobilité soit ré-initialisée (Robbins *et al.* 1999).

5-3 Support génétique de la virulence

5-3-1 Entrée de la bactérie dans la cellule

L. monocytogenes est capable d'induire sa propre entrée dans les cellules non professionnelles par un processus s'apparentant à la phagocytose, ce qui lui confère son caractère invasif. Dans un premier temps, c'est une protéine de surface de la famille des internalines ou InlA qui permet le contact étroit avec la cellule hôte (figure 9). Son récepteur est l'E-cadhérine, une protéine transmembranaire trouvée sur la face basolatérale des cellules épithéliales. Très récemment, il a été montré qu'un seul acide aminé en position 16 de l'E-cadhérine est à l'origine de la spécificité de l'interaction avec l'internaline. En effet, chez les humains il y a un résidu proline à cette position alors que chez les rongeurs il y a un résidu d'acide glutamique. Cette différence fondamentale explique en partie pourquoi la listériose humaine ne peut pas être reproduite pas voie orale de façon reproductible chez la souris. C'est la raison pour laquelle une souris transgénique exprimant l'E-cadhérine humaine au niveau des cellules épithéliales de l'intestin a été développée. Le mécanisme par lequel l'internaline accède à l'E-cadhérine n'est pas encore élucidé (Iretton *et al.* 1997, Rapport *Listeria* Afssa 2000, Rocourt *et al.* 2000, Fintlay 2001, Lecuit *et al.* 2001).

Une autre protéine de surface l'internaline InlB serait également impliquée dans l'invasion. Son système d'ancrage à la périphérie de la bactérie est différent de InlA (figure 9 et paragraphe 3). La différence entre ces deux internalines résiderait dans leur spécificité vis-à-vis de la cellule hôte. InlB serait essentielle pour l'invasion d'une plus large gamme de cellules notamment les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et ceci pour des espèces animales variées. Les gènes codant les 2 internalines InlA et InlB sont organisés en opérons et sont cotranscrits. D'autres protéines de la famille multigénique de l'internaline ont été décrits comme l'InlC qui est exclusivement sécrétée. Leur rôle précis dans la virulence reste encore à

déterminer. Certains des gènes codant ces protéines sont présents dans les autres espèces de *Listeria*, ce qui suggère un rôle biologique non associé à la virulence (Vazquez-Boland *et al.* 2001).

Enfin, la protéine P60, nécessaire à la croissance et à la formation du septum aurait également un rôle dans l'invasion (paragraphe 3) ainsi que la protéine ActA impliquée dans la mobilité intracellulaire (voir 5-3-3). Les mutants *actA* apparaissent en effet inaptes à pénétrer les cellules Caco-2 ou Vero (Euzéby 2000, Rocourt *et al.* 2000).

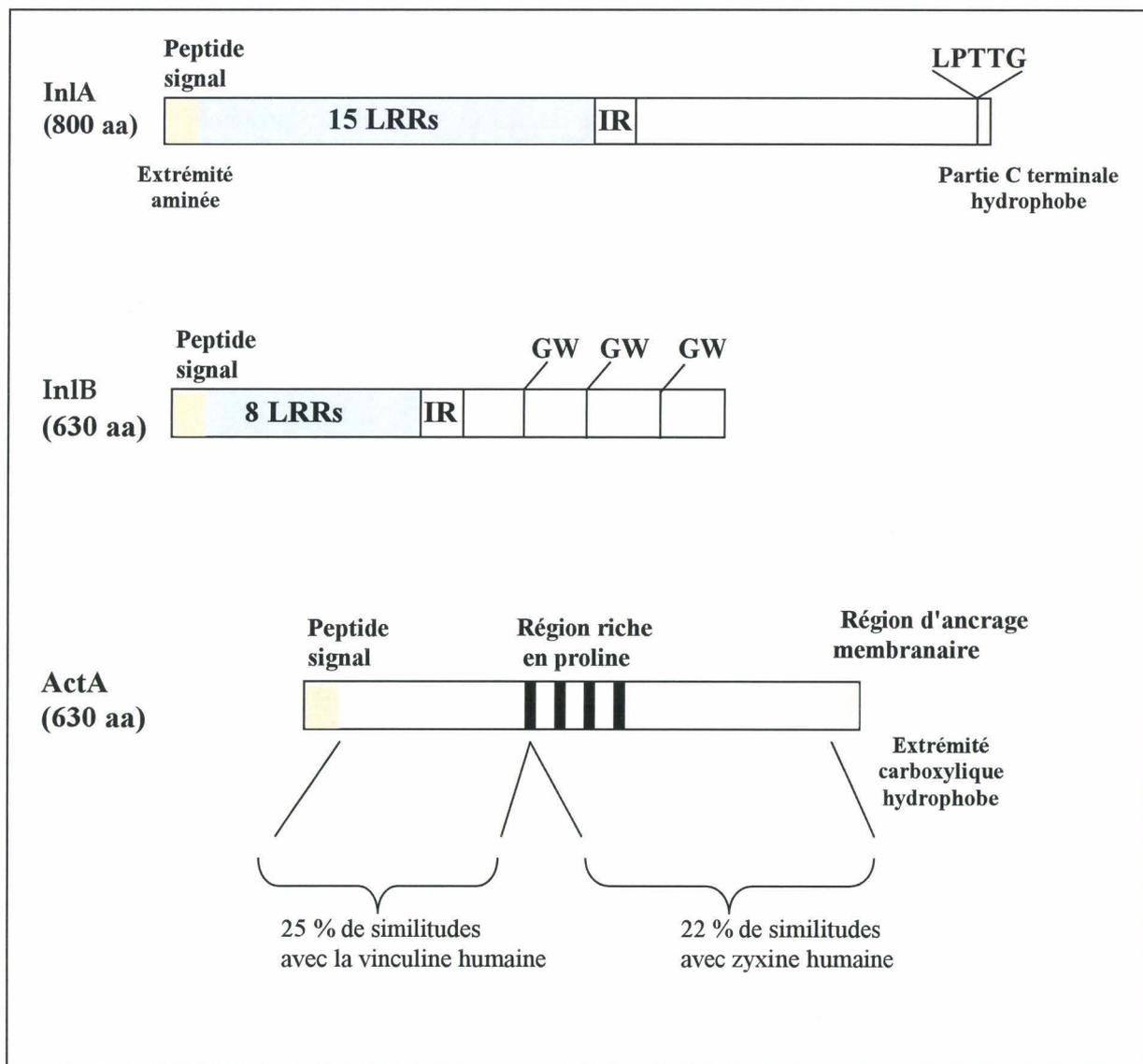


Figure 9 : Représentation schématique de trois protéines impliquées dans le cycle infectieux. (D'après Cossart *et al.* 1998)

5-3-2 Sortie du phagosome

Après pénétration, *L. monocytogenes* se trouve emprisonnée dans un compartiment phagosomal. Pour se multiplier et poursuivre le processus infectieux la bactérie se trouve dans une phase critique. Pour éviter sa destruction et s'échapper rapidement, le mécanisme de sortie se déclenche avec la chute brutale du pH à l'intérieur de la vacuole intracytoplasmique. Deux enzymes dont l'activité est maximale en milieu acide (pH = 5) sont alors activées et vont agir en synergie : la lyse de la membrane du phagosome est assurée essentiellement par la listériolysine ou LLO, une hémolysine thiol dépendante sécrétée et une phosphatidylinositol phospholipase C ou PI-PLC. En hydrolysant le phosphatidylinositol et le glycosyl phosphatidylinositol des protéines extracytoplasmiques de la membrane du phagosome, la PI-PLC facilite l'action de la LLO. Ces deux protéines sont codées respectivement par les gènes *hly* et *plcA* adjacents sur l'îlot de pathogénicité chromosomique LIPI-1 et leur transcription se fait en sens opposé (figure 10 p 20, paragraphe 5-4-1), (Euzéby 2000, Rocourt 2000, Rapport Afssa *Listeria* 2000).

5-3-3 Mouvement intracellulaire

En milieu intracellulaire, la bactérie se déplace grâce à la formation d'une queue d'actine à l'une de ses extrémités qui permet sa propulsion dans le cytoplasme. La polymérisation de l'actine de la cellule hôte est induite par la protéine ActA, localisée à la surface de la bactérie par ancrage à la membrane au niveau de son domaine hydrophobe C-terminale (figure 9 p 17). Pour qu'il y ait mouvement, le gradient d'implantation de ActA en surface doit être polaire pour générer par la suite une force unidirectionnelle *via* la "comète d'actine" formée à ce niveau. La distribution asymétrique de ActA serait, selon le modèle proposé par Robbins *et al.* (1999) consécutive à l'élongation bactérienne durant la division. La zone de septation serait moins pourvue de la protéine ActA à sa surface. Cette explication est parfaitement en accord avec le fait que l'initiation de la mobilité intracellulaire ne se produit qu'après un cycle de division bactérien. C'est l'incorporation et la polymérisation de nouveaux filaments d'actine qui engendrent la force motrice. Les mécanismes impliqués sont complexes et partiellement élucidés. ActA reste à la surface de la bactérie et n'est pas retrouvée dans les filaments d'actine mais de nombreuses protéines cellulaires y auraient été identifiées telle que le complexe Arp2/3 (actin related proteins). La VASP pour Vasodilatator-stimulated phosphoprotein et la profiline seraient les seules protéines localisées à la base de la queue d'actine, à proximité de ActA présente sous forme de dimère.

La protéine ActA est codée par le gène *actA* localisé dans la cassette chromosomique de pathogénicité LIPI-1 et représente un facteur de virulence essentiel puisque les mutants restent invasifs mais ne se disséminent pas de cellule en cellule. Dans sa structure, ActA apparaît comme une protéine composite avec deux régions présentant des similitudes avec la vinculine humaine d'une part et la zyrine humaine d'autre part (figure 9 p 17).

Cette protéine serait également impliquée dans les mécanismes d'invasion et au niveau de la protusion endocytée permettant le passage de cellule en cellule. Dans cette dernière étape, deux types de filaments d'actine ont été observés (des courts disposés de façon aléatoire et des longs orientés sur un même axe) ce qui suggère que le processus impliqué diffère de celui se produisant dans le cytoplasme avec notamment des interactions avec la membrane de l'hôte (Iretton *et al.* 1997, Cossart *et al.* 1998, Robbins *et al.* 1999).

5-3-4 Lyse de la vacuole à double membrane

Le mécanisme de dissémination dans la cellule voisine conduit la bactérie à se retrouver enfermée une nouvelle fois dans une vacuole mais d'un type différent se caractérisant par une double membrane cytoplasmique. La sortie de ce nouveau compartiment implique deux enzymes à zinc : PlcB et Mpl. La lécithinase PlcB est capable d'hydrolyser différents phospholipides et présente des similitudes avec la phosphatidylcholine-phospholipase de *B. cereus* et *C. perfringens*, l' α toxine. PlcB est sécrétée sous la forme d'un précurseur immature qui doit être clivé par la métalloprotéase Mpl pour devenir active. Les trois gènes *mpl*, *actA* et *plcB* sont organisés en opéron dans la cassette LIPI-1 et leurs produits sont tous impliqués dans une fonction essentielle du processus infectieux qui concerne le passage de cellules en cellules (Portnoy *et al.* 1992, Vazquez-Boland *et al.* 2001).

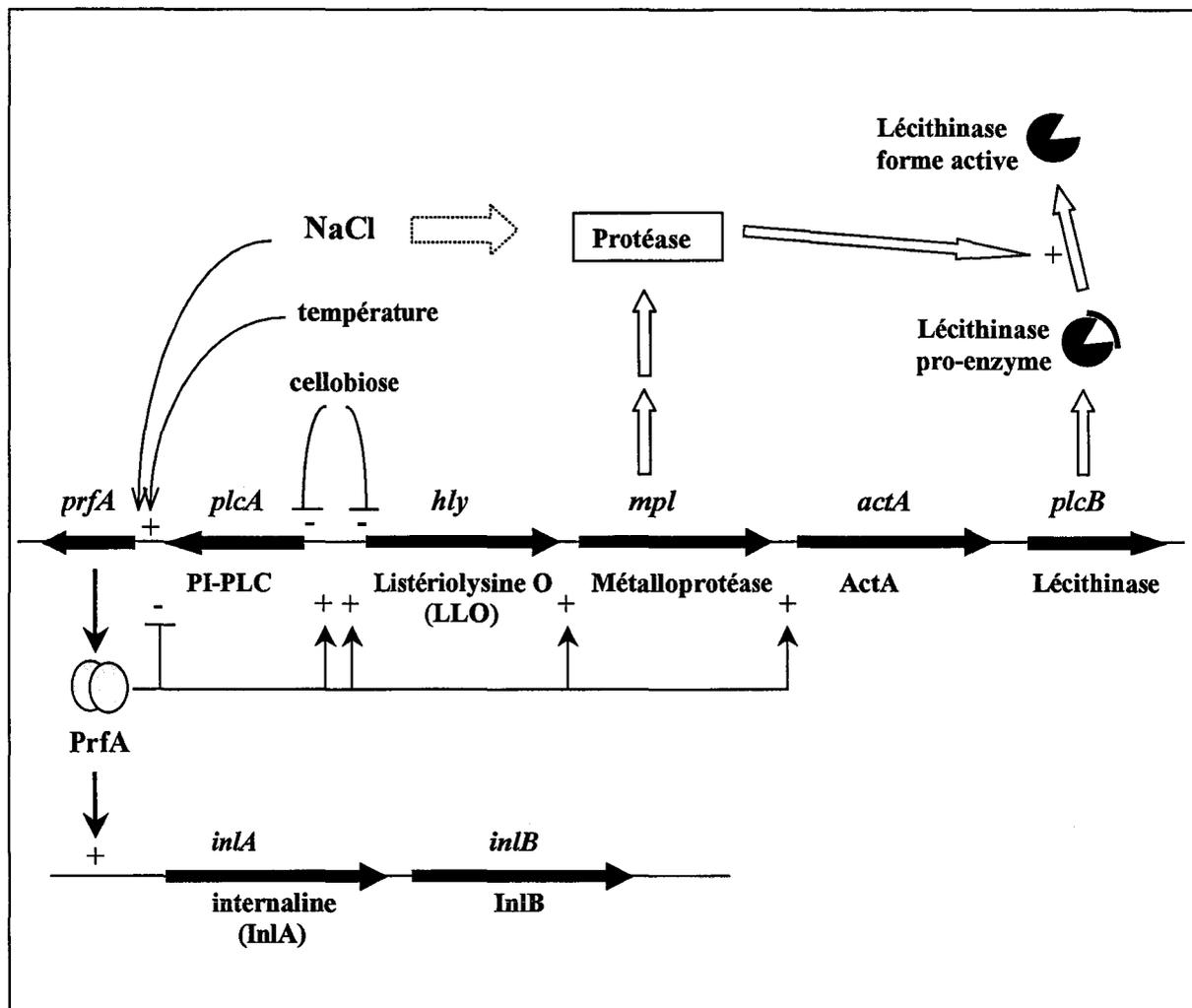


Figure 10 : Le regulon PrfA et impact des facteurs environnementaux sur la régulation. (d'après Cossart et Lecuit 1998, et Coffey *et al.* 1996).

5-4 Régulation

5-4-1 Déterminisme génétique

L'ensemble des gènes de virulence est contrôlé positivement par l'activateur transcriptionnel PrfA, une protéine de 27 kDa. Le gène codant pour cette dernière, *prfA*, se trouve au niveau de l'îlot de pathogénicité LIPI-1 en amont du gène *plcA* (figure 10). C'est actuellement le principal facteur de régulation identifié dans l'expression de la virulence. A l'origine, sa mise en évidence a été réalisée par clonage et complémentation d'un mutant n'exprimant pas la listériolysine d'où son nom : PrfA pour Positive regulatory factor of listeriolysin (sachant que le gène codant LLO est aussi appelé *hlyA*). La structure primaire de la protéine PrfA a une similarité certaine avec la protéine Crp (Crp pour cAMP receptor protein, l'activateur de la répression catabolique chez *E. coli*) et appartient donc à la famille des activateurs transcriptionnels de type Crp-Fnr (Fnr pour fumarate and nitrate reduction). En effet, un motif hélice-tour-hélice (HTH) apparaît dans la région C-terminale à la même position que dans les protéines de type Crp et a pour fonction d'interagir de façon spécifique au niveau d'un site cible d'ADN, appelé boîte PrfA, situé dans la région du promoteur et composé de séquences répétées inversées de 14 pb. Certaines de ces boîtes apparaissent comme imparfaites et seraient le reflet de différents degrés d'affinité pour la fixation de la protéine. Ainsi, une différence d'une base est observée pour les sites promoteurs des gènes *mpl*, *actA* et *inlA* alors qu'une très haute affinité semble s'opérer pour *plcA* et *hly* (figure 11).

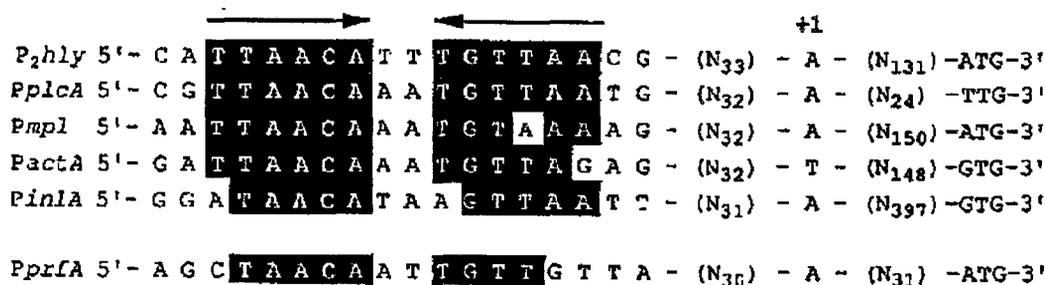


Figure 11 : Comparaison des sites potentiels de fixation de PrfA sur les sites promoteurs de différents gènes impliqués dans la virulence (Sheehan *et al.* 1995).

Les séquences répétées inversées se trouvent à l'intérieur des cadres noirs. Les points de substitution au niveau des paires de base pour les gènes *mpl* et *actA* sont visualisés et les distances entre les séquences répétées inversées et le point de début de transcription (+1) sont également indiqués. De même figurent, le codon d'initiation de chaque gène. Pour PrfA, la séquence présentée est celle du promoteur localisé juste en amont du gène *prfA*.

A partir d'un mutant *prfA**, présentant une modification dans une région similaire de celle où se produit un changement allostérique par fixation du cofacteur cAMP sur Crp, un modèle avec deux conformations spatiales a été proposé (figure 12). L'hypothèse repose sur l'existence d'un co-facteur, non identifié à ce jour, qui serait à l'origine d'une forme active et inactive de la protéine PrfA. Il permettrait à la bactérie une transition rapide entre un mode de vie en milieu extérieur et le parasitisme cellulaire. Divers travaux sur l'impact des conditions environnementales sur l'expression des gènes de virulence suggèrent également l'existence de ce co-facteur (voir paragraphe suivant). La régulation de la protéine PrfA peut être exprimée à partir de deux promoteurs : Pr_{prfA} juste en amont du gène qui correspond à une régulation négative et permet une synthèse de PrfA à un niveau basal et Pr_{plcA} , qui au contraire active positivement l'expression de PrfA (figure 12).

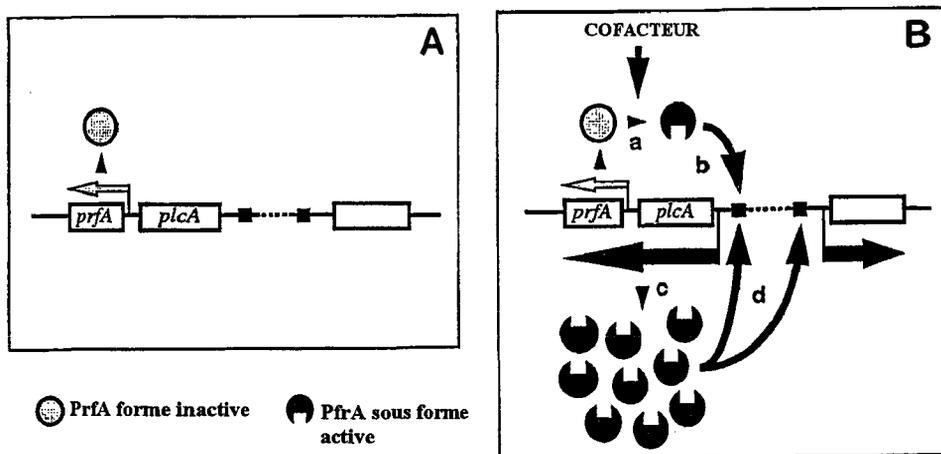


Figure 12 : Modèle du mécanisme de régulation de PrfA (d'après Vega *et al.* 1998)

Ce modèle est basé sur le principe de l'existence de 2 conformations, active et inactive avec passage d'une forme à l'autre par interaction d'un hypothétique co-facteur.

(A) En condition normale, pas de co-facteur, PrfA est synthétisé à un faible niveau à partir du promoteur situé entre *prfA* et *plcA*.

(B) Lors de la réception d'un signal environnemental, il y a augmentation de la concentration du co-facteur (a). Celui-ci en se fixant sur PrfA lui donne sa forme active et le changement de conformation augmente l'affinité de fixation sur le site (b). Il y a alors une activation de la synthèse de PrfA sous forme active (c) et activation de la transcription des gènes dépendants de PrfA (d).

L'opéron *InlA-B* n'est pas contrôlé de manière exclusive par PrfA. En effet, en amont du gène *inlA*, 4 sites promoteurs ont été identifiés mais 1 seul apparaît dépendant de PrfA. L'expression des autres protéines appartenant à la famille des internalines (InlC2, D, E, F, G H) et ayant un rôle à la périphérie de la bactérie ne sont pas sous la dépendance de PrfA (Leimeister-Wachter *et al.* 1990, Lingnau *et al.* 1995, Sheehan *et al.* 1995, Cossart *et al.* 1998, Vega *et al.* 1998, Williams *et al.* 2000, Kreft *et al.* 2001, Vazquez-Boland *et al.* 2001).

5-4-2 Conditions environnementales

Divers paramètres physico-chimiques ont été étudiés quant à leur effet sur l'expression des gènes de virulence. La plupart des travaux ont été réalisés en mesurant directement *in vitro* l'activité de certaines enzymes impliquées dans le processus infectieux et préférentiellement le niveau d'expression de l'hémolysine. Les essais *in vivo* ont été mis en oeuvre principalement à partir du modèle souris, et dans une partie des études, des tests en culture cellulaire ont été utilisés. L'ensemble des conditions expérimentales ne reflètent pas toujours les conditions réelles de la bactérie en milieu extérieur ou durant le cycle infectieux chez l'homme. Néanmoins, le signal environnemental est perçu, transmis et module l'expression de la virulence par des mécanismes inconnus à ce jour. Les facteurs identifiés à l'origine d'une modulation sont les suivants :

➤ la température.

Les gènes de virulence sous la dépendance de PrfA sont "thermorégulés" au niveau de la transcription. Cette dernière n'est effective que pour des températures supérieures à 30°C avec un optimum pour des températures retrouvées dans le corps des mammifères soit 37°C (Leimeister-Wachter *et al.* 1992). Cependant, la température à laquelle sont cultivées les bactéries au préalable n'influence pas de manière significative la pénétration du pathogène dans les cellules de type Caco-2. Lorsque la phase de multiplication a été réalisée à basse température (4°C, 25°C), *L. monocytogenes* est capable de synthétiser l'internaline. Le phénotype hémolytique est ensuite restauré rapidement au cours des premières heures de l'infection (Conte *et al.* 1994). A contrario, l'étude de Stephens *et al.* (1991) montre par des tests *in vivo* sur des souris inoculées par voie intraveineuse, que la virulence de souches cultivées à 4°C est significativement supérieure à une série témoin incubée à 30°C. Le

phénomène est cependant observé uniquement à partir d'inoculum contenant au moins 10^3 - 10^4 bactéries ce qui suggère qu'il y a un effet dépendant de la dose.

➤ **β glucosides et sucres fermentescibles.**

Park et Kroll sont les premiers à publier en 1993 la mise en évidence d'une molécule, le cellobiose, à l'origine de la répression des gènes impliqués dans la virulence. Il s'agit d'un β -glucoside dérivant de la dégradation de la cellulose, retrouvé communément chez les végétaux. Par la suite, les travaux de Renzoni *et al.* (1997), montrent que cette répression n'est pas corrélée avec le niveau de transcription de *prfA*. En conséquence, le cellobiose agirait sur le niveau de production de PrfA sous forme active et non pas sur le niveau de synthèse de la protéine. C'est le mécanisme d'activation qui serait affecté suggérant l'existence d'un co-facteur. Puis les travaux de Brehm *et al.* (1999) montrent à partir d'un panel de souches que la répression des gènes de virulence par des sucres fermentescibles est une caractéristique du phénotype sauvage de *L. monocytogenes* qui implique au moins deux mécanismes de régulation : un pourrait être associé à la répression catabolique mais n'a pas été déterminé et l'autre serait spécifique des β glucosides. Ces derniers pourraient être perçus par la bactérie par un système de transduction à deux composants dont la fonction "capteur" serait codée par les gènes organisés en opéron du locus nouvellement identifié et baptisé *bvrABC* pour β -glucoside-mediated virulence gene repression (Brehm *et al.* 1999). Cette région chromosomique de 4 kb est un fragment d'ADN inséré entre deux gènes domestiques apparaissant comme contigus chez l'espèce non pathogène *L. seeligeri*.

En milieu extérieur, *L. monocytogenes* se retrouve dans des conditions de températures inférieures à 30°C et un environnement où le cellobiose est ubiquitaire. En conséquence, durant sa vie saprophytique le pathogène n'est pas virulent mais conserve néanmoins tout son potentiel (Rapport *Listeria* Afssa, 2000).

➤ **le pH.**

La perte du pouvoir invasif semble s'opérer pour des valeurs de pH égales ou inférieures à 5, combinées ou non à une concentration en NaCl de 7,5 %. Dans ces conditions, il n'y a plus de synthèse de l'internaline et l'expression d'autres protéines de surfaces serait également supprimée (Galdiero *et al.* 1997).

➤ **concentration en NaCl .**

Des concentrations de 1,75 à 2 % en NaCl semblent augmenter significativement la production de la lécithinase. En parallèle, pour ces mêmes concentrations, un accroissement de la synthèse de la métalloprotéase est observée et suggère alors que l'effet peut résulter d'une action directe sur cette dernière enzyme dont le rôle est de cliver le précurseur de la lécithinase pour lui donner sa forme active (figure 10 p 20, Coffey *et al.* 1996). Cependant, les travaux de Dallmier *et al.* 1990 ont montré que l'addition de 3 % de NaCl dans le milieu de culture provoque également une augmentation de l'expression de la listériolysine. Ce dernier point supporte l'idée que la concentration en NaCl influence l'expression des gènes de virulence en agissant sur PrfA (Coffey *et al.* 1996).

➤ **le fer.**

Dans l'étude de Fisher *et al.* (1999) une augmentation significative de la production de LLO a été observée à partir des trois souches incubées en bouillon nutritif additionné de fer. Cependant, le profil de réponse pour chacune des souches en fonction des différentes concentrations testées suggère que l'effet dépend de la souche. Ce phénomène combiné à l'utilisation de méthodologies différentes serait à l'origine de résultats contradictoires décrits dans les travaux de Cowart *et al.* (1985). Cette dernière équipe concluait que la production de LLO est inversement proportionnelle à la concentration en fer du milieu.

➤ **composés présents dans le bouillon nutritif BHI (Brain Heart Infusion).**

Le BHI ou bouillon cœur-cerveille est communément utilisé pour la croissance *in vitro* des *L. monocytogenes*. C'est un des milieux habituellement choisi pour la plupart des tests de caractérisation d'activité enzymatique et il est reconnu pour ne pas contenir de cellobiose. En revanche, la préparation de ce milieu qui nécessite un autoclavage, génère des composés qui inhibent l'expression de LLO. Cet effet est proportionnel au développement de la couleur plus ou moins foncée qui est obtenue et serait produite suite au chauffage du mélange d'acides aminés et de glucose présents dans le milieu. Cette réaction appelée réaction de Maillard est à l'origine de la formation d'un composé dont la nature exacte n'est pas identifiée mais qui

agirait comme répresseur du regulon PrfA (Sheikh-Zeinoddin *et al.* 2000). Les résultats de cette étude peuvent être directement reliés à des travaux antérieurs réalisés par Ripio *et al.* (1996) où il avait été démontré que le BHI traité avec du charbon actif avait pour conséquence d'augmenter l'expression des facteurs de virulence LLO et lécithinase. Il est alors supposé que le mécanisme impliqué dans ce phénomène pourrait provenir d'une fixation des produits de la réaction de Maillard par le charbon actif (Sheikh-Zeinoddin *et al.* 2000).

➤ **contact avec des cellules eucaryotes.**

A partir de tests en culture cellulaire avec différentes lignées de cellules eucaryotes, il a été mis en évidence que la transcription de *prfA* était fortement induite d'une part durant la phase d'adhérence et d'autre part après entrée de la bactérie dans la cellule par un ou des composés présents dans la cellule hôte (Renzoni *et al.* 1999). Le facteur à l'origine de cette activation n'a pas encore été identifié mais la réaction peut être reproduite à partir d'extraits cellulaires. L'augmentation observée est corrélée à la transcription de *prfA* au niveau du promoteur Pr_{plcA} . Les travaux de Bubert *et al.* 1999 réalisés avec deux méthodes en parallèle, la RT-PCR et un système de gènes rapporteurs fluorescents, montrent que le niveau d'expression des gènes de virulence est plus important en macrophages qu'en cellules épithéliales. D'autre part, une transcription différentielle des gènes suivant l'étape du processus infectieux a été clairement mise en évidence et est en corrélation avec leur fonction respective. Cependant la quantité de transcrits des gènes sous le contrôle de PrfA n'est pas corrélée à la quantité de *prfA* transcrite. Ce fait suggère une interaction de composés modulant la fixation de PrfA sur ces séquences cibles durant la vie intracellulaire (soit par activation de PrfA ou expression d'autres facteurs).

➤ **conditions de stress.**

Les travaux de McCarthy (1991) à propos de l'impact du stress thermique sur l'expression de la virulence sur souris montrent que les bactéries traitées 20 min à 56°C puis injectées, expriment une virulence réduite. En revanche, celles ayant subi une phase de revivification de 14 jours à 25°C, présentent un niveau de virulence identique au lot témoin non chauffé. Ces résultats suggèrent que des *L. monocytogenes* ayant subi un stress thermique durant un procédé de fabrication alimentaire sont susceptibles de retrouver une capacité à infecter après

une période de stockage dans le produit. D'autres conditions comme le choc thermique et le stress de carence en phase stationnaire seraient à l'origine d'une induction des gènes dépendants de PrfA (Sokolovic *et al.* 1993).

Tableau 4 : Les principales épidémies de listériose rapportées dans la littérature jusqu'à 1992.

Pays et années	Historique	sérotype	références
France 1975-76	soudaine recrudescence de cas en 1975 (113 cas contre seulement 15 en 74) dans l'ouest de la France. 76 % correspondent à des infections chez la femme enceinte. Origine inconnue.	4b	Carbonnelle <i>et al.</i> 1978
Canada 1979-81 (Nova Scotia)	origine : salade de chou blanc. Les investigations ont montré que celui-ci avait été contaminé par un troupeau de moutons (2 cas de listériose parmi les animaux). Au total 41 cas humains.	4b	Schlech <i>et al.</i> 1983
USA 1983 (Massachusetts)	origine : lait pasteurisé. Pas de défaillance technique au niveau de la pasteurisation mais identification de cas de listériose chez les vaches laitières d'où un niveau de contamination particulièrement important dans le lait. 49 cas humains.	4b	Fleming <i>et al.</i> 1985
USA 1985 (Californie)	origine : fromage "mexican style". Le fromage est fabriqué à partir de lait contaminé et insuffisamment pasteurisé (volumes de lait trop important à traiter). Au total 142 cas.	4b	Linnan <i>et al.</i> 1988
Suisse 1983-87	produit incriminé : fromage Vacherin Mont d'Or fabriqué de façon saisonnière en fin d'année dans le canton de Vaud en Suisse. 2 clones épidémiques ont été identifiés (sérotype + lysotype). Chaque hiver, une recrudescence de cas était enregistrée et principalement dans la région de fabrication du fromage. Au total 122 cas. Suite à cet épisode, mise en place d'un CNR des <i>Listeria</i> .	4b	Bille J. 1990 Nocera <i>et al.</i> 1990
Danemark 1985-87	Sur l'année 1986 un pic de recrudescence de listériose a été observé durant l'été. Les investigations ont montré qu'un clone en particulier (lysotype) était majoritairement retrouvé. Celui-ci a également été identifié en 1985 et 1987. Ces résultats suggèrent une même source à l'origine des 35 cas mais celle-ci n'a pas pu être mise en évidence.	4b	Samuelsson <i>et al.</i> 1990
Grande Bretagne 1987-89	Une sensible augmentation du nombre de cas a d'abord été enregistrée entre 1983 et 1986 (de 115 à 137 cas/an). Puis, ce chiffre a presque doublé à partir de l'année suivante. Au total, 800 cas sur trois ans. Les investigations ont identifié 2 clones épidémiques (sérotype + lysotype + RFLP). Un criblage de plusieurs produits a permis d'identifier du pâté mis sur le marché en provenance du producteur Y dans lesquels les clones ont été retrouvés.	4b	McLauchlin <i>et al.</i> 1991
France 1992	279 cas attribués à la consommation de langue de porc en gelée et charcuterie à la coupe. Problème de contamination croisée à l'étal.	4b	Rebière <i>et al.</i> 1993 Jacquet <i>et al.</i> 1995

II ÉPIDÉMIOLOGIE

1- La listériose : principaux aspects chez l'homme

1-1 *Transmission par voie alimentaire*

C'est à partir des années 80 que des épidémies de listériose humaine ont commencé à être rapportées dans la littérature (tableau 4). C'est en particulier au cours de l'épisode canadien (Schlech *et al.*, 1983) que la transmission par voie alimentaire a été mise en évidence suite à l'ingestion, dans ce cas précis, de salade de chou contaminée. Ce sont surtout des produits laitiers (lait, fromages à pâte molle) qui ont été dans un premier temps incriminés confirmant ainsi le mode de contraction de la maladie (tableau 4, Fleming *et al.* 1985; Linnan *et al.* 1988; Bille 1990). Des produits de charcuterie ont été également plusieurs fois mis en cause ou suspectés (McLauchlin *et al.* 1991; Rebière *et al.* 1993; Goulet *et al.* 1998; De Valk *et al.* 2001). En France, les fromages au lait cru ont été au moins 3 fois identifiés comme étant à l'origine de cas groupés (tableau 5 p 30, Goulet *et al.* 1995, Rocourt *et al.* 1999, Goulet *et al.* 2001). Enfin, plus récemment, des aliments véhicules "plus rares" comme la truite à l'aneth ou le beurre ont été rapportés par les pays nordiques (tableau 5 p30, Ericsson *et al.* 1997, Lyytikainen *et al.* 2000).

1-2 *Formes invasives et non invasives*

En pathologie humaine, une listériose se définit classiquement par des formes cliniques dites materno-néonatales (concerne une femme enceinte, un produit d'avortement, un nouveau né mort-né ou un nouveau né de moins de un mois), des bactériémies et des formes neuro-méningées (listériose invasive). Depuis ces dernières années, plusieurs cas de gastro-entérites plus ou moins sévères ont été rapportées dans la littérature (tableau 6 p 32, Salamina *et al.* 1996, Dalton *et al.* 1997, Miettinen *et al.* 1999, Aureli *et al.* 2000, Donnelly 2001). Les catégories d'aliments incriminés apparaissent plus variées et moins "typées" que celles impliquées dans les épidémies (tableau 6, lait chocolaté, salade mixte, maïs, truite fumée, hot dog).

Tableau 5 : Les principaux épisodes de cas groupés de listériose rapportés dans la littérature après 1992

Pays et années	Historique	sérotype	références
France 1993	Environnement contaminé chez un producteur de rillettes de porc dont les produits ont été à l'origine de 38 cas.	4b	Goulet <i>et al.</i> 1998
Suède 1994-95	9 cas de listériose liés à la consommation de truite "gravad" (truite marinée à l'aneth) provenant d'un producteur identifié chez lequel le clone incriminé avait déjà été mis en évidence 6 mois plus tôt au niveau de la machine de conditionnement des produits.	4b	Ericsson <i>et al.</i> 1997
France 1995	33 cas reliés à la consommation de fromage à pâte molle "Brie" fabriqué avec du lait cru contaminé.	4b	Goulet <i>et al.</i> 1995
France 1997	2 fromages normands incriminés, Livarot et Pont l'Evêque fabriqués par un même établissement. Les investigations ont permis d'identifier la vache excrétrice à l'origine de la contamination du lait. Au total, 14 cas humains.	4b	J. Rocourt <i>et al.</i> 1999
France 1999	3 cas (\pm 3 qui sembleraient être également reliés à cet épisode). L'enquête a permis d'identifier du fromage Epoisses provenant d'un même producteur.	4b	Goulet <i>et al.</i> 2001
Finlande 1999	25 cas reliés à une contamination de beurre.	3a	Lyytikainen <i>et al.</i> 2000.
France 1999-2000	Entre octobre 99 et février 2000, le questionnaire alimentaire des premiers cas a permis de rapidement identifier des rillettes. Chez le producteur incriminé, la souche était déjà présente lors d'un contrôle de certification les mois précédents. Au total : 10 cas.	4b	De Valk <i>et al.</i> 2000a De Valk <i>et al.</i> 2001
France 1999-2000	Entre nov 99 et fév 2000, une épidémie consécutive à celle décrite ci-dessus est survenue. Au total, 32 cas ont été reliés à cet épisode pour lequel l'enquête n'a pas permis de retrouver la souche incriminée dans l'aliment. Toutefois, sur des arguments épidémiologiques, la langue de porc en gelée semble avoir été le véhicule.	4b	De Valk <i>et al.</i> 2000b De Valk <i>et al.</i> 2001
USA 2000-2001 Caroline du Nord	Fromage "mexican style" fabriqué avec du lait cru à l'origine de 12 cas concernant des immigrants mexicains.	?	CDC, 2001a
France 2001-2002	6 cas groupés de listérioses survenus entre le 2 octobre et le 4 janvier dus à des souches identiques selon les techniques de typage mises en œuvre par le CNR. Au 25/01/2002, la source alimentaire n'est pas identifiée.	?	InVS, 2002.

De plus, c'est à ce jour, le seul type de listériose rapporté qui soit associé à la consommation de poisson fumé (Miettinen *et al.* 1999). Alors que la forme "classique" de la maladie se manifeste majoritairement chez des personnes "à risques" (femmes enceintes, personnes âgées, personnes dont le système immunitaire est altéré), les gastro-entérites concernent des sujets n'ayant pas de prédispositions particulières du fait de leur état de santé, et n'appartenant pas à une classe d'âge particulière apparent (Hof, 2001). Elles se distinguent également par des niveaux de contamination relativement importants (1×10^9 ufc/ml et $1,9 \times 10^5$ ufc/g) dans les produits incriminés (tableau 6 p 32, Dalton *et al.* 1997; Miettinen *et al.* 1999). L'épisode américain 98-99 (Swaminathan *et al.* 2001) représenterait un cas d'exception : les symptômes semblent avoir été ceux d'une listériose classique (15 morts et 6 fausses couches) et également ceux d'une gastro-entérite particulièrement sévère (Donnelly 2001). Les analyses ont révélé une contamination très faible de 0,3 ufc/g dans les produits incriminés traduisant pour certains, un niveau de virulence particulièrement important chez le clone isolé (Donnelly 2001). Très récemment, Hof (2001) fait un point sur ces listérioses à gastro-entérites et souligne dans sa conclusion le fait qu'actuellement *L. monocytogenes* est d'une part difficile à détecter dans les selles et d'autre part non recherchée "en routine" pour ce type de tableau clinique. En conséquence, peu de données sont encore disponibles sur ces listérioses "atypiques" mais l'auteur semble convaincu qu'elles représentent une part importante dans la manifestation clinique de la maladie.

1-3 Sérotypes impliqués

Le sérotypage a été la première méthode de typage mise en oeuvre et la plus universellement utilisée. Aussi, beaucoup de données épidémiologiques lui sont reliées et elle est ainsi devenue incontournable car informative dans une certaine mesure. En effet, 95% des listérioses humaines sont provoquées par seulement trois sérotypes, à savoir, les sérotypes 4b, 1/2a et 1/2b (Rocourt 1996, Larpent 2000). Le sérotype 4b a toujours été à l'origine des épidémies majeures (tableaux 4 p 28 et 5) et est le sérotype prédominant dans les cas sporadiques (tableau 6 p 32). Il n'est pourtant que faiblement isolé dans l'environnement des sites de transformation et dans les produits alimentaires en représentant seulement 2 à 8% des isolats récoltés quelque soit la filière examinée (Chasseignaux 1999, Dauphin *et al.* 2001, Giovannacci *et al.* 1999, Kerouanton-Le-Gall 1999). Il semble cependant être plus fréquemment isolé à partir de prélèvements de lait cru (Kerouanton-Le-Gall 1999). Les sérotypes 1/2 sont incriminés dans les cas sporadiques de façon significative et ont été à l'origine de listérioses à gastro-entérites (tableau 6 p 32).

Tableau 6 : Cas de gastro-entérites provoquées par *L. monocytogenes* rapportés dans la littérature.

Pays et années	Historique	sérotype	références
Italie 1993	39 personnes impliquées présentes à un même dîner. Il semblerait que ce soit une salade "composée" à l'origine. Les analyses n'ont pas permis d'identifier exactement quel ingrédient était initialement contaminé.	1/2b	Salamina <i>et al.</i> 1996
USA 1994 (Illinois)	Au cours d'un pique-nique, 45 personnes ont été malades suite à l'ingestion de lait chocolaté pasteurisé. Celui-ci semble avoir été contaminé après le traitement thermique et n'avait pas été conservé dans des conditions réfrigérées. Les analyses ont révélé qu'il y avait autour de 1×10^9 cfu/ml.	1/2b	Dalton <i>et al.</i> 1997
Italie 1997	1566 personnes d'une école primaire (enfants et adultes) et d'une université voisine ont été malades suite à la consommation d'une salade de thon/maïs confectionnée par un même traiteur. Vraisemblablement le maïs avait été contaminé au moment de l'ouverture des boîtes. Un temps d'attente trop long à température ambiante a pu être à l'origine d'une multiplication de la bactérie dans le maïs.	4b	Aureli <i>et al.</i> 2000
Finlande 1998	5 cas (au cours d'un même repas) liés à la consommation de truite fumée. Les échantillons analysés sont contaminés à hauteur de $1,9 \times 10^5$ cfu/g. Le problème semble provenir d'une mauvaise température de conservation (10°C).	1/2a	Miettinen <i>et al.</i> 1999
USA 98-99	Identification grâce au réseau PulseNet de l'émergence d'un clone et de son l'origine. Epidémie attribuée à la consommation de hot dog et sandwichs fabriqués par une même usine dans le Michigan . 101 cas ont été enregistrés. Très faible niveau de contamination détecté dans les produits: 0,3 cfu/g. 15 personnes décédées.	4b	Swaminathan <i>et al.</i> 2001 Donnelly 2001

En France, d'après les données du CNR (Centre National de Référence des *Listeria*) sur les souches cliniques typées de 1987 à 1999, la répartition de ces trois sérotypes apparaît assez stable d'une année sur l'autre avec en moyenne : 45-50% de souches 4b, 30 % de 1/2a et environ 20 % de 1/2b (tableau 7 et figure 13). Cette distribution était jusqu'à présent sensiblement la même pour l'ensemble des pays industrialisés (USA, 43 % 4b, 35 % 1/2b, 20 % 1/2a, Slutsker *et al.* 1999). Cependant, la Suède et le Danemark observent depuis ces deux dernières années que les sérotypes 1/2 deviennent majoritairement impliqués dans les listérioses humaines avec des scores élevés avoisinant les 65 % des souches isolées (Gerner-Smidt *et al.* 2001, Tham *et al.* 2001). Une consommation en hausse de poissons marinés et fumés, majoritairement contaminés par ces sérotypes serait à l'origine de cette recrudescence de cas (Tham *et al.* 2001). Cependant aucun clone en particulier n'a été identifié à ce jour et aucun lien direct n'a pu véritablement être mis en évidence pour étayer cette hypothèse.

Tableau 7 : Exemples de répartition des sérotypes impliqués dans les cas sporadiques en France

Année	Nbre total de cas	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	4b	autres
1997	227	72	39	6	1	1	105	3
1999	244	60	45	11	1	2	125	

Extrait du BEH N°34/2001 et Bulletin épidémi. Annuel des maladies infectieuses en France 1997, InVS

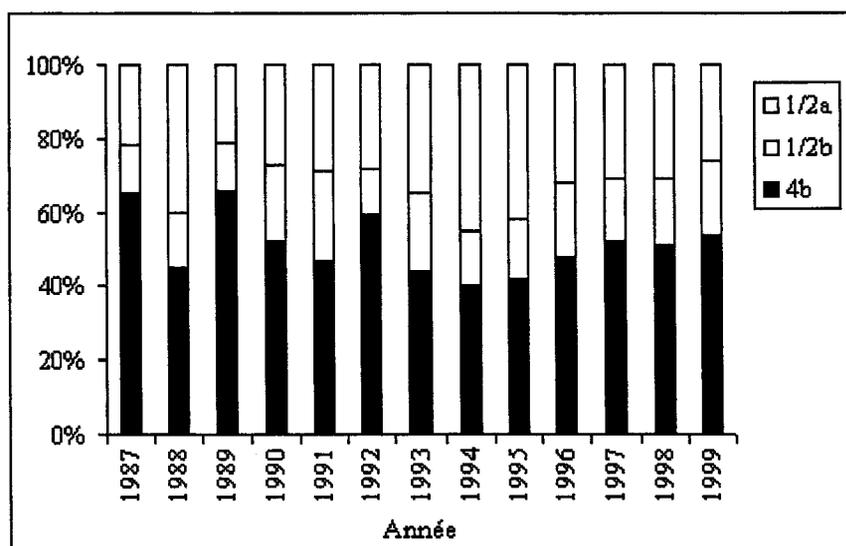


Figure 13 : Pourcentage annuel de souches des principaux sérovars à l'origine des cas de listériose recensés par le CNR en France métropolitaine depuis 1987. Extrait du BEH N°34/2001

1-4 *Système de surveillance français*

En France, la listériose est devenue une maladie à déclaration obligatoire au cours de l'année 1998 (Goulet *et al.* 2001). Le système de surveillance repose sur la récolte d'une part d'informations au moyen de la fiche DO et du questionnaire alimentaire, et d'autre part, des souches isolées des patients. En premier lieu, la DDASS (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales) est chargée de recueillir et de vérifier si les documents sont dûment complétés, puis elle les transmet à l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) où ils seront analysés. En parallèle, la DDASS s'assure que les souches de *L. monocytogenes* sont bien transmises au Centre National de Référence des *Listeria* (CNR, laboratoire des *Listeria* de l'Institut Pasteur), où elles sont centralisées et caractérisées. Lorsque le CNR détecte au cours du temps l'émergence de souches ayant les mêmes caractéristiques, l'InVS, suite à son analyse, déclenche ou non la phase d'alerte. Une "cellule *Listeria*" composée de représentants de la DGS, l'InVS, de la DGAL, de la DGCCRF et du CNR décident alors des actions et mesures à mettre en œuvre pour identifier l'aliment véhicule et limiter le nombre de cas. Avant la mise en place de ce système, l'envoi de souches cliniques au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Nantes de 1982 à 1992 puis à l'Institut Pasteur reposait sur le volontariat. De ce fait, l'incidence de la listériose humaine ne pouvait pas jusqu'alors être définie avec précision sachant que la majeure partie des cas sont sporadiques et donc dispersés. Une étude récente a pourtant réussi à donner une estimation sur les tendances annuelles pour la période 1987-1997 (Goulet *et al.* 2001). Ce travail a pu être réalisé en grande partie grâce aux données informatisées depuis 1987 du réseau EPIBAC qui permet en France la surveillance des infections invasives communautaires dont celles à *L. monocytogenes*. Ce système est coordonné par le Réseau National de la Santé et fonctionne sur une participation volontaire des laboratoires de microbiologie. Seules les listerioses invasives y sont donc enregistrées, c'est à dire celles ayant donné lieu à un isolement de *L. monocytogenes* à partir du sang ou du liquide céphalo-rachidien (LCR) représentant environ 80 % de la totalité des listerioses identifiées (Goulet *et al.* 2001). En croisant au moins trois sources de données (CNR, EPIBAC et 2 enquêtes nationales), l'incidence au cours de ces dix années a diminué de 68 % et est estimée pour 1997 à 5,4 cas par million. Le nombre de nouveaux cas sporadiques annuel a été divisé par 3, celui concernant les moins de 65 ans en bonne santé par 8 et le nombre de cas associés à des grossesses par 7 (Goulet, site <http://www.invs.sante.fr/publications/journees/2/goulet/index.html>). Ces résultats spectaculaires sont attribués aux mesures de prévention qui ont été prises en France au cours de ces années

: mise en place de plans de surveillance de la contamination par *L. monocytogenes* des aliments par la DGCCRF et la DGAL (BEH 45/1996); renforcement des règles d'hygiène à la distribution, notamment après l'identification de contaminations croisées à l'étal en 1992, (tableau 4 p 28); campagnes de communication sur les personnes à risques par le Ministère de la Santé. Parallèlement, d'autres événements ont également contribué à cette réduction significative : le concept de la méthode HACCP a fait son apparition en France vers les années 1990-92 chez les industriels de l'agro-alimentaire, et figure par la suite dans la directive 93/43/CEE du conseil des communautés européennes sur "l'hygiène des denrées alimentaires". Cette approche nouvelle qui responsabilise les professionnels leur a permis d'identifier et de maîtriser les points de leur activité pouvant avoir une incidence sur la sécurité des aliments. Enfin, rentrent également en ligne de compte sur cette période 1987-1997, le développement de méthodes en microbiologie alimentaire pour la détection de *L. monocytogenes*, et l'apparition de techniques de caractérisation à l'échelle moléculaire, qui représentent incontestablement des outils indispensables pour l'appréciation et la gestion du risque sanitaire. En effet, la formulation du bouillon de Fraser a été premièrement décrite en 1988 (Fraser *et al.* 1988) et la première norme AFNOR expérimentale (NF V08-055) sur la recherche des *L. monocytogenes* dans les aliments a été publiée en décembre 1993. En parallèle, jusqu'en 1992, bien que la transmission par voie alimentaire ait été mise en évidence dans la plupart des cas, les investigations se sont souvent échelonnées sur plusieurs années (jusqu'à 4 ans) pour identifier ou suspecter les produits incriminés (tableau 4 p 28). D'un point de vue technique, il est apparu nécessaire de disposer de méthodes discriminantes permettant de détecter l'émergence de clones et de tracer leurs origines. Avec l'extension des méthodes nées de la biologie moléculaire, les enquêtes épidémiologiques ont véritablement évolué en performance surtout en terme de rapidité dans l'identification des aliments véhicules de l'infection. C'est en partie pourquoi, il est possible de distinguer deux périodes pour lesquelles il est plus approprié de parler d'une part d'épidémies ou plus exactement d'anadémies de listérioses jusqu'en 1992 (en faisant référence au nombre important de cas dans chacun des épisodes), et d'autre part de cas groupés de listérioses à partir de 1993. En effet, le nombre de cas humains a diminué de façon significative pour l'ensemble des épisodes décrits après 1992 et outre l'impact des mesures de prévention décrites dans le paragraphe précédent, ce fait coïncide avec la mise en œuvre des méthodes d'empreintes génétiques (tableau 8 p 36). Ainsi, au fil des années, la définition d'une souche épidémique a évolué en fonction des techniques appliquées. Dans l'ordre chronologique de leur apparition, les méthodes de typage ayant été les plus utilisées sont au nombre de 4 : le sérotypage, le

lysotypage, l'analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes (MEE, Multilocus Enzyme Electrophoresis) et la macrorestriction (tableau 8 et paragraphe systèmes de typage).

Tableau 8 : Mise en œuvre des méthodes de typages lors des investigations sur des cas de listériose. (extrait du rapport InVS, De Valk *et al.* 2000b, modifié et complété)

Pays	Année	Nb. cas	Véhicule	Méthodes ¹			
				Sérotypage	lysotypage	PFGE ²	Autres
Canada	1981	41	salade de chou	+	+	-	-
USA	1983	49	lait	+	+	-	-
USA	1985	< 142	fromage	+	+	-	-
Suisse	1983-87	122	fromage	+	+	-	-
Danemark	1985-87	35	non identifié	+	+	-	-
RU	1987-89	~300	paté	+	+	-	profils d'ADN (microrestriction)
USA	1989	10	crevettes	+	-	-	MEE ³
Australie	1990	9	paté	+	+	-	profils d'ADN (microrestriction)
France	1992	279	langue de porc	+	+	+	-
Nv. Zél.	1992	3	moules	+	-	+	-
Norvège	1992	8	produit carné	+	-	-	MEE
France	1993	39	rillettes	+	+	+	-
Italie	1993	18	salade de riz	+	+	-	MEE
USA	1994	45	lait chocolaté	+	-	+	MEE, ribotypie ⁴
Suède	1994-95	9	truite « gravad »	+	+	+	-
France	1995	33	fromage	+	+	+	-
France	1997	14	fromage	+	+	+	-
Italie	1997	1 594	maïs en salade	+	+	+	RAPD
Finlande	1998	5	truite fumée	+	-	+	-
France	1999	3	fromage	+	+	+	-
France	1999-2000	10	rillettes	+	+	+	-
France	1999-2000	32	langue de porc	+	-	+	-
USA	1998-99	100	hot dog	+	-	+	ribotypie
Finlande	1999	18	beurre	+	-	+	-

¹ Il n'est pas précisé dans toutes les publications si toutes les méthodes ont été utilisées durant les investigations conduisant à l'identification du véhicule alimentaire ou si certaines ont été utilisées pour caractériser ultérieurement le clone épidémique.

² Profils de macrorestriction d'ADN (PFGE : pulsed field gel electrophoresis)

³ Multilocus Enzyme Analysis (méthode moins discriminante que le PFGE)

⁴ Ribotypie : méthode moins discriminante que le PFGE.

1-5 La position de l'Afssa

Bien que le nombre d'alertes médiatisées paraît assez important chaque année et donne aux consommateurs le sentiment d'une fréquence plus grande des cas, la listériose demeure une maladie rare. Elle reste cependant de préoccupation majeure en raison d'une part, de la gravité des symptômes engendrés (mortalité estimée autour de 30 % et des séquelles neurologiques fréquentes), et d'autre part, de l'ampleur des coûts entraînés (retrait du produit de la vente, arrêts maladie, hospitalisations, conséquences économiques pour les entreprises et les filières agro-alimentaires impliquées). Dans ce contexte, l'Afssa a été saisie en 1999 par les ministres chargés de la Santé, de l'Agriculture et de la Consommation, d'une mission « d'actualisation

sur l'évaluation du risque sanitaire lié à *L. monocytogenes* au stade de la distribution commerciale ». Dans un premier temps un rapport a été rédigé en 2000 par la commission scientifique mise en place, et correspond à un document de niveau scientifique faisant le point sur l'ensemble des données actuelles en épidémiologie et en microbiologie prévisionnelle (Rapport *Listeria* Afssa, 2000). Suite à ce premier travail, un axe prioritaire concernant la classification des aliments selon leur sensibilité à la croissance de *L. monocytogenes* a donné lieu à un avis de l'Agence rendu le 29 octobre 2001 (Anonyme, 2002). Il est proposé un classement en trois catégories :

- aliments à risque maîtrisé, exempts du pathogène au stade de l'achat et de la consommation,
- aliments sûrs, dont les caractéristiques ne permettent pas la croissance de *L. monocytogenes*,
- aliments sensibles, dans lesquels la croissance est possible et peut représenter un risque.

La réalisation de tests de croissance ("challenge tests") dans les aliments est également proposée dans cet avis comme outil d'appréciation du risque pour les instances d'expertise, les services de contrôle et les professionnels. Des lignes directrices sont exposées pour préciser le champ d'application de ces tests et les conditions techniques de leur mise en œuvre (Anonyme, 2002).

2- Risque sanitaire dans le poisson fumé et réglementation

2-1 Production en France

Avant les années 70, en France et notamment à Boulogne sur mer, l'âge d'or de la saurisserie était presque exclusivement dédié au hareng et avait une vocation très populaire. Par la suite, le saumon a bouleversé la profession en apportant une note scandinave qui a connu un vif succès auprès des Français. L'engouement a été tel, qu'actuellement le saumon fumé représente 70 % des produits de la mer fumés, consommés en France. Ces dernières années, le marché pour ce produit a toujours été en progression avec une croissance de 7% en 1998, toujours en évolution en 1999. Avec une production de 19 000 tonnes de saumon fumé en 1999, la France en est même devenue le premier producteur mondial. Devant un tel succès, les professionnels se diversifient et travaillent d'autres espèces de poisson comme notamment l'espadon, l'églefin, le maquereau, le flétan mais c'est surtout la truite fumée en volume et en chiffre d'affaire qui affiche une progression régulière. Le hareng reste cependant toujours en

deuxième position en terme de volume à la grande distribution. (Rapports Ofimer, 1998, 1999)

2-2 Prévalence de *L. monocytogenes* et voies de contamination

Suite à l'épidémie française de listériose survenue en 1992, la DGCCRF en concertation avec la DGAL a mis en place un plan de surveillance des différentes catégories de denrées alimentaires vis-à-vis du risque présenté par *L. monocytogenes*. Une prévalence relativement importante évaluée à 16 % (BEH n°45/1996) dans les poissons fumés pour la période 1993-1994 a conduit à désigner ces produits comme aliments à risques et a fait l'objet de campagnes d'informations auprès des consommateurs dits sensibles (BEH n°23/1995). Cependant, bien que les produits de la mer représentent le second taux d'incidence en *L. monocytogenes* derrière les produits carnés, la ventilation des résultats par niveaux de contamination fait apparaître une majorité de produits avec des dénombrements inférieurs à 100 ufc/g. De façon très sporadique, des valeurs supérieures à 1000 ufc/g ont néanmoins été détectées dans les poissons fumés. Ce plan de surveillance est reconduit d'une année sur l'autre et le bilan publié en 1998 pour la période 1993-1996 fait état d'une contamination globale de 16 % dans les poissons fumés (Anonyme, 1998a). L'opération Alimentation « fêtes de fin d'année » réalisée en 1997 (DGCCRF et DGAL) confirme cette tendance à la stabilité en terme de prévalence avec un score de 14 % en *L. monocytogenes* dans ce type de produit (Anonyme, 1998b). A l'étranger, pour des périodes similaires, entre 1991 et 1995, la contamination dans les poissons fumés à froid fabriqués dans divers pays (U.S.A., Norvège, Royaume Uni, Canada...) est également estimée pour des valeurs du même ordre avec 17,5 % (Heinitz *et al.* 1998). Ces chiffres préoccupants ont conduit les équipes scientifiques et les organismes en charge des questions sanitaires en hygiène alimentaire à s'investir dans des études portant notamment sur l'importance de facteurs tels que la contamination initiale, le procédé de fabrication, l'échelle temps-température de conservation du produit, le mode de conditionnement et les voies de contamination. Ainsi, entre 1996 et 1999, un programme Européen FAIR portant sur la qualité et la sécurité des poissons fumés à froid précise, à partir des 4 producteurs sauteurs saurisseurs français participants, que la prévalence en *L. monocytogenes* oscille en fait entre 10 et 65 % et dépend fortement des sites de production (Gay, 1998 et 1999). Les variations observées sont directement liées aux pratiques de fabrication et aux opérations de nettoyage et de désinfection du matériel et des locaux. Néanmoins, parmi les prélèvements réalisés, 12 à 30 % des matières premières étaient contaminées. Une étude américaine (Eklund *et al.*) publiée en 1995 a identifié la source

initiale de contamination comme étant la surface externe du poisson cru de départ surtout lorsque celle-ci comporte des lésions. Ensuite, toutes les opérations de filetage, saurissage, rinçage... sont l'occasion pour l'équipement, le personnel et d'autres surfaces de contact de servir de sources de contamination secondaires. A contrario, Rorvik (1995) n'a pas détecté de *L. monocytogenes* dans les prélèvements de saumon à l'abattoir alors que 7 % des prélèvements de cet environnement étaient positifs. *L. monocytogenes* était ensuite fréquemment isolée à partir de l'atelier de fumaison aussi bien au niveau de l'environnement que des filets de poissons. Dans cette dernière étude, les isolats récoltés ont été caractérisés par la technique Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) sur la base de 21 enzymes analysées. Les résultats de ce typage indiquent l'existence d'un type prédominant de *L. monocytogenes* retrouvé majoritairement dans l'environnement des ateliers de fumaison et correspondant au seul type isolé à partir de tous les produits finis. En conclusion, l'auteur suggère que le principal réservoir de contamination se situe au niveau de l'environnement des ateliers et non pas au niveau de la matière première pour l'industriel considéré. La technique MEE, qui mesure les variations alléliques des enzymes, est une méthode indirecte de génotypage offrant la possibilité d'évaluer la distance génétique entre les types de façon significative. Dans le cas présent, cette analyse révèle que le clone ayant colonisé les ateliers est extrêmement proche d'une souche issue d'un prélèvement d'eau de mer. Ceci suggère qu'il existe néanmoins un lien avec une contamination d'origine marine. A ce sujet, la Commission du Codex Alimentarius (CAC), en charge de l'établissement de normes internationales relatives aux denrées alimentaires, précise dans son rapport de session de juin 2000 (Anonyme, 2001b), que le niveau de contamination microbiologique des poissons au moment de leur capture dépend directement de la qualité de l'eau. La CAC distingue en conséquence, deux groupes de bactéries d'intérêt en santé humaine et classe *L. monocytogenes* parmi les bactéries dites indigènes, normalement présentes dans l'environnement aquatique, au même titre que les *Vibrio* spp, *C. botulinum* et *Aeromonas hydrophyla* et marque ainsi la différence avec les entérobactéries dont la présence suggère une pollution accidentelle du milieu. En d'autres termes, il est communément admis que la matière première puisse véhiculer *L. monocytogenes*, toutefois, cette contamination de surface (généralement sur la peau des poissons) est de très faible niveau et ne peut pas expliquer à elle seule la prévalence importante retrouvée dans les produits transformés.

Avec l'avènement de nouvelles techniques de biologie moléculaire, la plupart des enquêtes épidémiologiques utilisent aujourd'hui des méthodes d'empreintes génétiques pour des études de traçabilité ou dans un but d'épidémio-surveillance (Struelens *et al.* 1998, Chasseignaux *et*

al.2001, Giovannacci *et al.* 1999). Leur mise en œuvre pour l'étude des voies de contamination des poissons fumés par *L. monocytogenes* n'est que très récente et date de 1999 (Autio *et al.* 1999, Dauphin 1999, Johansson *et al.* 1999). Les résultats de ces travaux démontrent clairement que la contamination environnementale des ateliers est la principale voie de dissémination de *L. monocytogenes* dans les produits finis. Les auteurs insistent sur la possibilité de limiter une telle contamination par l'application de procédures de nettoyage et désinfection appropriées. L'origine de ces « souches résidentes » dans les ateliers n'est cependant pas encore élucidée. Le lien avec la matière première peut difficilement être fait essentiellement par manque d'éléments de comparaison : très peu d'isolats sont en effet récoltés à partir du poisson cru. En 1997, Embarek *et al.* n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence de *L. monocytogenes* sur les saumons d'élevage au niveau de l'abattoir. Leurs résultats suggèrent que les milieux d'enrichissement classiquement utilisés n'ont pas été optimisés pour l'analyse des produits de la mer : beaucoup de « faux positifs », se matérialisant par un virage précoce de l'indicateur de présomption incorporé dans les milieux de culture (lié au caractère esculine +), témoignent de l'existence d'une flore de compétition très importante, non inhibée par les agents sélectifs choisis et pouvant masquer la présence éventuelle de *Listeria*. Cette dernière peut de surcroît, se trouver dans un état physiologique viable non cultivable par exemple à la suite d'un séjour en eau de mer (Bremer *et al.* 1998). Ces difficultés analytiques sont à prendre en considération pour l'analyse critique des investigations déjà réalisées. Ainsi les études portant sur les voies de contamination du saumon fumé au cours de sa fabrication n'ont pas encore permis d'apporter de véritables réponses sur l'origine de *Listeria* dans le produit final.

2-3 Risque sanitaire et position des aliments dans la classification de l'Afssa

Ces dernières années, les aliments incriminés lors des épisodes épidémiques concernent principalement les produits de la charcuterie avec notamment les rillettes et la langue de porc en gelée ainsi que les fromages à pâte molle (Brie, Pont l'Evêque, Livarot, Epoisses) (De valk *et al.* 2000a). Les produits les plus sensibles sont ceux qui permettent la croissance de *Listeria*, qui ont une durée de vie longue et qui peuvent être consommés en l'état. Les poissons fumés remplissent ces trois conditions en particulier ceux dont le procédé de fabrication ne comporte pas de traitement thermique (fumage à froid n'excédant pas 28°C). Les deux principales espèces de poissons fumés en France, à savoir le saumon et le hareng, sont fabriquées ainsi. La survie de *L. monocytogenes* au procédé de salage-séchage-fumage a

été démontrée expérimentalement à partir des travaux de Guyer et Jemmi (1991) en utilisant des lots de matière première artificiellement contaminés. Les niveaux de contamination enregistrés au cours des différentes étapes de transformation n'avaient pas présenté de variations significatives. En revanche, une croissance effective du pathogène durant le stockage des produits finis à +4°C ou +10 °C avait été mise en évidence avec une augmentation globale pouvant atteindre $10^{4,5}$ en 30 jours (avec un niveau final de 10^7 ufc/g). Les travaux de Rorvik *et al.* (1991) confirment ces possibilités de croissance à partir de très faibles inoculums (6 ufc/g et 600 ufc/g) en matrices fumées stockées à +4°C. Il semblerait que le taux de croissance puisse dépendre de la souche : les souches isolées à l'origine dans un poisson fumé naturellement contaminé semblent présenter une dynamique de croissance supérieure à des souches dites de collection (ou souches de référence) (Jemmi 1993). L'impact de la température de conservation apparaît évident dans les travaux de Rosso *et al.* 1996 qui démontrent expérimentalement une différence significative entre un stockage à +4°C et +8°C : la durée de vie du produit diminue en théorie de 80 % lorsqu'il est stocké à +8°C. En revanche, Cortesi *et al.* (1997) à partir de produits naturellement contaminés et conservés en parallèle à +2°C et +10°C, n'observent pas de différence ni en terme de prévalence (20 % dans les deux séries), ni sur les niveaux de contaminations qui restent faibles avec quelques exceptions détectées seulement après 30 et 40 jours à +10°C. Les facteurs favorisant la croissance sont encore mal définis et le rôle des flores associées restent à déterminer. L'épisode récent de gastro-entérite en Finlande (Miettinen *et al.* 1999), déclaré à la suite de la consommation de truites fumées contaminées par *L. monocytogenes* (sérovary 1/2a) démontre que le risque de croissance est bien réel dans la mesure où les produits présentaient lors de cet épisode, des niveaux de contamination de $1,9 \cdot 10^5$ ufc/g suite à un stockage à une température de 10°C.

Avec l'avis de l'Afssa (Anonyme, 2002), les poissons fumés, ne recevant pas de traitement listéricide à proprement parler, présentant des conditions possibles de croissance du pathogène au cours de la conservation, consommés en l'état et désignés jusqu'à présent comme aliments à risque en raison d'une prévalence estimée à 10-20 %, restent classés dans la catégorie des aliments présentant un risque sanitaire sous la nouvelle dénomination « aliments sensibles ».

Néanmoins, il n'existe pas à ce jour de cas officiel de listériose relié à la consommation de poissons fumés. Des études très récentes menées dans les pays nordiques Européens (Ericsson *et al.* 1997, Loncaveric *et al.* 1998) établissent cependant un possible lien entre du poisson

fumé et des cas humains. En 1997, Ericsson *et al.* ont décrit une épidémie de listériose comprenant 9 cas dans la même province de Suède dont l'origine était très probablement la consommation de truite "gravad" (truite marinée à l'aneth). Les analyses ont révélé la présence d'un pulsotype (macrorestriction *ApaI*, *SmaI*, *AscI*) appartenant au sérotype 4b isolé à la fois à partir du sang ou du liquide céphalo-rachidien des malades et retrouvé dans les prélèvements de truites marinées consommées par ces personnes. Cette souche a été retrouvée chez l'industriel fabriquant également de la truite fumée et elle avait déjà été détectée 6 mois auparavant. En 1998, une étude rétrospective suédoise (Loncaveric *et al.* 1998) visant à comparer les isolats de *L. monocytogenes* issus de cas cliniques et de poissons fumés a identifié un même pulsotype présent dans ces deux bases de données. Les investigations révèlent la présence de cette souche durant 4 ans chez l'industriel émetteur des truites fumées contaminées en question.

La présence de *L. monocytogenes* dans les poissons fumés représente donc un risque potentiel pour la santé publique et doit faire l'objet d'une attention particulière.

2-4 Classification dans la Réglementation Française

En se référant au texte en vigueur, dans la note de service DGAL/SDHA/N98/N°8088 (Anonyme, 1998c), les poissons fumés sont classés dans la catégorie C1: produits ayant subi un traitement insuffisant pour les assainir, consommés crus ou après cuisson. Le contrôle au niveau de la production consiste alors à analyser au minimum 5 unités de produit, avec comme critère vis-à-vis de *L. monocytogenes*, absence dans 25 g (dans les 5 prélèvements). Toutefois une tolérance est admise dans un cas très précis : l'industriel doit être en possession de tests dits de vieillissement, montrant que le produit en question après conservation respecte le critère à la distribution, soit des dénombrements inférieurs à 100 ufc/g pour les 5 unités en test. D'un point de vue sanitaire, la valeur de 100 ufc/g a été à l'origine proposé par le CSHPF en 1992 sur la base des données épidémiologiques existantes démontrant qu'aucun aliment présentant une contamination par *L. monocytogenes* inférieure à 100 ufc/g n'avait été à l'origine de bouffées épidémiques. Cependant, les méthodes de dénombrement ne sont actuellement statistiquement fiables qu'à partir de niveaux de contaminations de cet ordre.

De même que la détermination d'une date limite de consommation (DLC) est à la charge de l'industriel, la réalisation du test de vieillissement est également sous son entière responsabilité. Pour cela, le producteur n'est pas tenu de respecter une directive particulière définissant par exemple la combinaison des couples temps-température à appliquer. De même,

il n'est pas indiqué d'un point de vue légal, la fréquence à laquelle ces tests doivent être mis en œuvre ni leur durée de validité (par exemple, une fois par an ou 1 fois par mois...). Ce manque d'harmonisation complique la tâche des organismes de contrôle car pour un même type de produit, les résultats entre les divers établissements sont difficilement comparables dans la mesure où chacun est libre d'appliquer un protocole de conservation de son choix. Il existe néanmoins des lignes directrices publiées dans les normes Afnor suivantes : NF V 45-065 (1997) relative au saumon fumé et NF V 45-067 (1996) relative aux filets de hareng fumé. Les paragraphes concernant les conditions expérimentales de validation de la durée de vie du produit (DLC) conseillent d'appliquer un protocole en deux étapes : dans un premier temps les produits sont conservés à + 4°C pendant les 2/3 de la durée de vie estimée puis ils sont stockés à + 8°C pendant le dernier tiers de temps restant. Une note en bas de page indique que suivant la sensibilité des incubateurs, il conviendra de régler à +3°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) et +7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Dans la pratique cette dernière recommandation génère des disparités importantes au niveau des laboratoires, certains réalisent les tests à 3 et 7°C, d'autres à 4 et 8°C et en terme d'appréciation du risque il n'est pas certain que ces deux combinaisons de températures aboutissent aux mêmes conclusions.

III LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE CARACTERISATION DES ISOLATS

1- Caractérisation phénotypique

1-1 *Le sérotypage*

Le sérotypage est une méthode de typage basée sur la détection de 15 antigènes somatiques (I à XV) et 5 antigènes flagellaires (A à E), présenté dans le paragraphe 4 (Structure antigénique, voir tableau 3 p 12). La technique en elle-même est longue et fastidieuse. Elle consiste à réaliser des tests d'agglutination sur lames (antigène O) ou en tubes (antigène H) avec des sérums spécifiques commercialisés. Ces derniers sont obtenus par hyperimmunisation de lapins en bonne santé avec des cellules totales inactivées par la chaleur ou des flagelles. Une culture fraîche de *L. monocytogenes* de 24 heures à 37°C est suffisante pour la détection des antigènes somatiques. En revanche, *Listeria* n'étant pourvue que de 2 à 3 flagelles péritriches, la détection des antigènes H est réalisée après trois passages des isolats en milieu semi-gélosé incubés à température ambiante. Cette étape a pour objectif d'augmenter la lisibilité des résultats en stimulant la synthèse de ces flagelles, celle-ci n'ayant lieu que pour des températures comprises entre 20 et 25°C.

Une des limites de la technique réside dans la détermination de certains sérotypes associés à *L. monocytogenes*. En effet, des antigènes somatiques comme le V, VIII et IX ne sont pas toujours exprimés par la bactérie. Ainsi, fréquemment, les sérotypes 4b et 4e ne peuvent pas être distingués avec certitude (tableau 3, p12). De surcroît, il semble que le facteur IX puisse être également détecté chez certaines souches de sérotype 4b (Garcia *et al.* 1990). En conséquence, il est plus approprié de rendre les résultats sous la forme 4b/e. Il n'est pas exclu non plus de se trouver en présence de souches 4b atypiques comme ce fut le cas en Grande Bretagne lors d'un épisode épidémique en 1987 (McLauchlin *et al.* 1989). Le clone identifié dans ce cas précis donnait de façon singulière une réaction positive avec le facteur VII (et négative pour I, IV, VIII et IX), (sérotype 4bX, tableau 3 p12).

En dépit d'un faible pouvoir discriminant, le sérotypage reste un outil de choix dans les investigations épidémiologiques, notamment pour l'exploitation des résultats par rapport aux données existantes et la mise en évidence du sérotype 4 dans la mesure où 70 % des souches d'origine humaine appartiennent au sérotype 4b (Rocourt, 2000).

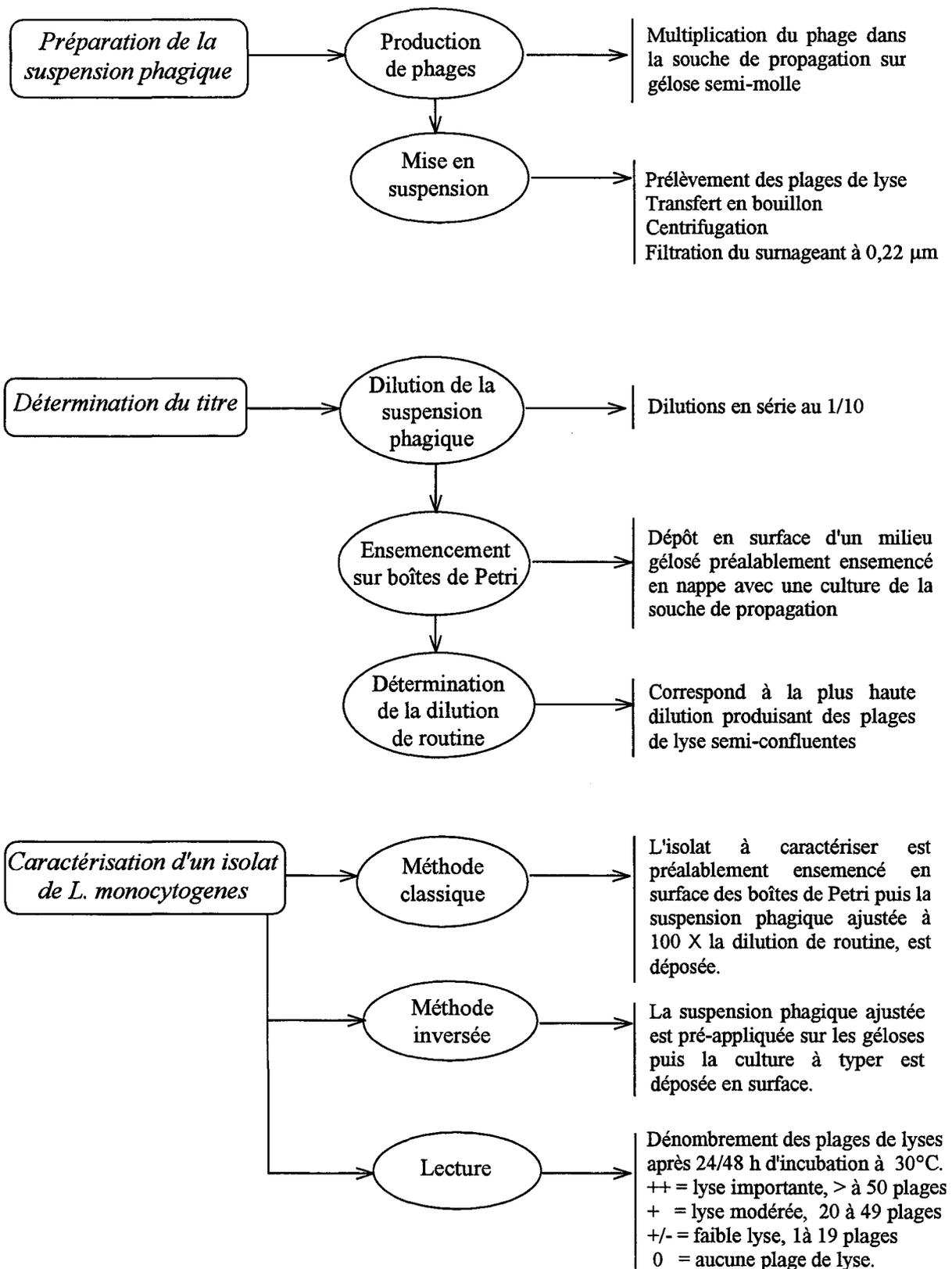


Figure 14 : Principales étapes de la méthode de lysotypage (Estela *et al.* 1993)

1-2 Le lysotypage

1-2-1 Principe

Le lysotypage est fondé sur la sensibilité des souches de *L. monocytogenes* à des bactériophages. Ces derniers ont été initialement isolés de souches lysogènes (Rocourt *et al.* 1985) et appartiennent aux deux familles suivantes : les *Myoviridae* (queue contractile) et les *Siphoviridae* (queue non contractile) (Larpent, 2000). Ce sont des bactériophages à ADN, de forme caudée qui sont spécifiques du genre *Listeria* et lysent toutes les espèces sauf *L. grayi*. Le spectre lytique de chaque phage se restreint au même sérotype que celui des souches lysogènes d'origine (Audurier *et al.* 1989b). Ainsi, dans le système international de lysotypage, il existe deux listes de phages permettant respectivement de caractériser les souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2 et de sérotype 4 (tableau 9). Cette sélection de phages est issue d'une étude multi-centrique dans laquelle trois collections de bactériophages d'origine française, hongroise et allemande, ont été comparées pour le typage d'un panel de souches de *L. monocytogenes* défini. Les critères de choix pour la détermination d'un schéma de typage finalisé se sont surtout axés sur la reproductibilité des résultats et le pouvoir discriminant du système (Rocourt *et al.* 1985).

Tableau 9 : Lysotypage international :

Liste des phages de *L. monocytogenes* et leurs souches de propagation.

sérotype 1/2		sérotype 4	
n°phage	souche de propagation	n°phage	souche de propagation
10	IP31	47	1294*
19	IP31	52	4136
21	4044	107	4136
43	IP31*	108	1782*
46	4044*	312	4136
387	IP31	340	4136
575	3926	1317	4525
1652	4044	1444	4136
1967	8615	2389	1089
2685	1803	2425	4262
4477	1803	2671	10401
12029	IP31	3274	1782
		3551	1326*
		3552	6917*

* certains laboratoires utilisent une autre souche.

La sensibilité d'une souche *L. monocytogenes* pour un phage donné est appréciée par la visualisation de plages de lyse générées sur milieu solide (tryptose agar en boîte de Petri) dans les conditions expérimentales du test. La méthode comporte trois étapes essentielles : la préparation de la suspension phagique, la détermination de son titre et la mise en oeuvre du test en lui-même permettant de caractériser une souche donnée (figure 14 p 46).

1-2-2 Points critiques et données épidémiologiques associées

Une étude multi-centrique initiée par l'Organisation Mondiale de la Santé a été publiée en 1996 (McLauchlin *et al.* 1996) sur l'intérêt et les performances du lysotypage. L'analyse des résultats indique deux problèmes majeurs concernant la typabilité (typable ou non par le système) et la reproductibilité. Les points critiques de la technique à l'origine de réactions plus ou moins stables sont principalement liés d'une part aux choix des souches de propagation et d'autre part à un manque de standardisation des différentes étapes notamment au niveau de la préparation de la suspension phagique. D'autres facteurs peuvent également interférer sur les résultats, notamment si la souche testée est lysogène pour un autre phage et produit spontanément des virions lors de sa mise en culture (difficulté d'identifier alors les plages de lyses spécifiques du typage) ou s'il y a perte de matériel génétique tel que plasmides ou phages (possibilité d'une modification du phénotype) (McLauchlin *et al.* 1996). Ainsi la comparaison des résultats inter-laboratoires apparaît d'intérêt très limité. La capacité de typage du système actuel est relativement peu importante. En moyenne, 50 % des souches du sérotype 1/2 et 80 % des souches du sérotype 4 peuvent être classées en utilisant la liste internationale des phages (Rocourt *et al.* 1985, Marquet-van der mee *et al.* 1995, McLauchlin *et al.* 1996). Il semblerait que ces performances soient très variables lorsque l'on utilise le système pour typer des souches non cliniques issues d'études de « terrain » en hygiène alimentaire. Très récemment, les scores de typabilité relevés par une équipe espagnole sur une collection de souches isolées de la filière avicole se situent autour de 50 % quelque soit le sérotype (Capita *et al.* 2002). A contrario, au moins 75 % des souches issues des produits de la mer pourraient être caractérisées par cette méthode (Estela *et al.* 1992). Il semblerait que l'identification des profils lysotypiques et leur fréquence soient en relation directe avec l'origine géographique des souches, phénomène déjà observé chez d'autres espèces bactériennes comme *Staphylococcus aureus*, et les streptocoques des groupes A et B (Capita *et al.* 2002). L'étude américaine sur les produits de la mer (Estela *et al.* 1992) suggère qu'en

fait ce lien serait davantage en relation avec la niche écologique. En effet, parmi les souches caractérisées d'origine marine, une nette prévalence de certains profils lysotypiques est observée pour chacun des sérogroupes quelque soit la nature et l'origine des prélèvements.

Si le lysotypage ne semble pas être une méthode appropriée pour des études « filières », il présente en revanche un pouvoir discriminant d'intérêt mis à profit depuis les années 80 dans les investigations visant à identifier le véhicule alimentaire à l'origine d'épisodes épidémiques. Avec le sérotypage, c'est la méthode de typage la plus anciennement mise en œuvre pour la détection des clones épidémiques (tableau 8 p 36). Il est à noter que le système a été surtout développé par des équipes françaises et que dans le monde, peu de laboratoires (moins de 10) sont dotés de la collection de phages de référence internationale et des compétences humaines pour la réalisation du test.

Enfin, le sérotypage et le lysotypage ne permettent pas d'apprécier un degré de parenté entre les souches caractérisées.

2 Caractérisation génotypique

2-1 Electrophorèse d'iso-enzymes

2-1-1 Principe

La méthode de caractérisation des isolats s'appuyant sur l'électrophorèse d'iso-enzymes ou MEE pour Multilocus Enzyme Electrophoresis est fondée sur la mobilité électrophorétique d'un grand nombre d'enzymes cellulaires hydrosolubles ayant des fonctions métaboliques diverses (Selander *et al.* 1986). La mobilité de ces protéines en gel d'amidon est conditionnée par les charges électrostatiques émanant de leur séquences en acides aminés. Ainsi, la méthode permet de détecter les différents allèles pour un même locus et de ce fait, la technique MEE est une méthode de génotypage dite indirecte (ce ne sont pas les séquences d'ADN qui sont directement caractérisées) offrant la possibilité d'apprécier une distance génétique entre les isolats à partir de leurs profils électrophorétiques (ET pour electrophoretic type). Il est rapporté dans la littérature que la technique permet de détecter 80-90 % des substitutions dans les séquences en acides aminés alors que certaines n'ont pas d'incidence sur la mobilité électrophorétique. Pour une caractérisation représentative du génome bactérien, la recherche de variations alléliques doit être réalisée sur la base de 15 à 25 enzymes (Selander *et al.* 1986). Pour le typage des souches de *L. monocytogenes* la liste des locus habituellement caractérisés est présentée dans le tableau 10.

Tableau 10 : Liste des enzymes utilisées par les différentes études pour le typage par MEE.

Enzymes	symboles	Références études					
		1	2	3	4	5	6
<i>Hydrolases</i>							
Phosphatase acide	ACP	X		X	X	X	X
Phosphatase alcaline	ALK				X		
Esterase	EST	X	X	X		X	
Phenylalanyl-leucine peptidase	PEP1	X				X	
Leucyl-glycyl-glycine peptidases	PEP2/PEP4	X		X	X		X
<i>Oxydo réductases</i>							
Alanine déshydrogénase	ALDH	X	X	X		X	X
Catalase	CAT	X		X		X	X
Glutamate déshydrogénase à NAD	GD1	X		X	X	X	
Glutamate déshydrogénase à NADP	GD2	X	X				X
Glyceraldéhyde 3 phosphate DH	G3P	X		X	X		X
Glucose-6-phosphate DH	G6P	X	X	X	X	X	X
Phosphogluconate-6 P DH	6PG	X	X	X	X	X	X
Indophénol oxydase	IPO	X		X	X		X
Isocitrate DH	IDH	X		X			X
Lactate DH	LADH	X		X			X
<i>Lyases</i>							
Fumarase	FUM	X		X			X
Aconitase	ACO	X					
<i>Isomérases</i>							
Mannose-6-phosphate DH	MPI	X		X		X	X
Phosphoglucose isomerase	PGI	X	X	X	X	X	X
<i>Transférases</i>							
Phosphoglucomutase	PGM	X		X	X		
Adenylate kinase	ADK	X	X	X	X	X	X
Nucleoside phosphorylase	NSP	X	X	X	X	X	X
Nombre total de <i>locus</i>		23	8	20	14	12	16
Nombre de souches typées		80	124	90	307	245	175
Nombre total de types (ET) identifiés		25	56	11	12	33	45

Références études :

- 1, Caugant *et al.* 1996, Etude comparative internationale
- 2, Flint *et al.* 1996, Nouvelle Zélande
- 3, Rorvik *et al.* 1995 Norvège
- 4, Kolstad *et al.* 1992 Norvège
- 5, Norrung *et al.* 1993 Danemark
- 6, Piffaretti *et al.* 1989 Suisse

2-1-2 Points critiques

Les conditions de culture des souches à caractériser ne sont pas susceptibles de modifier la mobilité électrophorétique des enzymes mais l'activité de ces dernières peut être modifiée. Une gélose ou bouillon nutritif incubé à 37°C est classiquement utilisé. La préparation des extraits enzymatiques est réalisée en lysant les parois cellulaires par des techniques ne dénaturant pas les protéines comme les ultrasons. Après centrifugation, le surnageant est récupéré pour l'électrophorèse réalisée généralement en gel d'amidon. La phase de révélation consiste à incuber le gel dans un tampon contenant le substrat spécifique de l'enzyme dont on veut définir l'allèle, couplé à une réaction colorée permettant la visualisation directe du résultat.

Une étude comparative internationale, à laquelle ont participé 7 laboratoires (majoritairement des pays nordiques) visant à évaluer les performances de cette méthode pour le typage de *L. monocytogenes* (Caugant *et al.* 1996) a été publiée en 1996. Les conclusions font état d'un pouvoir discriminant insuffisant, ne permettant pas de surcroît, d'établir avec certitude un degré de parenté entre les souches (ou l'appartenance à un même type clonal). A l'origine, la méthode MEE avait été surtout considérée comme un outil en taxonomie, mettant en évidence des marqueurs moléculaires davantage liés à l'espèce qu'à la variabilité qui peut exister entre les souches (Williams *et al.* 1980). Le polymorphisme des enzymes métaboliques ne serait donc pas si important et de ce fait, la stabilité de ces marqueurs moléculaires conduit à penser qu'il seraient plus adaptés en épidémiologie-surveillance sur des études à long terme plutôt que dans des investigations visant à identifier une source de contamination au sein d'un micro-environnement. En d'autres termes, il semblerait que le système ne puisse pas identifier les différents génotypes pouvant émerger à la suite de microévolutions induites par l'environnement (Struelens *et al.* 1998).

Au niveau technique, le manque de pouvoir discriminant s'accompagne d'un problème de reproductibilité, les deux pouvant être reliés aux conditions électrophorétiques appliquées. En effet, au niveau de la migration, le temps et la nature du gel conditionnent le pouvoir résolutif du système. Ainsi, certains allèles ayant des mobilités très proches peuvent être plus ou moins détectés. Des essais en gel polyacrylamide ont été réalisés par certaines équipes (Flint *et al.* 1996) mais apportent encore plus de lourdeur dans la mise en oeuvre du système.

Toutefois, l'avantage majeur de la méthode MEE repose sur la typabilité. En effet, 100 % des souches peuvent être caractérisées par cette méthode.

2-1-3 Données épidémiologiques associées.

Plusieurs études ont appliqué le système sur des collections de souches de diverses origines comparées à des souches cliniques (Piffaretti *et al.* 1989, Norrung *et al.* 1993, Flint *et al.* 1996, Rorvik 2000). Dans la plupart des cas, deux classes majeures apparaissent et sont directement reliées aux sérogroupes, soit deux divisions identifiant respectivement les types somatiques 1 et 4 (Piffaretti *et al.* 1989, Norrung *et al.* 1993, Kolstad *et al.* 1992). De façon évidente, les souches cliniques présentent une diversité moindre en comparaison avec celles issues de l'environnement (Piffaretti *et al.* 1989, Flint *et al.* 1996). Cette particularité suggère que la plupart des listérioses sont causées par une minorité de clones dérivant vraisemblablement d'un même ancêtre. Une étude danoise montre également que certains clones semblent prédominer dans chacune des filières de l'agroalimentaire, ce qui conduirait à penser que les conditions environnementales présentes dans l'industrie alimentaire sélectionneraient des souches les plus adaptées pour chaque secteur (Norrung *et al.* 1993). Enfin, une équipe norvégienne travaillant plus spécifiquement sur les produits de la pêche a identifié de possibles connections entre des cas de listériose et la consommation de saumon fumé (Rorvik 2000a). L'auteur s'appuie sur le fait que des isolats présentant les mêmes types électrophorétiques ont été à la fois retrouvés dans l'environnement d'un atelier de fumaison et chez des patients d'une même région. Une deuxième méthode de typage moléculaire a été appliquée pour confirmer et valider ces observations.

2-2 *Systèmes de typage moléculaire basés sur une empreinte génétique*

2-2-1 Introduction

Le développement de nouvelles méthodes d'empreintes génétiques a trouvé tout son intérêt en épidémiologie notamment pour assurer des études de traçabilité. L'application de ces nouveaux systèmes de typage comporte un double objectif : permettre, d'une part, la discrimination entre des isolats appartenant à une même espèce ou à un même taxon, et d'autre part, mettre en évidence les éventuelles lignées clonales (Struelens *et al.* 1996). Il paraît important d'identifier les liens de parenté existants entre des souches récoltées au cours d'une épidémie ou tout au long d'une chaîne de transmission afin de pouvoir affirmer si elles dérivent d'un même ancêtre.

En se référant aux lignes directrices publiées par l'European Study Group on Epidemiological Markers (Struelens *et al.* 1996), deux catégories de critères permettent d'évaluer ces systèmes de typage. Ceux associés à leurs performances sont au nombre de cinq : la typabilité (typable

ou non par le système), la reproductibilité, le pouvoir discriminant (distinguer les isolats ayant un lien génétique de ceux qui n'en ont pas), la stabilité du marqueur (indépendance vis à vis des micro-évolutions induites *in vivo* ou *in vitro*) et enfin la concordance des systèmes de typage. Ce dernier point souligne le fait qu'il est difficile d'interpréter des résultats sur la base d'un seul marqueur épidémiologique. Il s'avère souvent bénéfique voire nécessaire de comparer et d'associer des résultats provenant de systèmes de typage différents notamment avant de conclure à l'identification d'une lignée clonale. Ainsi, les systèmes explorant le polymorphisme à de multiples sites du génome sont plus représentatifs et plus fiables que les systèmes détectant les variations génétiques au sein d'un unique *locus*.

Pour comparer deux génomes, la méthode absolue consisterait à déterminer la séquence exacte de chacun et d'évaluer leur degré de similitude. D'un point de vue pratique, il n'est pas possible de réaliser un tel travail avec les moyens techniques actuels. Les méthodes génotypiques représentent donc une alternative visant à mettre en évidence le polymorphisme naturellement présent au sein du matériel génétique (plasmide, chromosome, gènes...). Le résultat final se matérialise par une sorte de code barre appelé dans le langage courant empreinte génétique. Des profils caractéristiques peuvent ainsi être générés soit à partir du génome total, soit à partir d'une région génomique déterminée présentant une certaine variabilité.

2-2-2 La macrorestriction

La macrorestriction vise à mettre en évidence le polymorphisme naturellement présent dans le génome (plasmides et chromosome(s)) à l'aide d'enzymes de restriction à faible fréquence de coupure reconnaissant des séquences d'ADN dont la longueur varie généralement entre 6 et 8 bases. Si le génome étudié présente un faible pourcentage en G+C, les enzymes sont choisies pour cliver des sites comportant des nucléotides CG, lesquels sont préférentiellement concentrés dans certaines régions de l'ADN. Le matériel génétique est ainsi coupé en grands fragments de 50 à quelques centaines de kilobases et les profils sont obtenus grâce à une électrophorèse particulière dite en champ pulsé.

Ce système de typage montre un pouvoir discriminant important et peut être considéré comme la méthode de référence pour le typage des *L. monocytogenes*. L'emploi d'au moins deux enzymes de restriction est cependant nécessaire pour caractériser les souches et apprécier ainsi la réelle variabilité génomique entre les isolats (Brosch *et al.* 1996). Le génome des *Listeria* présentant un pourcentage en G+C de 38 %, les couples d'enzymes les plus

fréquemment utilisés sont : *ApaI* et *SmaI* ou bien *ApaI* et *AscI* reconnaissant des sites riches en G+C. L'analyse des empreintes, au niveau du nombre de bandes communes et différentes entre 2 isolats, peut conduire dans certains cas à l'identification d'événements génétiques ainsi que l'ont suggéré Tenover *et al.* (1995 et 1997). Ainsi, une différence entre les profils portant sur le nombre de bandes peut être reliée à la perte ou le gain d'un site de restriction. Une modification de la taille d'une bande peut en revanche avoir pour origine l'insertion ou la délétion d'un fragment d'ADN (figure 15). Des souches ayant des profils à la fois différents mais avec un haut degré de similarité peuvent vraisemblablement être considérées comme dérivant d'un même ancêtre par mutation.

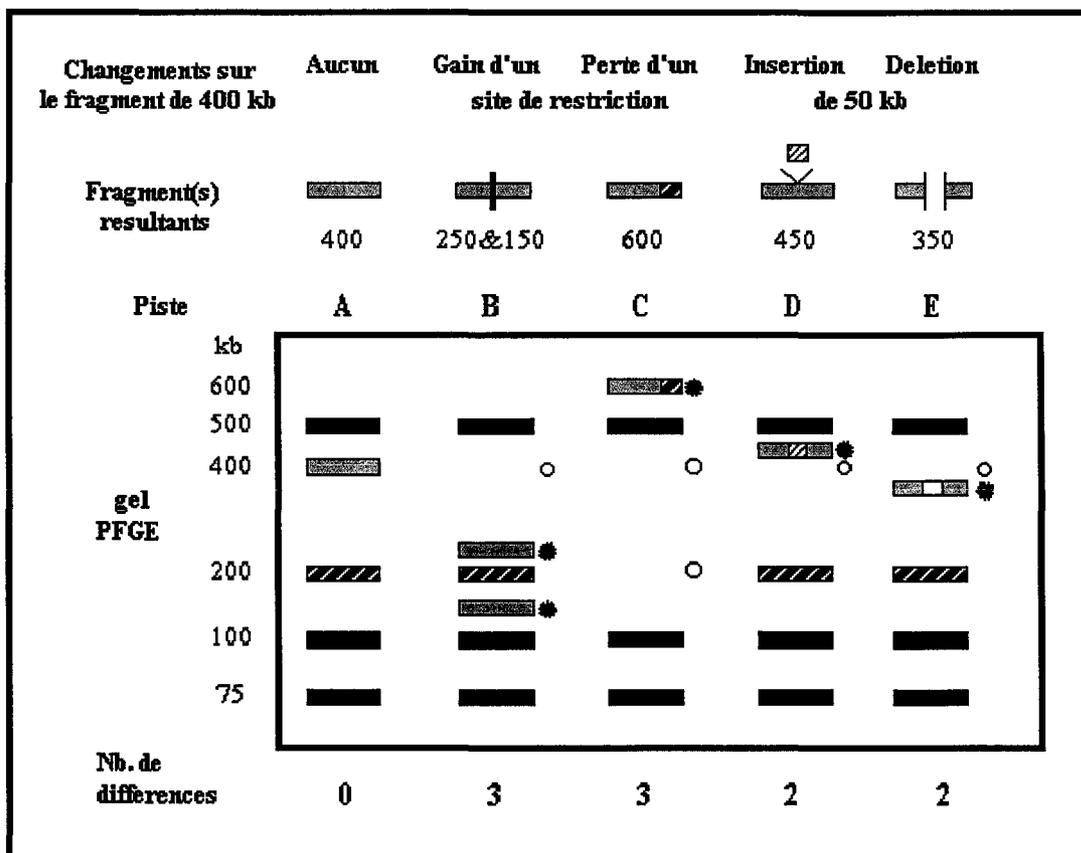


Figure 15 : Interprétation possible des profils électrophorétiques obtenus en macrorestriction. Schéma extrait de la publication de Tenover *et al.* 1995, montrant les changements théoriques dans les profils PFGE à partir d'un isolat après divers événements génétiques. La piste A représente le profil épidémique, la piste B, gain d'un site de restriction, la piste C, perte d'un site de restriction, la piste D, insertion d'un fragment d'ADN, la piste E, délétion d'un fragment existant. Les cercles ouverts (o) indiquent les fragments présents dans le profil épidémique et manquants dans les autres profils suite à un événement génétique; les astérisques (*) indiquent les fragments générés par les événements génétiques et absents du profil épidémique.

La méthode se décompose en 3 étapes majeures : la préparation de l'ADN, la digestion et l'électrophorèse. Pour obtenir un résultat exploitable, la qualité et la quantité d'ADN extrait conditionnent en grande partie la réussite de la technique. Il est impossible de manipuler de l'ADN de plusieurs centaines de kilobases sans le casser mécaniquement. C'est la raison pour laquelle, la procédure utilise au départ des suspensions bactériennes ajustées à une densité appropriée puis insérées dans des blocs d'agarose. L'ADN est ensuite extrait *in situ*, sans manipulation directe : les molécules d'ADN sont protégées tandis que la matrice d'agarose permet la diffusion des diverses solutions contenant des enzymes protéolytiques, des détergents, du tampon (et les enzymes de restriction pour la deuxième étape). Les premiers protocoles développés pour la préparation de l'ADN matrice nécessitaient 4 à 6 jours de travail (Maslow *et al.* 1993, Hillier *et al.* 1995) et alourdissaient par conséquent la mise en œuvre de cette méthode de façon significative. Ce n'est plus le cas aujourd'hui, depuis que le CDC a intégré dans son système d'épidémiologie-surveillance PulseNet en 1998, l'analyse en réseau des souches de *L. monocytogenes*. Un protocole rapide (réalisable dans une journée) et parfaitement standardisé est maintenant disponible (Graves *et al.* 2001). Après l'étape de digestion, réalisée avec l'enzyme choisie et dans les conditions appropriées suggérées par le fournisseur, la séparation des fragments d'ADN nécessite la technique d'électrophorèse en champ pulsé qui, par abus de langage, a donné son nom à ce système de typage (méthode champ pulsé ou méthode PFGE pour Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Au lieu d'un champ électrique unidirectionnel, uniforme et continu (système conventionnel), l'appareillage permet d'appliquer deux champs d'orientation différentes de façon alternative. A chaque changement de direction, les molécules d'ADN subissent un phénomène de réorientation étroitement dépendant de leur taille, puis migrent. Pour un temps de pulse donné, c'est l'écart de durée au niveau de la réorientation qui est à l'origine de la séparation des molécules de tailles différentes.

C'est au cours des années 90 que la macrorestriction a connu son véritable essor en terme de développement et d'applications chez les bactéries. Ainsi, pour la caractérisation de *L. monocytogenes*, les travaux de Brosch *et al.* en 1991 soulignent le pouvoir discriminant de la méthode en réussissant à distinguer des souches jugées jusque-là identiques par les autres techniques de typage sérotypage, lysotypage et ribotypage (analyse du polymorphisme des séquences d'ADN ribosomique). Ils montrent également que les souches reliées épidémiologiquement restent identifiées sous un même profil génétique (Brosch *et al.* 1991, Buchrieser *et al.* 1991). Les résultats de l'étude organisée par l'OMS sur l'évaluation de la macrorestriction pour le typage de *L. monocytogenes* confirme l'intérêt certain de cette

méthode en rapport direct avec ses performances. Les résultats des 4 laboratoires des pays participants, dont la France, sont tout à fait concordants et indiquent une reproductibilité et un pouvoir discriminant excellents (Brosch *et al.* 1996). De plus, la méthode semble robuste, puisque un des laboratoires participant utilisait un système d'électrophorèse FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) différent du PFGE classiquement employé et les résultats sont restés néanmoins comparables. Enfin, dans cette étude, toutes les souches testées ont pu être caractérisées par le système ce qui lui confère des qualités de typabilité. Des souches réfractaires à la digestion enzymatique ont été très rarement rapportées dans la littérature (Brosch *et al.*, 1994). Aux Etats-Unis, peu de temps après la mise en place du réseau PulseNet, le système a permis de rapidement identifier l'origine de l'épidémie de listériose survenue fin 1998 liée à la consommation de hot dog (Koplan, 1999). Dans le même espace de temps, des investigations ont été également menées sur d'autres souches représentant un groupe bien distinct au sein de la collection. Un lien avec un fromage importé bien spécifique a été également mis en évidence. En France, Le Centre National de Référence des *Listeria* (Institut Pasteur de Paris) utilise également la technique du champ pulsé pour la caractérisation des souches d'origine clinique notamment en cas d'alerte épidémique. A ce sujet, au cours des investigations mises en œuvre sur les cas groupés de listériose liés à la consommation de langue de porc en gelée en 2000, une modification de la définition du clone épidémique a été établie (De Valk *et al.* 2000b). En effet, il est précisé dans le rapport que le lysotype de la souche incriminée pose des problèmes de lecture de plage de lyse se répercutant sur l'interprétation et la reproductibilité des résultats. En conséquence les cas épidémiques ont été redéfinis sur la base de leur appartenance au sérotype 4b et de leur profils en macrorestriction (après digestion avec *ApaI* et *AscI*). Ce dernier exemple souligne l'intérêt certain de la macrorestriction par rapport aux autres techniques appliquées en épidémiologie et sa place en tant que méthode de référence pour le typage des souches de *L. monocytogenes*.

2-2-3 Autres méthodes développées

➤ La RAPD

La RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ou Amplification aléatoire, est une technique basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) utilisant une seule amorce de courte taille (environ 10 nt). Lorsque celle-ci s'hybride de façon aléatoire sur chacun des brins d'ADN et à une distance appropriée, un fragment est généré par amplification. Le succès de cette méthode tient surtout au fait qu'elle soit particulièrement simple et rapide à mettre en

œuvre. Cependant, en raison de son manque de spécificité (conditions PCR non stringentes), elle est extrêmement sensible aux conditions expérimentales et ses qualités de répétabilité et de reproductibilité s'en trouvent affectées (Struelens *et al.* 1996). De plus, l'amplification des fragments est rarement homogène et la variabilité au niveau de ces différences d'intensité rend la lecture des profils très subjective (Burr *et al.* 1997). Pour améliorer la résolution des empreintes, Allerberger *et al.* (1997) ont développé une analyse sur gel de séquence avec une comparaison des résultats assistée par ordinateur. Sur la base du pouvoir discriminant de la méthode, ces auteurs ont proposé une origine commune à certains cas sporadiques de listériose dans l'ouest de l'Autriche. En revanche, les souches issues des diverses matrices alimentaires étudiées n'ont pas permis d'identifier le ou les produits incriminés.

D'une manière générale, la technique RAPD s'avère utile pour un rapide criblage de souches dans le cadre d'études bien déterminées mais ne semble pas être appropriée pour la construction de bases de données et la confrontation de résultats inter-laboratoire reste très délicate voire non envisageable.

➤ l'AFLP

Très récemment, une méthode universelle d'empreinte génétique, l'AFLP pour Amplified Fragment Length Polymorphism a été appliquée au génome de *L. monocytogenes* (Aarts *et al.* 1999, Ripabelli *et al.* 2000). La stratégie de base de ce concept est d'allier l'analyse RFLP, couramment appliquée pour la détection d'un polymorphisme de séquence, aux qualités de spécificité de la technique PCR, capable de sélectionner un seul fragment d'ADN sur la base du caractère unique de sa séquence. Le résultat est une technique hybride entre restriction et amplification. La reproductibilité de l'ensemble est assurée par une grande spécificité provenant des enzymes de restriction, et des conditions stringentes d'hybridation durant les cycles de la PCR. L'idée est de cribler un nombre important de *locus* du génome, correspondant aux sites de reconnaissance des endonucléases et de visualiser le résultat en sélectionnant, par la technique PCR, un nombre limité des fragments d'ADN. Le nom fait référence à l'analyse de RFLP avec une différence majeure au niveau de la détection des fragments ne se faisant pas par hybridation de Southern mais par PCR (cependant le nom choisi n'est pas approprié : la technique permet de visualiser la présence ou l'absence de fragments de restriction et non un polymorphisme de longueur). Avec le couple d'enzymes *EcoRI/MseI*, Aarts *et al.* (1999) distinguent clairement deux groupes génomiques à savoir : celui composé des sérotypes 1/2a, 1/2c, 3a et 4a et un second groupe incluant les sérotypes 1/2b, 3b, 4b, 4ab, 4e. La méthode semble discriminante mais reste lourde à mettre en oeuvre.

Ripabelli *et al.* (2000) ont choisi eux de n'utiliser qu'une seule enzyme *Hind* III, et de révéler les profils sur gel d'agarose. Ils observent également 2 groupes génétiques composés d'une part des sérotypes 1/2a et 1/2c et d'autre part des sérotypes 1/2b, 3b, 4b. Leur technique est plus simple mais manque de pouvoir discriminant et ne peut pas être appliquée à des études épidémiologiques.

➤ Applications à des *locus* polymorphes

Le principe général de ce type d'approche consiste dans un premier temps à isoler la région d'intérêt, soit par amplification (PCR), soit à l'aide d'une sonde d'ADN puis à révéler le polymorphisme présent par l'emploi d'enzymes de restriction (ou polymorphisme de restriction couramment désigné sous le terme RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism).

Diverses études ont été développées pour la caractérisation des gènes impliqués dans la virulence par PCR-RFLP. Les *locus* étudiés concernent les régions suivantes :

- le segment d'ADN contenant les gènes *inlA-inlB* codant deux internalines impliquées dans les mécanismes d'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules mammifères (Ericsson *et al.* 1995)
- le gène codant la protéine P60 (*iap*), qui aurait également un rôle dans l'invasion cellulaire (Gutekunst 1992, Vines *et al.* 1992, Comi *et al.* 1997, Saito *et al.* 1997)
- la région génomique incluant les 2 opérons portant les principaux gènes de virulence, notamment l'hémolysine (*hly*), la métalloprotéase (*mpl*), et la protéine régulatrice de l'expression de ces gènes (*prfA*) (Comi *et al.* 1997, Saito *et al.* 1997).

D'une façon générale, les résultats de ces travaux concordent et montrent qu'il existe vraisemblablement deux branches phylogénétiques pour l'espèce *L. monocytogenes*, à savoir un premier groupe incluant les sérotypes 1/2a, 1/2c et 3a et un deuxième composé des sérotypes 1/2b, 3b et 4b. Ce classement confirmé par les analyses en AFLP a également été observé très récemment à partir des alignements de séquences des acides aminés du gène *inlB* (Ericsson *et al.* 2000). Outre cet intérêt phylogénétique, les PCR-RFLP développées ont l'avantage d'être informatives en donnant la carte de restriction de ces gènes. Une information qui serait susceptible d'être, à long terme, reliée à un phénotype traduisant un degré de virulence suite à des comparaisons effectuées entre les souches de terrains et les souches cliniques. Au niveau du pouvoir discriminant, ces techniques n'ont d'intérêt qu'à partir du moment où l'analyse comprend plusieurs régions combinées. La question reste cependant, de déterminer le niveau de dichotomie à atteindre pour définir le lien épidémiologique entre les

souches. Sur un autre plan, multiplier le nombre de *locus* à analyser alourdit la charge de travail et impose des limites sur le nombre d'isolats pouvant être caractérisés.

Les méthodes d'hybridation de Southern présentent les mêmes avantages et inconvénients que celles citées précédemment, mais sont plus délicates et plus longues à mettre en œuvre et de ce fait ont été peu développées (Zheng *et al.* 1995).

En conclusion, ces méthodes, basées sur le polymorphisme d'une région génomique déterminée, présentent l'avantage d'être à la fois reproductibles, faciles à réaliser et informatives mais ne deviennent réellement représentatives qu'une fois associées les unes aux autres.

3- Caractérisation de la virulence

Pour l'appréciation du pouvoir pathogène des isolats de *L. monocytogenes*, les expérimentations peuvent être classées en 2 grandes catégories, à savoir celles réalisées *in vivo* et celles réalisées *in vitro*. Actuellement, il n'existe pas de modèle animal reproduisant la listériose humaine par une transmission par voie orale. Toutefois, en guise d'alternative, la souris est couramment choisie et fait office de méthode de référence dans la plupart des études (Brosch *et al.* 1993, Van Langendonck *et al.* 1998, Erdenlig *et al.* 2000). Un des protocoles utilisé consiste à traiter l'animal avec des carraghénanes pour induire un système immunitaire anormalement fonctionnel (immunocompromis) permettant d'augmenter significativement le pouvoir discriminant entre les souches virulentes et non virulentes (au niveau de la DL_{50} c'est à dire la dose létale pour 50 animaux sur 100). Ce protocole, reconnu pour sa reproductibilité, est approuvé par la FDA pour l'investigation du pouvoir pathogène des souches de *L. monocytogenes* (Stelma *et al.* 1987). Dans la plupart des cas, l'animal est infecté par une injection réalisée par voie intra-veineuse, intra-péritonéale c'est à dire dans le péritoine (membrane se trouvant dans l'abdomen) ou par voie sous cutanée plantaire. Suivant le mode d'inoculation invasif appliqué, les bactéries atteignent plus ou moins efficacement les organes. Par la voie sous-cutanée plantaire, les différences observées entre les souches sont davantage marquées et ces dernières peuvent alors être classées suivant un niveau de virulence (Van Langendonck *et al.* 1998, Roche *et al.* 2001). Néanmoins, les performances visualisées dans ces conditions ne sont peut être pas transposables à l'infection chez l'homme.

L'inoculation de l'œuf embryonné a été également proposé comme modèle et son application semble aussi permettre la mise en évidence de la variabilité des souches au regard de leur virulence (Avery *et al.* 1997, Norrung *et al.* 2000). L'expérimentation *in vivo* reste délicate et

assez longue à mettre en œuvre (temps de préparation, temps d'incubation de 24 h à 1 semaine, voire plus). Elle nécessite également des installations et des compétences spécifiques. C'est pourquoi le développement de tests *in vitro* comme méthodes alternatives est devenu un axe prioritaire de recherche. Une des approches consiste à caractériser l'activité enzymatique des protéines impliquées dans la virulence telles que l'hémolysine (LLO), la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) et la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC). Les résultats issus de différentes études (Van Langendonck *et al.* 1998, Erdenlig *et al.* 2000, Norrung *et al.* 2000) montrent que l'activité hémolytique des souches telle qu'elle est actuellement déterminée dans les tests *in vitro* n'est pas toujours corrélée au degré de virulence observé par l'expérimentation *in vivo*. En d'autres termes, le pouvoir hémolytique des souches ne semble pas être un critère fiable pour distinguer les pathogènes des non pathogènes. La plus récente de ces études suggère qu'il en est de même pour la lipase (PI-PLC) et la lécithinase (PC-PLC) dont les niveaux de performance montrent une certaine variabilité souche dépendante (Erdenlig *et al.* 2000).

Les tests sur cultures cellulaires (TCA, Tissue Culture Assay) semblent représenter une meilleure voie d'approche pour l'expérimentation *in vitro* et une bonne alternative à l'expérimentation *in vivo*. Différents types de lignées cellulaires d'origine mammifère (humain ou murin) ont été utilisés, à savoir des cellules dites professionnelles (macrophage ou de type macrophage) et des cellules épithéliales (Dallas *et al.* 1995, Van Langendonck *et al.* 1998, Bubert *et al.* 1999). Les cellules Caco-2 proviennent d'un adénocarcinome du colon humain et ont la propriété d'exprimer les différentes caractéristiques des cellules matures de l'intestin. En France, l'équipe de l'INRA de Nouzilly a récemment développé des tests *in vitro* (Van Langendonck *et al.* 1998) à partir de ces cellules de type entérocyte. La caractérisation de la virulence est ainsi évaluée de deux façons différentes :

- Le test PM (Penetration and Multiplication) vise à évaluer un taux de pénétration et un index de multiplication intracellulaire dans des conditions déterminées,
- Le test PF (Plaque Forming) permet de quantifier l'aptitude des souches à former des plages de lyse sur le tapis cellulaire (détermination de leur nombre et éventuellement de leur taille).

La comparaison de ces tests avec les résultats issus de l'expérimentation *in vivo* montre une certaine variabilité et suggère que la pathogénicité des souches doit être évaluée plus en terme de degré de virulence que sous le seul aspect qualitatif virulente, non virulente. Néanmoins, le test PF semble donner de meilleurs résultats que le test PM et représente donc une méthode prometteuse et de choix pour la caractérisation de la virulence de *L. monocytogenes*. Dans

cette optique, la méthode a été optimisée à plusieurs niveaux : le test a été miniaturisé et la lignée cellulaire Caco-2 a été remplacée par la lignée HT-29. Cette dernière, également de type entérocyte, présente l'avantage de maintenir en présence de glucose un taux de prolifération constant améliorant de façon significative la reproductibilité du test (Roche *et al.* 2001). Avec l'ensemble de ces modifications, il est possible en 24 h d'apprécier un niveau de virulence *in vitro* présentant une corrélation significative avec les tests *in vivo* sur souris.

IV AXES DE RECHERCHES

L'objectif de ma thèse est de comprendre l'apparent décalage qui existe entre la prévalence des *L. monocytogenes* dans les poissons fumés et l'incidence en terme de toxi-infections liées à la consommation de tels produits. Mes travaux se sont donc orientés sur les deux axes de recherche suivants :

➤ Variabilité des souches

Il est intéressant d'approfondir en premier lieu nos connaissances sur les génotypes présents dans cette filière et de déterminer si les souches isolées se distinguent ou non de celles rencontrées dans les autres secteurs de l'agro-alimentaire. En effet, l'hypothèse d'un caractère spécifique pourrait provenir d'une origine commune des souches liée au milieu marin et/ou d'une sélection par le procédé de fabrication lui-même. Dans l'optique d'apporter des éléments de réponse sur la variabilité des souches et de leur virulence, la démarche suivie au cours de ce travail a consisté à construire dans un premier temps une base de données d'empreintes génétiques associées aux souches isolées des produits de la pêche. Puis la constitution de ce "fichier" a permis de procéder à des comparaisons avec des souches isolées d'une part d'autres filières et d'autre part de cas cliniques.

Par ailleurs, il est possible que les populations de *L. monocytogenes* issues de cette filière se distinguent par un phénotype particulier dû à un effet du milieu environnant. Donc, la caractérisation *in vitro* d'un niveau de virulence a été réalisée sur un panel de souches sélectionnées.

➤ Influence de la matrice poisson fumé sur l'expression de la virulence

On est en droit de se demander s'il existe un effet de la matrice poisson fumé sur la manifestation de la virulence de *L. monocytogenes*. Ce dernier point n'a jamais fait l'objet de travaux scientifiques à notre connaissance et serait susceptible d'apporter des éléments de réponse sur l'appréciation du risque *L. monocytogenes* dans les poissons fumés. Le procédé de fumage est connu pour ses propriétés bactériostatiques mais il est possible que le mélange complexe de composés chimiques apporté par la fumée altère le pouvoir pathogène. L'impact de la matrice poisson fumé sur le phénotype a été apprécié par un test de génotoxicité et des courbes de croissance. Puis, les expérimentations mises en œuvre ont eu pour objectif de vérifier si l'incubation de souches de *L. monocytogenes* dans du saumon fumé modifiait ou non leur niveau de virulence déterminé *in vitro*. En parallèle, des témoins réalisés en matrice de saumon cru ont permis de comparer les résultats et d'apprécier un possible effet de la fumée.

V MATÉRIELS ET MÉTHODES

1- Souches bactériennes

1-1 *Souches de L. monocytogenes*

Au cours de ce travail, diverses collections de souches nous ont été transmises notamment dans le cadre de la construction de la base de données de profils génétiques ainsi que pour les comparaisons inter-filières et cas cliniques.

◇ *Souches isolées de poissons fumés*

- Au total, 22 souches ont été sélectionnées d'une étude précédente sur la période 1998-1999 (Dauphin *et al.* 2001) et avaient été isolées de 3 ateliers de fumaison boulonnais (codes sites de production dans cette étude n°1, 3 et 15).
- Par ailleurs, 35 souches provenaient d'une collection constituée dans le cadre d'un projet Européen FAIR CT96-1207 et nous ont été transmises par l'ASEPT de Laval. Quatre producteurs Français de saumon fumé avaient participé à cette étude (codes sites n°13, 38, 39, 40) mise en œuvre sur la période 1996-1999. Toutes ces souches portent des numéros précédés des lettres DA.

◇ *Souches autres filières*

- 20 souches nous ont été transmises par le laboratoire d'Epidémiologie Bactérienne de l'Afssa de Maisons Alfort et avaient été isolées sur la période 1996-1998 dans le cadre d'un travail de thèse (Kerouanton-Le Gall, 1999) des filières lait, fromage, porc et volaille. Les informations relatives à ces souches figurent dans le tableau 39, p 137.

◇ *Souches issues de cas cliniques*

- 16 souches cliniques provenaient de l'Hôpital Necker Paris et étaient extraites d'une étude antérieure (Poyart *et al.* 1996). Le numéro de chacune est précédé des 3 lettres DHN et les informations relatives à ce panel figurent dans le tableau 41 p 141.
- La souche isolée lors de l'épisode épidémique Suisse d'un cas humain en 1987 et référencée CIP103322 (ou encore CLIP10445), est issue de la collection de l'Institut Pasteur Paris et appartient au lysovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340.
- 4 souches récoltées lors d'épidémies en France nous ont été transmises par l'unité d'Epidémiologie Bactérienne de l'Afssa de Maisons Alfort. La souche référencée CLIP 22573 d'origine humaine a été isolée en 1992 et appartient au lysovar 2389/2425/3274/47/108/340. Celles portant les codes DM3368, DM5267 et DM5333 proviennent de prélèvements d'environnement de l'usine impliquée dans l'épisode de 1993 et se caractérisent par le lysovar épidémique 2671/108/312.

- 2 souches issues de cas sporadiques en France nous ont été transmises par l'ASEPT de Laval et sont notées DAL1 et DAL2 (tableau 42 p143).
- 5 souches isolées de cas avérés de listériose animale d'origine caprine ont été isolées par le laboratoire de l'Afssa de Niort (souches notées DN + numéro, tableau 43 p143).

◇ *Souches pour le calibrage du test de plages de lyse.*

- Pour la mise en œuvre des tests de virulence *in vitro*, 3 souches nous ont été transmises par l'INRA de Nouzilly : EGD300, IN12 (référéncée également 442) et IN13 (référéncée également 446). Les 2 dernières sont extraites de travaux antérieurs de Roche *et al.* (2001).

◇ *Souche pour l'alignement des gels PFGE*

- Dans le cadre des comparaisons inter bases de données d'empreintes génétiques, la souche H2446 a été utilisée dans les pistes de référence et nous a été transmise par l'unité d'Epidémiologie Bactérienne de l'Afssa de Maisons Alfort.

1-2 *Autres souches*

Pour la mise en œuvre du SOS chromotest, la souche *E. coli* PQ 37 portant une fusion *sfIA::lacZ* chromosomique (Quillardet *et al.* 1985) nous a été transmise par l'unité de Glycobiologie structurale et fonctionnelle du CNRS UMR 8576, USTL de Villeneuve d'Ascq.

1-3 *Mode de conservation*

Toutes les souches bactériennes transmises ou isolées lors de ce travail ont été conservées au surgélateur à -80°C en bouillon cœur-cerveille contenant 20 % de glycérol. Pour le typage et les tests de virulence *in vitro*, un panel de souches *L. monocytogenes* a été conservé en parallèle dans les mêmes conditions mais à -20°C pour une période de 12 mois maximum.

Dans tous les cas, la mise en culture des bactéries (sur milieu solide ou en bouillon) a été réalisée en prélevant une oese de 1 µl en surface des cryotubes sans décongélation préalable.

2- Lignée cellulaire

Les tests *in vitro* pour la détermination d'un niveau de virulence et pour les travaux associés à la recherche d'un "effet matrice" ont été mis en œuvre avec la lignée cellulaire H-29 (banque ECACC n°91072201) : cellules épithéliales intestinales humaines isolées d'un adénocarcinome du colon.

3- Type de souris

Les tests *in vivo* ont été mis en œuvre à partir de souris femelles de 7 semaines de type Swiss (Iffa-Credo, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). Elles ont été maintenues sur un lit de sciure de bois stérile avec un libre accès à l'eau et à la nourriture stériles.

4- Base de données profils génétiques *L. monocytogenes* "inter-filières"

Les pulsotypes des souches récoltées dans les produits de la pêche ont été comparés à ceux issus de la base de données de profils génétiques de *L. monocytogenes* de l'unité d'Epidémiologie Bactérienne de l'Afssa de Maisons Alfort. Cette dernière a été construite à partir de 1996 dans le cadre d'une thèse financée par UNIR (Kerouanton-Le-Gall 1999) et de l'activité de l'unité EB en provenance de différents laboratoires publics ou privés. Elle rassemble aujourd'hui les pulsotypes d'environ 3000 souches de *L. monocytogenes* provenant de l'industrie, des auto-contrôles et de diverses enquêtes associées à l'activité du laboratoire d'Epidémiologie Bactérienne.

5- Matrices alimentaires

5-1 Matrices saumon

5-1-1 Fabrication

Les matrices proviennent d'un site de production de saumon fumé français. A partir d'un même poisson, un des filets a été transformé suivant le procédé de fabrication habituel (salage par injection puis fumage au bois de hêtre) tandis que l'autre a été conservé tel quel puis tranché. Au total, 3 poissons issus d'un même lot de matières premières ont été traités et ont ainsi permis de fabriquer 50 sachets de matrices crues et 50 sachets de matrices fumées, conditionnées en 90 g sous vide. Dès leur sortie de production, l'ensemble a subi un traitement sous rayonnement ionisant de type BETA (électrons accélérés) avec une dose minimale contrôlée de 10,2 kGy. Les sachets ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Un contrôle de stérilité a été réalisé à partir de 6 sachets (3 crus et 3 fumés) après stockage à $+8^{\circ}\text{C}$ pendant 21 jours.

5-1-2 Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des matrices fumées sont indiquées dans le tableau 11 page suivante.

Tableau 11: Caractéristiques physico-chimiques des matrices de saumon ionisées

		Taux humidité	Matières grasses	sel	Phénols
Saumon fumé	Sachet 1	64,1 %	13,0 %	3,0 %	–
	Sachet 2	59,2 %	19,5 %	2,2 %	–
	Sachet 3	62,1 %	16,8 %	2,3 %	–
	Sachet 4	64,3 %	12,2 %	2,8 %	0,70 mg/100g
	Sachet 5	67,3 %	9,3 %	4,8 %	0,72 mg/100g
	Sachet 6	64,8 %	11,9 %	3,2 %	0,74 mg/100g
Saumon cru	Sachet 1	70,2 %	7,9 %	–	–
	Sachet 2	70,9 %	7,9 %	–	–
	Sachet 3	67,3 %	11,7 %	–	–

5-2 Autres matrices

5-2-1 Rillettes de porc

La recherche d'un possible effet matrice a été mis en œuvre à partir de rillettes de porc en conserve portant la mention "rillettes à l'ancienne" fabriquées sans conservateur ni colorant et disponible en grande surface en unités de 78 g.

5-2-2 Lait

Des flacons de lait UHT demi-écrémé conditionnés en 250 ml et disponibles en grande surface ont été utilisés.

6- Extraits de fumée

6-1 Fabrication d'un extrait de fumée

Des boîtes de Petri de diamètre 100 contenant 25 ml d'agar technique à 1% ont été exposées durant 2 heures (sans leur couvercle) dans une cellule de fumoir en activité. La fumée a été produite à partir de bois de hêtre en copeaux et des réglages ont été effectués de façon à obtenir dans l'enceinte une température de 26 °C avec une humidité relative de 65 %.

Puis 5 ml d'eau physiologique ont été ajoutés dans chacune des boîtes et une incubation de 2 heures à 30°C a été réalisée sous agitation douce. L'eau physiologique chargée en composés de la fumée a été ensuite collectée à partir des différentes boîtes et transférée dans un flacon stérile. L'extrait contient une concentration en phénols de 0,9 mg/100ml (résultats d'analyses effectuées en double). Cette concentration correspond à celle retrouvée en moyenne dans les saumons fumés (CEVPM, 1998).

6-2 Caractéristiques de la fumée liquide commerciale

La fumée liquide utilisée pour la mise en œuvre des essais chromatostest est un concentré naturel de fumée produit par une combustion contrôlée d'un mélange de bois durs et est destinée à un

usage industriel pour les produits carnés avec un mode d'application par atomisation. Le fabricant mentionne que le procédé de fabrication de cette fumée liquide permet d'obtenir une fumée dite purifiée exempte de benzopyrène.

Les caractéristiques chimiques du produit sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Caractéristiques chimiques de la fumée liquide commerciale

pH.....	2,5-3,5
Acidité totale (acide acétique).....	7,5-9,5 %
Phénols.....	22,0-26,0 mg/ml
Carbonyls.....	24,0-30,0 %
Densité (moyenne).....	1,13 kg/l

7- Récolte d'isolats dans le poisson fumé

7-1 Origine des prélèvements

Dans le souci de constituer une collection représentative de la filière, la collecte d'isolats issus des poissons fumés à été mise en œuvre à plusieurs niveaux :

➤ Des campagnes de prélèvements ont été réalisées auprès de 2 professionnels sauteurs-saurisseurs Boulonnais pour lesquels des suivis de fabrication de hareng fumé (Entreprise 1) et de saumon fumé (Entreprise 2) ont été mis en œuvre à partir de séries de prélèvements sur les sites en cours d'activité et également après nettoyage et désinfection. Cet échantillonnage a concerné aussi bien l'environnement des ateliers (prélèvements par chiffonnettes) que les produits à différents stades de leur fabrication, à savoir : matières premières, filets avant salage, après salage, après fumage et sortie de fabrication. La détection de *L. monocytogenes* dans les produits finis a été effectuée d'une part après un stockage de 15 jours à +8°C et d'autre part avec une analyse à D.L.C (protocole 2/3 +4°C, 2 h 20°C, 1/3 +8°C).

Outre le hareng (*Clupea harengus L.*) importé d'Islande et de Norvège sous forme de filets congelés, l'entreprise 1 fume également du thon, du lieu, du maquereau et de l'églefin. L'entreprise 2 travaille environ 3 fois plus de hareng que de saumon (*Salmo salar*) et de très faibles quantités de thon. La matière première de cette dernière provient essentiellement de Norvège et est livrée sous glace puis les poissons sont filetés sur le site de production.

L'Entreprise 1 utilise un procédé de fabrication de salage par injection, et l'Entreprise 2 sale les filets de saumon au sel sec.

Tableau 13 : Plan d'échantillonnage pour les 2 ateliers de fumaison E1 et E2.

Étapes du procédé de fabrication	Points de contrôle	Nature et mode de prélèvement
<i>Suivis de fabrication de hareng fumé sur le site E1</i>		
♦Matière 1 ^{ère} congelée origine Islande ou Norvège		
♦Déballage, chargement de chariot par 500 kg	Matière 1 ^{ère}	Chiffonnettes sur l'intérieur des sacs de conditionnement des harengs
♦Cellule de décongélation à air pulsé		
♦Attente en chambre froide +4°C 12h à 18 h maxi	Filets après décongélation	Prélèvements de filets par unité de 200 g Chiffonnettes des bacs inox
♦Rinçage des filets en saumure saturée	Saumure bac rinçage	Prélèvement de 500 ml
♦Salage par injection de saumure	Saumure bac injecteuse Environnement	Prélèvement de 500 ml Tapis de transfert, aiguilles, déchets du filtre rotatif de l'injecteuse.
	Filets après salage	Prélèvements de filets par unité de 200 g
♦Mise sur grilles	Environnement	Chiffonnettes mains des opérateurs
♦Fumage (T° <30°C)		
♦Refroidissement en chambre froide		
♦Mise en chambre froide stockage "tampon"	Filets après fumage	Prélèvements de filets par unité de 200 g
♦Conditionnement	Environnement	Chiffonnettes plans de travail, balances, mains des opérateurs
	Produits finis	Filets sous vide par unités de 200 g
<i>Suivis de fabrication de saumon fumé sur le site E2</i>		
♦Matière 1 ^{ère} , arrivage en frais saumons entiers origine Norvège	Matière 1 ^{ère}	Chiffonnettes des peaux et parties éviscérées Prélèvements de queues et ouïes
♦Déballage (Salle filetage)	Matière 1 ^{ère} Environnement	Chiffonnettes <u>intérieur</u> des caisses Chiffonnettes <u>extérieur</u> des caisses
♦Lavage des saumons au jet d'eau	Environnement	Chiffonnette des parois du bac inox
♦Filetage et parage manuel	Environnement	Chiffonnette sur : lame couteaux, mains des opérateurs, plans de travail
♦Lavage des filets au jet d'eau et mise sur grilles	Filets après lavage Environnement	Chiffonnettes en surface + prélèv. de chair Chiffonnette des bacs inox et plans de travail
♦Salage à sec et maturation à 15°C		
♦Dessalage au jet d'eau	Filets après dessalage	Chiffonnettes en surface + prélèv. de chair
♦Stockage en chambre froide		
♦Fumage à froid (T°<30°C)		
♦Refroidissement en chambre froide	Filets après fumage	Chiffonnettes en surface + prélèv. de chair
♦Tranchage machine et conditionnement	Environnement	Chiffonnettes sur écorcheuse, couteaux et tapis machine à trancher, plans de travail, balances, mains des opérateurs.
	Produits finis	Bandes tranchées reconstituées et sous vide

➤ Une collection de *L. monocytogenes* isolées dans le cadre des auto-contrôles liés à l'activité du laboratoire a été également constituée et associée à ce travail et a permis d'étendre la base de données au secteur des produits de la pêche d'une façon générale.

➤ En parallèle, une campagne de prélèvements de poissons fumés dans la grande distribution a été organisée en fin d'année 2000, sur une période de haute production pour les professionnels de ce secteur. Pour chaque site de production examiné, un minimum de 5 unités de produits finis a été analysé.

7-2 Plans d'échantillonnage des suivis de fabrication

Les suivis de fabrication ont été réalisés tous les mois (1^{ère} campagne de prélèvement en Avril 2000) en alternant chacune des 2 entreprises concernées (chaque industriel 1fois tous les 2 mois). Le tableau 13 résume les différents prélèvements effectués à chaque étape du procédé de fabrication pour le hareng et le saumon fumé. Un total de 50 à 80 prélèvements a été effectués lors de chaque visite des sites en activité.

Avant chaque suivi de fabrication, un contrôle sur le nettoyage et la désinfection a été réalisé par chiffonnage des surfaces et des outils destinés à être en contact avec le produit. Avec cette même technique (chiffonnette), des prélèvements au niveau des grilles d'évacuation des divers ateliers ont été également effectués. Au total, 15 à 17 points de contrôle des sites en période hors activité ont été intégrés au plan d'échantillonnage.

En final, 407 et 254 prélèvements ont été réalisés au cours des 6 et 3 visites organisées respectivement sur les sites E1 et E2 entre avril 2000 et février 2001.

7-3 Modes de prélèvements

7-3-1 Prélèvements réalisés par l'application d'une chiffonnette

Les chiffonnettes destinées à être appliquées sur des surfaces de l'environnement des ateliers (plans de travail, grilles chariot, égouts...) ou sur du petit matériel de production (outil dégraisseur, couteaux...) ont été imbibées d'une solution de Peptone Physiological Saline Solution Tween 80 (PPSST) d'après la formulation décrite par Beumer *et al.* 1996. Le contrôle des matières premières a été également réalisé avec ces mêmes chiffonnettes : pour l'Entreprise 1, elles ont été appliquées sur l'intérieur des emballages de hareng lors du déballage (1 chiffonnette pour 3 plastiques), pour l'entreprise 2 les chiffonnettes ont été directement frottées sur la peau des saumons encore sous glace dans leurs caisses en polystyrène d'origine.

Pour l'entreprise 2, des chiffonnettes imbibées d'eau physiologique ont été également appliquées sur les surfaces des filets de saumon aux diverses étapes de fabrication.

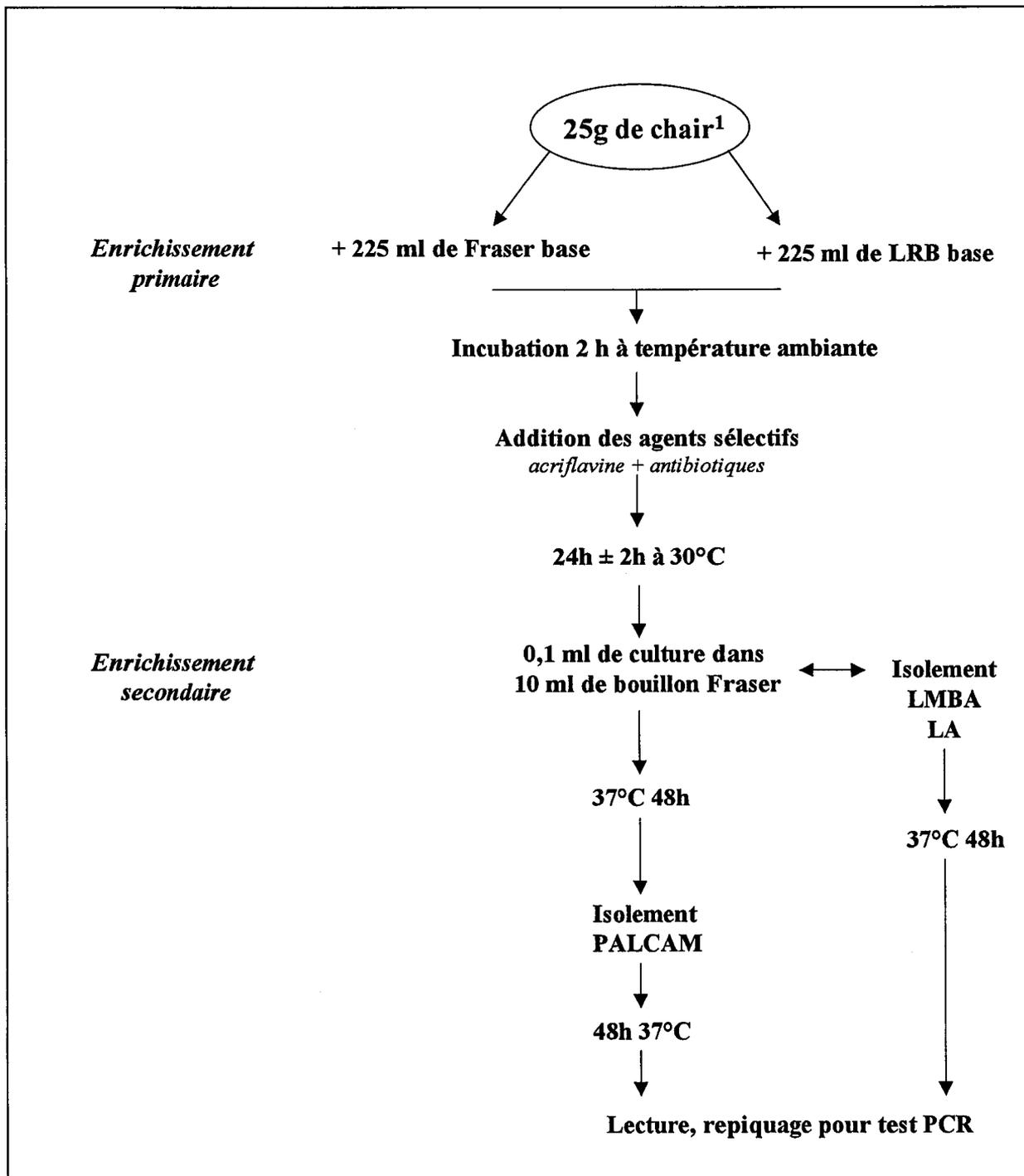


Figure 16 : Schéma du protocole de recherche des *Listeria monocytogenes* utilisé dans le cadre des campagnes de prélèvements sur sites et en grande distribution.

¹ Pour les prélèvements par chiffonnettes, addition de 100 ml de bouillon primaire.

7-3-2 Prélèvements de produits en cours de fabrication et produits finis

Pour le hareng, 5 unités de 200 g de filets ont été prélevées aux étapes suivantes : après décongélation, après salage, après fumage et après conditionnement. Pour le saumon, le suivi a été réalisé sur la base de 3 filets prélevés aux diverses étapes précitées (exceptée la première, remplacée par l'étape après lavage des filets).

A l'arrivée au laboratoire, 3 prélèvements de 25 g ont été réalisés sur chaque unité (1 unité = 200 g pour le hareng et 1 filet pour le saumon).

Les poissons fumés provenant de la grande distribution ont également été analysés sur cette même base à savoir 3 fois 25 g prélevés sur chacun des conditionnements sous vide examinés.

7-3-3 Prélèvements de saumure

Au minimum, 500 ml de saumure ont été prélevés dans des flacons stériles de taille appropriée.

8-Méthodes microbiologiques de recherche des *L. monocytogenes*

8-1 Analyses des surfaces, des produits en cours de fabrication et produits finis

Dans le cadre des campagnes de prélèvements (sur sites ou en distribution), les milieux d'enrichissement primaire Fraser ½ (normes AFNOR NF V 08-055 et NF EN ISO 11290) et LRB (Busch et Donnelly 1992, Ryser *et al.* 1996) ont été utilisés en parallèle afin d'éviter le plus possible la sélection de clones par les milieux de culture (récupération de la diversité des génotypes). La recherche a été réalisée suivant le schéma du mode opératoire décrit dans l'annexe A de la méthode de routine AFNOR NF V 08-055 avec les modifications suivantes : les isolements à partir des enrichissements primaires ont été réalisés à la fois sur une gélose sélective LA (*Listeria* selective Agar, Johansson, 1998) et sur milieu LMBA (*Listeria monocytogenes* blood Agar, Johansson, 1998). Les enrichissements secondaires ont été isolés uniquement sur gélose Palcam (norme AFNOR NF V 08-055). La suspension mère a été réalisée en procédant à une dilution au 1/10 pour les prélèvements de chair (25 g homogénéisés au stomacher avec 225 ml de bouillon) et par addition de 100 ml de bouillon pour les analyses de surfaces effectuées avec une chiffonnette. Dans tous les cas, une étape de revivification de 2 h à température ambiante a été respectée avant addition de l'acriflavine et des antibiotiques : supplément SR0156E (Oxoid, Unipath) dilué 2 fois pour le Fraser ½ et supplément SR141E (Oxoid, Unipath) pour le L.R.B.

La figure 16 résume les différentes étapes de ce mode opératoire.

Les produits finis ont été analysés après des temps de stockages en armoires réfrigérées suivant les protocoles suivants :

- la moitié des unités analysées a été placée 15 jours à + 8°C ,
- l'autre partie a été placée pour 2/3 du temps de la DLC à + 4°C puis une rupture de chaîne du froid de 2 h à 20°C a été réalisée avant de poursuivre avec une incubation correspondant à 1/3 du temps de la DLC à + 8°C.

Dans le cadre des auto-contrôles réalisés par le laboratoire de Boulogne sur mer, la recherche de *L. monocytogenes* a été réalisée suivant le protocole décrit dans la méthode de routine norme AFNOR NF V 08-055.

8-2 Analyse de la saumure

A partir des 500 ml de saumure prélevés, 4 aliquotes de 120 ml ont été réalisées dans des tubes stériles à fonds ronds (réf 20192, Polylabo), selon le protocole suivant : 60 ml de saumure/tube ont été centrifugés une première fois pendant 5 minutes à 10 000 g. Après élimination du surnageant, 60 ml ont été rajoutés sur le culot et une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions a été effectuée. En final le culot est repris avec 50 ml de bouillon d'enrichissement primaire (2 tubes en Fraser + 2 tubes en L.R.B. soit au total une détermination sur 480 ml/prélèvement de saumure). Après 2 h d'attente à température ambiante du laboratoire, les agents sélectifs sont ajoutés pour chacun des milieux et les étapes suivantes du protocole sont celles décrites en 8-1

9-Méthodes de biologie moléculaire

9-1 Identification de l'espèce *L. monocytogenes* par PCR multiplex

9-1-1 Purification des isolats

Dans un premier temps, 2 à 3 colonies caractéristiques par milieu d'isolement (vertes avec une dépression centrale et entourées d'un halo noir sur gélose LA et Palcam; blanches et entourées d'une zone étroite de β -hémolyse sur gélose LMBA) sontensemencées en stries sur la surface d'une gélose LA, préalablement séchée, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées. Au total, 6 à 9 isolats sont repiqués par prélèvement positif. Les boîtes sont incubées 48 h à 37°C.

9-1-2 Réalisation d'une culture pure

A partir de chaque boîte de réisolement, une seule colonie est mise en culture sur gélose tryptone soja-extrait de levure (TSA-YE, NF V 08-055). Les boîtes sont placées 18 h à 24 h dans une étuve réglée à 37°C.

9-1-3 Préparation de la suspension d'ADN pour la réalisation de la PCR

A partir de chaque boîte de TSA-YE, une oese de 1 µl de culture est prélevée et transférée dans un microtube 1.5 ml contenant 100 µl d'eau stérile. La suspension doit être bien homogénéisée à l'aide de l'oese. Les tubes sont alors placés dans un bloc chauffant ajusté à 95°C pendant 25 minutes. Une centrifugation 1 minute à 13 000 g est ensuite réalisée. La PCR est effectuée avec 3 µl prélevés à la surface de cette préparation. Celle-ci peut être utilisée pendant 1 semaine au maximum si elle est conservée à +4°C et sous réserve de procéder à une centrifugation extemporanément.

9-1-4 Réalisation de la PCR multiplex

Les informations relatives aux amorces utilisées pour la PCR multiplex sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 14 : Amorces de la PCR multiplex pour l'identification de l'espèce *L. monocytogenes*

Gène cible	Nom	5'	Amorces	3'	Réf	Taille du fragment
16 S	LISF		CAAGGATAAGAGTAACTGC		a	1003 pb
	LISR		AGGTKACCCTACCGACTTC			
<i>hly</i> (listeriolysine)	LF		CAAACGTTAACAACGCAGTA		b + c	755 pb
	A220		CGTATCCTCCAGAGTGATCG			
<i>iap</i> (protéine P60)	P60F		ACAAGCTGCACCTGTTGCAG		a	593 pb
	P60R		GAACCTTGATTAGCATTCGT			

a Herman *et al.* 1995. J. of Food Protection

b Bansal *et al.* 1996. Int. J. of Food Microbiol. (pour LF)

c Paziak *et al.* 1999. FEMS Microbiol. Lett. (pour A220 moins 4 bases en 5' par rapport à la séquence publiée)

La réaction d'amplification est effectuée dans un volume réactionnel total de 50 µl contenant : du tampon Gold (1X, Perkin-Elmer), 2,5 mM MgCl₂, 0,3 µM des amorces LISF et LISR, 0,5 µM des amorces LF, A220, P60F, P60R, 200 µM de dNTP et 1 U d'AmplitaqGold (Perkin-Elmer) auxquels sont ajoutés 3 µl d'ADN matrice préparé selon le protocole décrit en 4-1-3. Les conditions thermiques de la PCR sont les suivantes : 95°C 10 min puis 30 cycles de 94°C 15 sec, 50°C 30 sec, 72°C 1,30 min. La réaction finale est complétée par un cycle d'extension de 10 min à 72°C.

9-1-5 Conditions d'électrophorèse et interprétation des résultats

Après amplification, 8 µl de produit PCR sont mélangés à 2 µl de tampon de charge de type III (Sambrook *et al.* 1982).

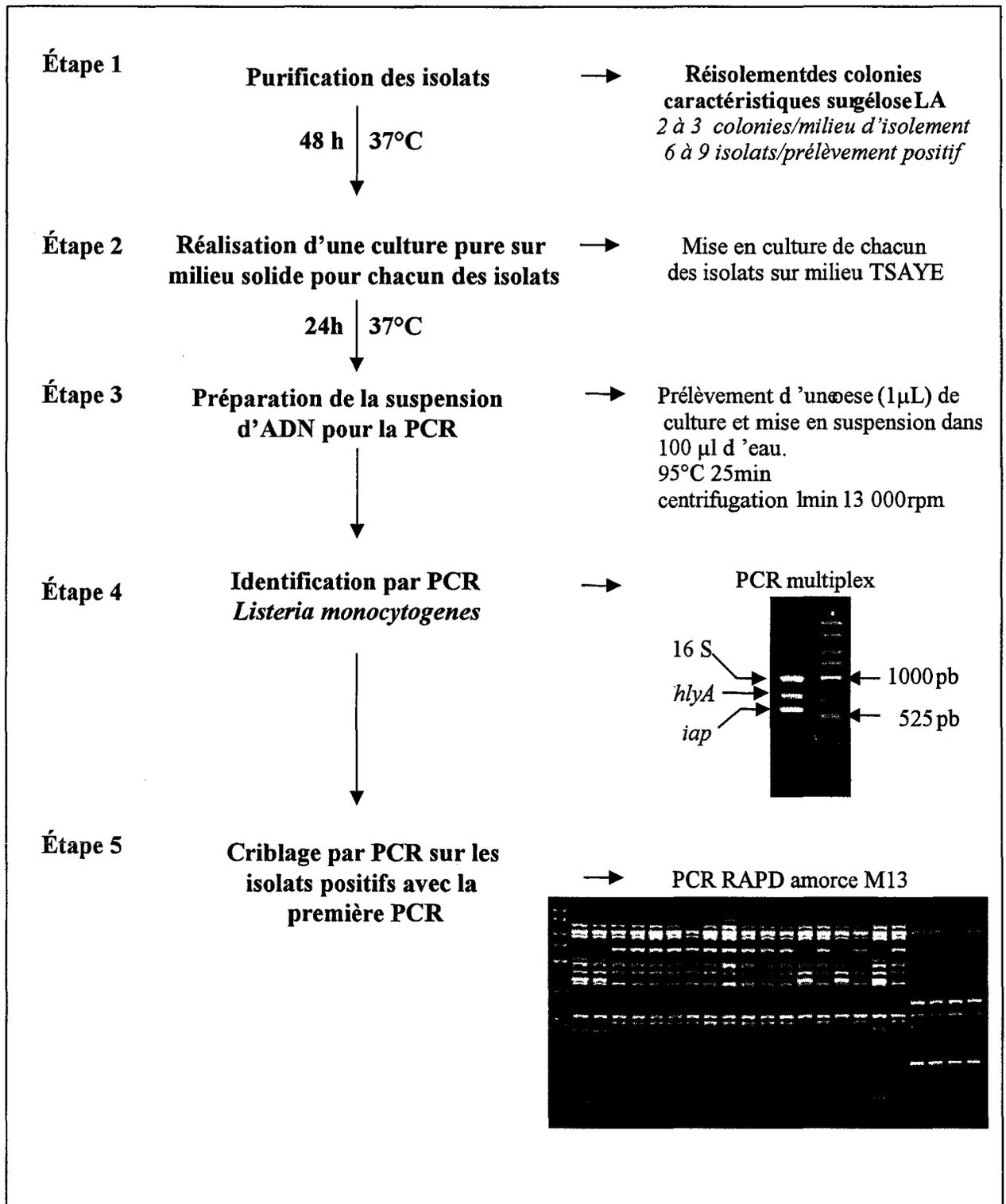


Figure 17 : Résumé des étapes de confirmation par PCR de l'espèce *L. monocytogenes* et du criblage des isolats par RAPD M13 en vue du typage par macrorestriction.

Le tout est déposé sur un gel d'agarose 0,8 % en tampon TBE 1X (89 mM Tris-HCl, 89 mM acide borique, 2,5 mM EDTA, pH 8,3). Le BET (bromure d'éthidium) est préalablement ajouté au gel après sa fusion, à raison de 0,3 µg/ml. Le marqueur de taille Euroladder L (Eurobio) (10µl) est inclus dans chaque gel afin de vérifier la taille des produits PCR obtenus. L'image est révélée sous U.V. et une réaction est considérée comme positive (identification de *L. monocytogenes*) dans les 2 cas de figure suivants : si les 3 fragments sont présents ou s'il ne manque que le fragment correspondant à l'amplification de l'hémolysine (cas identifié à partir des souches appartenant au groupe génétique 1).

9-2 Méthode de criblage rapide des isolats par RAPD

A partir des isolats confirmés *L. monocytogenes* par la méthode PCR multiplex, une PCR RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) est mise en œuvre. Celle-ci permet de distinguer rapidement les génotypes différents pour un même prélèvement positif.

Au total trois amorces ont été testées au cours de la série des pré-essais.

9-2-1 Amorces HLWL74 et UBC 127

Les deux amorces HLWL74 (Mazurier *et al.* 1992) et UBC127 (Farber *et al.* 1994) dont les séquences sont respectivement 5' ACGTATCTGC 3' et 5' ATCTGGCAGC 3' ont été sélectionnées dans un premier temps pour leurs performances relevées lors de travaux antérieurs (Giovannacci *et al.* 1999). Les conditions d'utilisation ont été toutefois légèrement modifiées et sont identiques pour les deux amorces. La réaction d'amplification est effectuée dans un volume réactionnel total de 20 µl contenant : du tampon II (1X, Perkin-Elmer), 3,5 mM MgCl₂, 1 µM d'amorce HLWL74 ou UBC127, 200 µM de dNTP et 1 U de ADN polymérase *Taq* (Amersham Pharmacia biotech) auxquels sont ajoutés 2 µl d'ADN matrice préparé selon le protocole décrit en 9-1-3. La programmation thermique comprend une première étape de dénaturation à 95°C pendant 3 min suivie de 3 cycles de 94°C 1 min, 36°C 2 min et 72°C 2,3 min puis 40 cycles de 94°C 15 sec, 40°C 45 sec et 72°C 1 min. La réaction finale est complétée par un cycle d'extension de 10 min à 72°C.

9-2-2 Amorce M13

Lors de la série d'essais pilote, l'amorce M13 (Allerberger *et al.* 1997) a été également évaluée. Sa séquence est donnée ci-après : 5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'. Les résultats ont permis de la sélectionner comme la plus appropriée sur le plan du pouvoir discriminant et de la reproductibilité. La suite des travaux a donc utilisé cette amorce comme outil de criblage des souches.

Le mélange réactionnel reprend les mêmes conditions décrites pour les 2 amorces précédentes (mais avec 1 μM de l'amorce M13). En revanche, les conditions thermiques sont différentes et comprennent une première étape de dénaturation à 95°C 3 min puis 35 cycles de 94°C 20 sec, 50°C 1 min, 72°C 20 sec. La réaction finale est complétée par un cycle d'extension de 10 min à 72°C.

9-2-3 Conditions d'électrophorèse

Après amplification, 4 μl de tampon de charge de type III (Sambrook *et al.* 1982) sont ajoutés dans chaque tube PCR et 12,5 μl de ce mélange sont déposés sur un gel d'agarose 2,5 % en tampon TBE. Le BET est préalablement inclus au gel après sa solubilisation, à raison de 0,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Le marqueur de taille Euro ladder L (Eurobio) (10 μl) est déposé dans chaque gel sur une piste afin de pouvoir comparer les profils issus de gels différents.

La figure 17 p75 résume les étapes d'identification de criblage des isolats de *L. monocytogenes*.

9-3 Méthode de typage par macrorestriction

9-3-1 Préparation des inserts

Le protocole utilisé est celui qui a été développé par le CDC et récemment publié par Graves *et al.* (2001). Le mode opératoire permet de préparer l'ADN matrice au cours d'une même journée (pour des séries de 20 à 24 souches).

Chaque clone bactérien de *L. monocytogenes* est mis en culture sur gélose TSA-YE 24 heures à 37°C. Après avoir vérifié la pureté de la culture, les bactéries sont récupérées en inondant les boîtes avec 2,5 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na₂EDTA). Les surfaces des géloses sont grattées à l'aide d'une oese et la suspension obtenue est ensuite transférée dans un microtube 2 ml stérile. Cette suspension cellulaire est ensuite ajustée à une densité optique de 1,3 à $\lambda = 610 \text{ nm}$ avec du TE et correspond approximativement à 2,6 10^9 ufc/ml. A partir de 240 μl de solution ajustée, 60 μl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml sont additionnés et le tout est incubé 10 min à 37°C. Les inserts sont alors préparés en ajoutant dans chaque tube 300 μl d'un gel SSP (1% agarose standard, 1% sodium dodecyl sulfate, 0,2 mg/ml de protéinase K). Après une homogénéisation rapide, 100 μl de ce mélange sont immédiatement déposés dans des moules rectangulaires (Bio-Rad) puis sont laissés solidifier 15 minutes à +4°C. Les blocs d'agarose obtenus sont ensuite incubés dans une solution de lyse (4 ml/bloc) contenant 50 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1% lauryol sarcosine, 150 $\mu\text{g/ml}$ de

protéinase K. Le tout est incubé sous agitation douce à 54 °C pendant 2 h. Deux lavages en eau stérile préchauffée à 50°C sont ensuite réalisés (15 ml/tube) sous agitation douce pendant 10 min à 50°C. Enfin, les blocs sont lavés encore 4 fois en TE préchauffé à 50°C dans les mêmes conditions d'agitation que précédemment et pendant 15 min à 50°C. Chaque bloc est ensuite découpé en 4 miniblocs, lesquels sont conservés en TE à +4°C jusqu'à leur utilisation.

9-3-2 Macrorestriction

Un minibloc est utilisé pour la digestion dans un volume réactionnel de 100 µl avec 10 unités d'endonucléase *ApaI*, *SmaI* ou *AscI* (New England Biolabs, Ozyme, France) dans des réactions séparées suivant les recommandations du fabricant pour une incubation de 18-20 h à la température appropriée pour chacune des enzymes. Chaque minibloc est ensuite inséré dans un gel d'agarose 1,2 % préparé avec du tampon TBE 0,5 X (44,5 mM Tris-HCl, 44,5 mM acide borique, 1 mM EDTA, pH 8,3) (Sigma, France).

9-3-3 Conditions de migration

La séparation des fragments d'ADN est réalisée par le système d'électrophorèse en champs pulsés CHEF III (Bio-Rad, France) avec les programmations suivantes pour la construction de la base de données d'empreintes génétiques de Boulogne :

- pour *ApaI*, 15-35 sec 9 h puis 2-20 sec pendant 15 h;
- pour *SmaI*, 8-35 sec 10 h, 5-10 sec 10 h et 2-4 sec pendant 4 h;
- pour *AscI*, 15-45 sec, pendant 20 h.

Toutes les migrations se déroulent à +14 °C et à 7,6 V/cm en insérant toutes les 8 pistes, le marqueur moléculaire lambda ladder (PFG Marker, New England Biolabs).

Tous les profils *ApaI* compris entre 48 et 300 kb ont été déterminés plus précisément en appliquant une deuxième électrophorèse avec les conditions de migrations suivantes :

- pour *ApaI* et *SmaI* : 2-20 sec 15 h, puis 2-8 sec pendant 9 h.

Pour la réalisation des comparaisons inter-filières (inter bases de données avec les profils collectés à l'unité d'Épidémiologie Bactérienne de l'Afssa de Maisons Alfort), d'autres conditions de migrations ont du être appliquées en utilisant la souche de *L. monocytogenes* H2446 (Graves *et al.* 2001) digérée par *AscI* dans les pistes de références servant à l'alignement des profils.

Pour ce travail, la programmation PFGE a été la suivante :

- pour *ApaI* et *AscI*, 4-40 sec pendant 23 h, à 6V/cm et à 14°C.

Dans tous les cas, les profils ont été révélés sous U.V. après coloration des gels dans un bain de BET.

9-4 Digestion du génome par *Sau3AI/MboI*

Pour cette analyse, l'ADN matrice préparé en 9-3-1 pour la macrorestriction est utilisé. Un minibloc est digéré dans des réactions séparées et en parallèle avec 20 U d'enzyme *MboI* et *Sau3AI* (Amersham Pharmacia Biotech) dans un volume final de 100µl avec respectivement les tampons appropriés. Une incubation de 5 h à 37°C est ensuite mise en œuvre à l'issue de laquelle, les miniblocs sont insérés dans un gel d'agarose 2 % pour une migration de 4 h à environ 4V/cm. Le BET est préalablement inclus au gel après sa solubilisation, à raison de 0,3 µg/ml. Le marqueur de taille Euro ladder L (Eurobio) (10µl) est déposé dans chaque gel sur les pistes extérieures.

10- Test de génotoxicité

Le SOS chromotest a été mis en œuvre uniquement dans sa version "SOS spot test" suivant la procédure développée par Quillardet *et al.* (1985). Le principe utilise une souche *E.coli* K12 (souche PQ37) qui porte une fusion génétique entre le gène *lacZ* (β -galactosidase) et le gène *sfiA* qui est sous contrôle du répresseur *LexA* du système SOS. Le test permet d'évaluer de façon colorimétrique l'aptitude d'un agent à endommager l'ADN.

10-1 Mise en culture de la souche test *E. coli* PQ37

La veille du test, la souche test PQ 37 est remise en culture en prélevant une oese de 1 µl en surface des cryotubes (sans décongélation préalable) transférée ensuite dans un tube de 5 ml de bouillon LB (tryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l et NaCl 5g/l) additionné extemporanément d'ampicilline à raison de 20 µg/ml. Le tout est incubé 18-20 h à 37 °C.

10-2 Préparation du milieu de base M63

Dans un premier temps la gélose M63 est préparée suivant la formulation suivante pour 1 litre : Agar technique 15 g, KH_2PO_4 13,6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g. Après dissolution, le pH est ajusté à 7 avec une solution de KOH. Le tout est ensuite porté à ébullition puis est réparti en tubes de 20 ml avant d'être autoclavé 15 min à 121°C.

10-3 Préparation des boîtes STA

Les boîtes de milieu STA (Spot Test version A, sans activation métabolique) sont préparées comme indiqué ci-après. Au moment de l'emploi, il faut rajouter à chaque tube de milieu M63 refroidis à 45-50°C les solutions suivantes :

- 40 µl d'une solution de lactose à 20%
- 10 µl d'une solution de glucose à 20%
- 40 µl d'une solution de tryptophane à 1%
- 40 µl d'une solution de thréonine à 1%
- 40 µl d'une solution d'histidine à 1%
- 40 µl d'une solution d'uridine à 1%
- 40 µl d'une solution de thiamine à 1%
- 40 µl d'ampicilline à 10 mg/ml
- 40 µl de Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside, 20 mg/ml en diméthyl formamide)

Puis, le milieu ainsi complété est aussitôt coulé en boîte de Petri Ø 90 ou 100.

Après solidification, une couche de gélose "Top Agar" est coulée en surface des boîtes. Cette dernière est préalablement préparée comme suit : pour un volume d'un litre le milieu contient 8 g d'Agar technique et 8 g de NaCl. Le tout est porté à ébullition, réparti en tubes de 2,5 ml et autoclavé 15 min à 121°C. Au moment de l'emploi, la culture de la souche PQ37 obtenue en 4-5-1 est ajustée à une densité optique de 0,5 à $\lambda = 600$ nm et 100 µl de cette dernière sont prélevés et homogénéisés à chaque fraction de Top Agar maintenues en surfusion. Les couches de gélose ainsi préparées sont déposées immédiatement dans chaque boîtes de Petri.

10-4 Mise en œuvre du test

Déposer au centre de la boîte 10 µl du produit à tester puis après quelques minutes de séchage à température ambiante, mettre à incuber 24 h à 37°C. Un résultat positif est visualisé par l'apparition d'un anneau bleu autour du produit déposé en surface.

Les différentes étapes du test sont résumées dans la figure 18 page suivante.

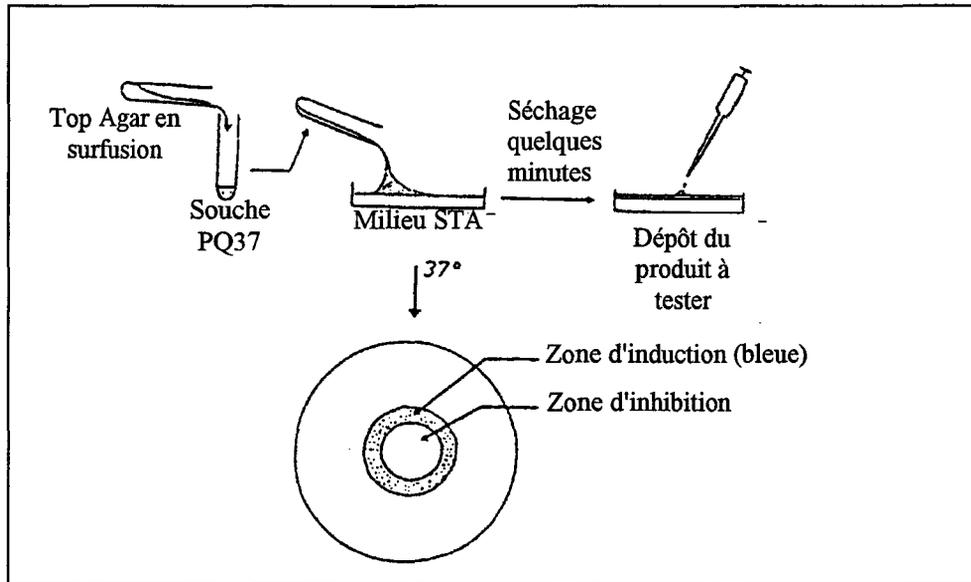


Figure 18 : Principales étapes du SOS spot test (Quillardet et al. 1985)

11- Caractérisation du phénotype

11-1 Sérotypage

Le sérotypage permet de caractériser les souches selon leur structure antigénique. Les souches de *L. monocytogenes* peuvent être différenciées selon 13 sérovars : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7 (tableau 13, p 80). La méthode est basée sur des tests d'agglutination sur lame résultant d'une réaction spécifique antigène (cellules bactériennes)-anticorps (sérum) et est réalisée à partir de la trousse de sérum Eurobio (réf 900059).

11-1-1 Antigènes somatiques

La souche est préalablement cultivée sur gélose en pente BHIA (milieu cœur-cervelle + agar technique 10g/l) pendant 24h à 37°C. L'agglutination est plus facile à obtenir avec une culture fraîche de 24 h.

11-1-1 a Agglutination sur lame avec des sérums de type O polyvalents

Avec une oese, prélever 1 ou plusieurs colonies et homogénéiser avec 1 goutte de sérum préalablement déposée sur une lame. L'agglutination apparaît en moins d'une minute et se manifeste par de petits amas blancs et un éclaircissement du liquide. Un témoin négatif est réalisé en parallèle avec la souche homogénéisée dans du liquide physiologique et permet de vérifier que celle-ci n'est pas autoagglutinable.

11-1-1 b Agglutination sur lame avec les sérums de type O monovalents

Lorsqu'une réaction positive est observée avec l'un des sérums polyvalents, le test se poursuit suivant les indications ci-après en fonction des cas de figure. Le nom du (des) sérum (s) donnant une réaction d'agglutination positive indique le nom de l'antigène O de la souche de *L. monocytogenes* testée.

a- Réaction positive au sérum OI/OII : rechercher une agglutination avec les sérums OI, puis OIV.

b-Réaction positive au sérum OV/OVI : rechercher une agglutination avec les sérums OVI, OVII, OVIII, OIX.

Avec les sérums actuellement commercialisés, il n'est pas possible de distinguer les sérotypes 4b et 4e si les antigènes OVIII et OIX ne sont pas exprimés. De plus, il semble que le sérum OIX d'Eurobio ne soit pas très spécifique. Dans l'interprétation des résultats, les sérotypes 4e et 4b/4e ne seront donc pas différenciés.

11-1-2 Détermination de l'antigène flagellaire

A partir de la culture réalisée en 5-1, une colonie est prélevée avec un fil droit et un tube de gélose BHI semi molle (milieu cœur-cervelle + agar technique 4,5g/l) est ensemencé par piqûre centrale puis conservé à température ambiante pendant 48 h. A l'issue de cette incubation, les bactéries ayant le plus migré horizontalement dans la gélose sont prélevées avec une oese pour réaliser une subculture en bouillon cœur-cervelle. Cette dernière est incubée 24 h à température ambiante.

a- En premier lieu, 1,2 ml de culture sont dilués avec 1,2 ml d'eau physiologique. Deux gouttes de chaque antiserum sont réparties dans des tubes à hémolyse distincts (soit 4 tubes, sérums A, AB, C et D), puis 0,5 ml de suspension bactérienne sont ajoutés. Le restant de culture servira de témoin négatif.

b-Après avoir été homogénéisés, les tubes sont placés dans un bain marie à 50-52°C pendant 1h30 (l'incubation peut être prolongée jusqu'à 3 h si le résultat n'est pas assez lisible).

c-En prenant soin de ne pas agiter les tubes, une agglutination évidente à l'œil nu doit être observée pour considérer la réaction comme positive. Cette dernière se présente par un éclaircissement de la suspension et un dépôt en "galette" au fond du tube.

Le nom de (des) antiserum (s) produisant une réaction positive indiquera le nom de l'antigène H de la souche de *L. monocytogenes* testée.

En final, la détermination du sérotype se fera en se référant au tableau ci-dessous :

Tableau 15 : Détermination du sérotype pour une souche de *L. monocytogenes*.

Antigènes somatiques									Antigènes flagellaires				Sérotype	
Témoin	OI /OII	OV /OVI	OI	OIV	OVI	OVII	OVIII	OIX	Tém	A	AB	C		D
-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	1/2a
-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	1/2b
-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	1/2c
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	3a
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	3b
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	3c
-	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	4a
-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	4ab
-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4b
-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4c
-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	4d
-	-	+	-	-	+	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	4e
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	7

11-2 Mise en œuvre des tests de croissance

11-2-1 Souches sélectionnées

Pour ce test, 3 souches issues de la collection "produits de la pêche" ont été sélectionnées. Les données reliées à ces souches figurent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16 : Informations relatives aux souches sélectionnées pour les tests de croissance.

n°souche	Date d'isolement	Nature du prélèvement	sérotype	pulsotype	Groupe génétique
CP512AS1	11/12/2000	Saumon fumé	1/2a	T6g	6
D139OT	9/01/2001	Saumon fumé	1/2c	T7e	7
DSS1039BFA1	20/07/2001	Hareng fumé	4b/e	T19	19

Toutes trois appartiennent à des groupes génétiques significativement associés aux prélèvements de saumon. La souche de pulsotype T19 présente un profil génétique en *ApaI*, *AscI* et *SmaI* identique au type clonal "yellow clone", impliqué dans des listérioses d'origine alimentaire dans au moins 5 pays différents.

11-2-2 Préparation des inoculums

A partir d'une culture sur gélose en pente BHIA (Broth Heart Infusion Agar) de 18 h à 37°C, les bactéries sont remises en suspension dans 2 ml d'eau physiologique tamponnée. Une dilution au 1/10 est réalisée pour déterminer la densité optique à 620 nm et la suspension est alors ajustée à 10^7 listeria/25 µl dans un volume total de 500 µl. Des séries de dilutions au 1/10 en eau phi tamponnée sont réalisées de façon à obtenir en final 10 *Listeria*/25µl (= dilution notée 10^1).

11-2-3 Contamination des matrices pour le test

Sous une hotte à flux laminaire, les sachets de matrices ont été déconditionnés stérilement puis des portions de 25g ont été réalisées. Sur chacune d'elles, à l'aide d'un cône à filtre, 25 µl de la dilution 10^2 (100 bactéries/25 µl) de la souche en test ont été répartis sur toute la surface des portions. En parallèle un dénombrement en double a été réalisé sur milieu TSA-YE en déposant 200 µl de la dilution 10^1 (10 bactéries /25 µl) afin de déterminer le nombre de bactéries théorique déposé sur chaque matrice (lecture après 24-48 h à 37°C). Après 10 minutes de séchage, chacune des unités de saumon contaminées a été remise sous vide puis l'ensemble a été stocké à +8°C jusqu'à la réalisation des essais (prélèvement tous les 2/3 jours avec une durée maximum de 21 jours).

11-2-4 Réalisation des dénombrements après stockage des matrices à +8°C.

A partir d'une portion de 25 g de saumon, 225 ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT) ont été rajoutés. Puis l'ensemble a été broyé au stomacher pendant 1 min. Un temps d'attente de 15 minutes à température ambiante a été respecté avant de procéder à des séries de dilutions au 1/10 de la suspension mère (tubes de 9 ml d'EPT). L'ensemencement a été réalisé suivant la méthode dite de la "boite coulée" : 1 ml de chaque dilution appropriée a été déposé par boîte puis le milieu en surfusion a été ajouté. Chaque dilution a été ensemencée en double. Deux milieux de culture ont été utilisés en parallèle : TSA-YE (milieu non sélectif) et Palcam (milieu sélectif). En final, les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies après 24-48 h d'incubation à 37°C ont été retenues et à partir de celles-ci une moyenne a été calculée.

12- Caractérisation de la virulence

12-1 Méthodes de culture cellulaire

12-1-1 Entretien de la lignée, conditions de culture

La lignée cellulaire HT-29 a été utilisée entre 15 et 50 passages de culture, réalisés dans des flacons de 75 cm² (Costar code 3375) avec le milieu prêt à l'emploi DMEM à 4,5 g/l de glucose (DMEM GlutaMax™, code 61965-06, Life & Technologies) supplémenté avec 10 % sérum de veau foetal (SVF) (code 10270106, Life & Technologies). En routine, les antibiotiques suivants ont été additionnés pour 100 ml de milieu en final, exceptés pour les tests en microplaques : 0,1 ml de mélange pénicilline (5000 U/ml)-streptomycine (5mg/ml) (réf P4458, Sigma) et 1 ml d'amphotéricine B (réf 15290-018, Life & Technologies). Les

cultures ont été réalisées dans un incubateur (Hera Cell, Heraeus) avec une humidité relative de 90 %, à 37°C et sous 5 % CO₂.

Les cellules ont été trypsinées 2 fois par semaine pour les détacher de leur support et les réensemencer à une concentration inférieure. Chaque opération correspondant à 1 passage a été réalisée en incubant le tapis cellulaire confluent avec 4 ml de milieu Trypsine-Versène (ATV) préparé comme suit. Pour un volume d'1 litre, le milieu ATV est composé de : 8 g NaCl, 1 g KCl, 1,1 g de glucose hydraté (C₆H₁₂O₆H₂O), 0,58g de bicarbonate de sodium (NaHCO₃), 0,2 g d'EDTA hydraté (C₁₀H₁₄N₂O₂Na₂2H₂O), et 2 g de trypsine (T4799, Sigma). Après dissolution complète des ingrédients, le pH est ajusté à 7,1-7,2 si nécessaire puis la solution est filtrée à 0,22 µm, répartie en flacon de 50 ml et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation. Après incubation du tapis cellulaire avec l'ATV pendant 15 minutes environ à 37°C, les amas de cellules sont dissociés par aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette en verre puis le tout est transféré dans un tube à centrifuger contenant 4 ml de SVF pour stopper l'action de la trypsine. Après rinçage du flacon de culture à l'eau physiologique tamponnée, le culot cellulaire est récupéré par centrifugation 10 minutes à 20°C et 190 g puis est repris avec 4 ml de DMEM base (milieu non additionné). Un flacon de culture contenant 25 ml de DMEM complet (SVF + antibiotiques) est alors ensemencé avec 1 ml des cellules remises en suspension par aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette en verre.

12-1-2 Test plages de lyse en microplaque P96

12-1-2 a Préparation des microplaques

Afin d'obtenir des tapis confluent après 4 ou 5 jours d'incubation à 37°C sous 5 % de CO₂, il faut ensemencer les microplaques P96 (code 19270.01, Polylabo) avec respectivement 3.10⁴ ou 2.10⁴ cellules HT-29 trypsinées comme précédemment par puits et cultivées en milieu DMEM avec antibiotiques. La veille de la mise en œuvre des tests, le milieu de culture est éliminé et remplacé par du DMEM additionné seulement de SVF (sans antibiotiques).

Notes : en microplaque P6 (code 353046, Elvetec), pour un ensemencement à 4 jours, il faut déposer 9. 10⁵ bactéries /puits.

12-1-2 b Préparation des inoculums de *L. monocytogenes*

La veille des tests, les souches ont été en premier lieu mises en culture en prélevant une oese de 1 µl en surface des cryotubes sans décongélation préalable puis en la déposant dans 3 ml de bouillon cœur-cervelle. Après 7 h ± 1h d'incubation à 37°C, des géloses en pente BHIA (milieu cœur-cervelle à 15g/l d'agar technique) ont été ensemencées avec environ 0,3 ml de

chaque culture déposés en surface. Après élimination du surplus, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 16-18 h.

Le jour du test, les bactéries sont remises en suspension en déposant dans chaque tube environ 2 ml d'eau physiologique tamponnée. Après passage au vortex, les cultures sont transférées dans des tubes hémolyses et une estimation de la concentration bactérienne est déterminée par mesure de la densité optique à 620 nm avec $DO = 0,15$ correspondant à 3.10^8 bactéries/ml. Sur cette base, une suspension à 10^7 bactéries/25 μ l de DMEM base est réalisée dans un volume final de 500 μ l.

12-1-2 c Etape d'infection des cellules

A partir de la suspension ajustée à 10^7 bactéries/25 μ l (dilution 10^7), des séries de dilutions au 1/10 en DMEM base sont réalisées de façon à obtenir en final une concentration de 10 bactéries/25 μ l (dilution 10^1). L'étape d'infection du tapis cellulaire est réalisée pendant 2 h à 37°C en ayant déposé au préalable en triple de 10^2 à 10^7 bactéries/puits. En parallèle, une numération sur boîtes est réalisée en double avec 200 μ l de la dilution 10^1 (lesquelles sont ensuite additionnées d'environ 12 ml de milieu TSA-YE maintenu en surfusion à 48°C puis incubées 24 h à 37°C). A l'issue de la période d'incubation, les *L. monocytogenes* n'ayant pas pénétré les cellules sont détruites en procédant à un traitement à la gentamicine à raison de 100 μ g/ml de milieu de culture, laissés en contact pendant 1h30 à 37°C. Chaque puits est ensuite recouvert d'un gel à 0,48 % d'agarose à bas point de fusion (code 11408-02 SERVA, Coger France) en DMEM supplémenté de gentamicine à 10 μ g/ml. Ce même milieu est ensuite déposé en surface pour éviter une carence nutritionnelle des cellules et le tout est incubé 20-24 h à 37°C en incubateur sous CO_2 .

Le détail des volumes déposés par puits suivant le type de microplaque (P96 ou P6) pour chaque étape du protocole figure dans le tableau ci-dessous :

Tableau 17 : Détails du mode opératoire du test *in vitro* en culture cellulaire.

Étapes du test	Produit distribué	Volumes déposés/puits	
		microplaque P96	microplaque P6
<u>Infection</u>	Suspensions bactérienne ajustées	25 μ l déposés en triple	1 ml déposés en double
<u>Destruction des <i>Listeria</i> extracellulaires</u>	DMEM + gentamicine 100 μ g/ml (G1397, Sigma).	100 μ l	3 ml
<u>Réalisation du test</u>	Solution d'agarose	100 μ l	3 ml
	DMEM + gentamicine 10 μ g/ml	50 μ l	1 ml

12-1-2 d Lecture des résultats

La numération des plages de lyse par puits est déterminé sous microscope inversé (objectif 10 X). Les résultats sont exprimés pour $7 \log_{10}$ bactéries /puits.

12-2 Protocoles de recherche d'un effet de la matrice saumon

12-2-1 Souches sélectionnées

Pour les premières séries d'expérimentations, 2 souches ont été sélectionnées. Les données reliées à ces souches figurent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 18 : Informations relatives aux souches sélectionnées pour les tests matrice.

n°souche	Date d'isolement	Origine	sérotype	pulsotype	Groupe génétique
CIP103322	1987	Cas humain, épidémie Suisse	4b	T19	19
D1093PS1	26/03/2001	Saumon fumé	1/2a	T1	1

La souche DSS1039BFA1 a été par la suite utilisée et ses caractéristiques figurent dans le tableau 16 p 83. Cette dernière présente le même type moléculaire (sérotype et pulsotype) que la souche CIP103322.

12-2-2 Contamination des matrices pour une incubation de 8-14 jours

La préparation des inoculums et le mode de contamination mis en œuvre sont identiques à ceux décrits pour les tests de croissance. Toutefois les dilutions 10^3 et 10^4 ont été utilisées au lieu de la 10^2 (paragraphe 11-2-3). Au moment de la réalisation des tests de plages de lyse, une portion de 25 g de saumon contaminée est additionnée de 225 ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT). L'ensemble est broyé dans un sac stomacher à filtre (code 8050501, Polylabo) pendant 1 min et correspond à la suspension mère notée 10^{-1} . Des séries de dilutions au 1/10 sont ensuite réalisées dans du DMEM base et servent pour infecter le tapis cellulaire en double par dilution.

12-2-3 Contamination pour une incubation d'1 heure

12-2-3-a Incubation des bactéries en broyats de saumon

Vingt cinq grammes de matrice ionisée sont prélevés stérilement et additionnés de 225 ml d'eau peptonnée tamponnée. Le tout est broyé au stomacher pendant 2 min puis conservé à température ambiante pendant 30 min environ. Une aliquote de 50 ml est centrifugée à 200 g pendant 10 min afin d'obtenir un surnageant exempt des plus gros débris cellulaires. Ce dernier est utilisé comme diluant dans lequel les bactéries seront incubées suivant le protocole ci-après. Dans un tube hémolyse stérile, un volume déterminé de la suspension bactérienne préparée comme il est décrit en 11-2-2 est prélevé et additionné au diluant de façon à obtenir

un nombre approprié de bactéries/ml (volume final = 1 ml, concentration entre 10^5 et 4.10^8 bactéries/ml). Ces suspensions sont effectuées simultanément et en parallèle avec les diluants de saumon cru et saumon fumé et sont ensuite laissées à température ambiante pendant exactement 1 h. Le test de plages de lyse est ensuite réalisé avec ces suspensions telles quelles et avec des séries de dilutions au 1/10 réalisées soit dans le diluant de saumon correspondant (diluant saumon cru et diluant saumon fumé) soit dans du DMEM base suivant l'essai mis en oeuvre.

12-2-3-b Incubation des bactéries en filtrats de saumon

Le filtrat de saumon cru ou fumé est réalisé à partir d'une portion de 25 g diluée au 1/5 ou au 1/10 dans de l'eau peptonnée tamponnée. L'ensemble est en premier lieu broyé au stomacher pendant 2 minutes puis conservé à température ambiante pendant 30 min environ. Une aliquote est ensuite déposée sur filtre 0,2 μm (Top filtre Nalgène PES code 23507, Polylabo) raccordé à un système de pompe à vide. Le filtrat obtenu est alors contaminé suivant la même procédure que celle décrite pour le broyat de saumon. Le test de plages de lyse est ensuite réalisé avec ces suspensions bactériennes en filtrats telles quelles et avec des séries de dilutions au 1/10 réalisées suivant les séries en filtrats de saumon cru, fumé ou en DMEM base.

12-2-3-c Incubation des tapis cellulaires en matrice saumon

En parallèle des essais réalisés avec les bactéries, les tapis cellulaires ont également été incubés avec les matrices de saumon non contaminées soit sous la forme de broyats en suspension préparés suivant le protocole décrit en 12-2-3-a soit sous la forme de filtrats décrits en 12-2-3-b. Un volume de 25 μl /puits a été distribué dans tous les cas et les cellules sont restées en contact 1 h à 37°C sous CO_2 . A l'issue de cette incubation, le test de plages de lyse a été mis en œuvre suivant la procédure décrite en 12-1-2 c après lavage ou non du tapis cellulaire avec du DMEM-SVF sans antibiotique. Chaque lavage a consisté à déposer 100 μl de milieu de culture par puits pendant 15 min à 37°C sous CO_2 .

12-3 *Protocole de recherche d'un effet de la matrice rillettes de porc*

Sous une hotte à flux laminaire, les conserves ont été ouvertes stérilement et des portions de 20 g ont été réparties en tubes Falcon 50 ml (code 19366, Polylabo). Les contaminations ont été réalisées en plongeant un écouvillon stérile dans la dilution 10^5 de *L. monocytogenes* préparée suivant le protocole décrit en 11-2-2 puis en insérant ce dernier dans les rillettes en prenant soin d'homogénéiser l'ensemble. Les tubes vissés ont été conservés à +8°C jusqu'au

moment des analyses. Le test de plages de lyse a été mis en œuvre à partir des portions de rillettes contaminées diluées au 1/10 en eau peptonée tamponnée puis broyées au stomacher pendant 1 minute. Le tapis cellulaire a été infecté avec des séries de dilutions au 1/10 en DMEM de cette suspension mère de façon à obtenir un nombre approprié de bactéries par puits. Un dénombrement en TSA-YE a été réalisé en parallèle.

12-4 Protocole de recherche d'un effet de la matrice lait

Pour les expérimentations, le lait a été réparti stérilement par 50 ml dans des flacons, sous la hotte à flux laminaire. Puis, à partir de culture bactérienne préparée comme il est décrit en 11-2-2 et à l'aide d'un cône à filtre, 25 µl des dilutions de 10^2 à 10^4 ont été prélevées et homogénéisées respectivement dans les flacons séparés. Ces derniers hermétiquement clos ont été conservés à +8°C jusqu'au moment des analyses. L'infection des tapis cellulaires a été réalisée avec des séries de dilutions au 1/10 en DMEM base du lait contaminé de façon à obtenir un nombre approprié de bactéries par puits. Un dénombrement en TSA-YE a été réalisé en parallèle.

12-5 Tests de virulence sur souris

Pour chacune des souches examinées, 5 souris ont été inoculées par voie sous-cutanée plantaire. Les inoculums ont été préparés suivant la procédure décrite ci-après.

A partir d'une culture sur gélose en pente BHIA de 17 h à 37°C, les cultures de *L. monocytogenes* ont été remises en suspension en tampon phosphate (PBS, pH 7,3) et une estimation de la concentration bactérienne a été déterminée par mesure de la densité optique à 620 nm comme il est décrit en 12-1-2 b. La suspension mère a été ensuite ajustée avec du PBS de façon à obtenir 10^4 bactéries/50µl, correspondant au volume injecté aux animaux. Chaque inoculum a été vérifié en parallèle par un dénombrement sur gélose TSA.

Trois jours après l'injection, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale puis autopsiées. La rate de chacun des animaux est prélevée stérilement puis est diluée en PBS de façon appropriée pour dénombrer sur milieu TSA les *L. monocytogenes* présentes. Le nombre de bactéries viable est déterminé après une incubation des boîtes 48 h à 37°C.

Les résultats sont exprimés en \log_{10} bactéries/rate et en nombre d'animaux infectés au bout de 3 jours sur le nombre d'animaux inoculés.

13- Analyse statistique

L'Analyse Factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) pour les variables "espèces", "entreprises" et "groupes" génétiques a été mise en œuvre par une procédure CORRESP de SAS version 8.01. Les graphiques présentés sont les projections des modalités des variables sur les 2 premiers axes de l'AFCM.

14-Analyse des profils électrophorétiques

14-1 Profils générés au laboratoire

Les images révélées sous U.V. des gels d'agarose colorés au BET sont numérisées au moyen d'une caméra vidéo (Gel DOC 1000 system, BioRad). Les profils sont comparés avec le logiciel Molecular Analyst Fingerprinting (BioRad) et les similarités, basées sur la position des bandes, sont déterminées par le coefficient de Dice (Struelens *et al.* 1996) avec une tolérance comprise entre 0,5 et 1,2 %. Des dendrogrammes sont construits pour positionner les souches en fonction de leur degré de similarité, et les groupes se définissent suivant la méthode UPGMA (Struelens *et al.* 1996). Les résultats obtenus à partir de 2 ou 3 enzymes de restriction *ApaI* + *AscI* ou *ApaI* + *AscI* + *SmaI* sont combinés sur un seul dendrogramme.

14-2 Profils publiés

Les profils publiés par Graves *et al.* (2001), générés dans les mêmes conditions de migration électrophorétiques et avec le même marqueur moléculaire que ceux utilisés dans le cadre de cette étude pour les comparaisons inter-bases de données (inter-filières, paragraphe 4-3-3) ont été scannés puis intégrés au logiciel Molecular Analyst Fingerprinting (BioRad). Le traitement des données a été ensuite poursuivi selon la procédure habituelle décrite précédemment.

RÉSULTATS

VI

SPÉCIFICITÉ DE LA CONTAMINATION DES POISSONS FUMÉS

PAR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Tableau 19 : Comparaison du pouvoir discriminant des RAPD avec la macrorestriction *Apa1*

souches	Origine	Type <i>Apa1</i>	Type HLWL74	Type UBC127	Type M13	N°piste gel*
B106 OF	Filet de saumon frais	9a	<i>h1</i>	<i>u1</i>	<i>m1</i>	1
C62 P3	Tapis injection avant nettoyage	9a	<i>h 1</i>	<i>u 1</i>	<i>m 1</i>	2
C1063 O1	Filet de saumon frais sous vide	18	<i>h 2</i>	<i>u 2</i>	<i>m 1a</i>	3
B674 P1	Thon fumé	2	<i>h 3</i>	<i>u 2a</i>	<i>m 2</i>	4
B136 P2F	Saumon fumé	10	<i>h 4</i>	<i>u 3</i>	<i>m 3</i>	5
B82 P2	Saumon frais	6d	<i>h 2b</i>	<i>u 4</i>	<i>m 4</i>	6
CS19 b	Saumure bac de rinçage hareng	6a	<i>h 2b</i>	<i>u 4</i>	<i>m 4</i>	7
C1064 P3	Filet de saumon frais sous vide	6c	<i>h 2c</i>	<i>u 5</i>	<i>m 4</i>	8
CS19 a	Saumure bac de rinçage hareng	6b	<i>h 2b</i>	<i>u 4a</i>	<i>m 4</i>	9
A32 O3	Sol après nettoyage	4	<i>h 2d</i>	<i>u 6</i>	<i>m 5</i>	10
B1261 P2	Lieu fumé	4	<i>h 2d</i>	<i>u 6</i>	<i>m 5</i>	11
B85 O2	Filet de saumon frais	7	<i>h 3</i>	<i>u 7</i>	<i>m 4a</i>	12
B88 O	Peau de saumon frais entier	8	<i>h 2</i>	<i>u 2</i>	<i>m 1a</i>	13
A37 O2	Grille inox propre	5	<i>h 5</i>	<i>u 8</i>	<i>m 6</i>	14
B131 P2	Sol atelier lavage saumon	5a	<i>h 5</i>	<i>u 8</i>	<i>m 6</i>	15
B7201 P2	Chutes de saumon fumé	5b	<i>h 5</i>	<i>u 8a</i>	<i>m 6</i>	16
B1169 P1	Hareng congelé matière 1 ^{ère}	5c	<i>h 5</i>	<i>u 8a</i>	<i>m 6</i>	17
C275 P1	Hareng congelé matière 1 ^{ère}	3	<i>h 6</i>	<i>u 9</i>	<i>m 7</i>	18
B1401 O1	Moules décortiquées cuites	3b	<i>h 6</i>	<i>u 9</i>	<i>m 7a</i>	19
C274 P1	Hareng congelé matière 1 ^{ière}	15	<i>h 3</i>	<i>u 9a</i>	<i>m 7b</i>	20
C442 O1	Hareng congelé matière 1 ^{ière}	16b	<i>h 7</i>	<i>u 9a</i>	<i>m 8</i>	21
B1400 O1	Moules décortiquées cuites	12	<i>h 3</i>	<i>u 9a</i>	<i>m 7c</i>	22
A14 P2	Saumon frais après lavage	1	<i>h 2</i>	<i>u 10</i>	<i>m 9</i>	23
A3P3m	Filet de saumon frais	1b	<i>h 2a</i>	<i>u 10</i>	<i>m 9</i>	24
C54P1	Hareng congelé matière 1 ^{ière}	11	<i>h 8</i>	<i>u 11</i>	<i>m 10</i>	25
B8005 P1	Hareng fumé	11a	<i>h 8</i>	<i>u 11</i>	<i>m 11</i>	26
CIP103322	Épidémie Vacherin Mont d'Or	19	<i>h 6a</i>	<i>u 12</i>	<i>m 12</i>	27
C2041 P2	Chutes de saumon fumé	19a	<i>h 6b</i>	<i>u 12</i>	<i>m 12</i>	28
<i>Total</i>		26	14	16	17	

Note : les lettres figurant au début de chaque numéro de souche indiquent l'année d'isolement.

A= 1998, B=1999, et C =2000. La souche CIP est une souche de référence provenant de la collection de l'Institut Pasteur, isolée en 1987. Les types apparaissant en gras sous fond grisé correspondent à des profils identiques en RAPD associés à des souches appartenant à des groupes génétiques différents en PFGE *Apa1*.

*gels RAPD uniquement présentés dans la figure 20 p 95.

1- Choix entre 3 méthodes RAPD pour le criblage des souches

Dans l'optique d'examiner au moins 10 à 15 isolats de *L. monocytogenes* par prélèvement positif, un criblage rapide des souches est nécessaire avant la caractérisation par macrorestriction. Le but est de détecter, d'identifier et de sélectionner au sein d'une même prise d'essai ou d'un même échantillon de l'environnement les différents types génétiques pouvant co-exister. Pour la mise en œuvre de cette étape de tri, 3 méthodes RAPD (HLWL74, UBC127 et M13) ont été évaluées au niveau de leur pouvoir discriminant en comparaison avec la macrorestriction par *ApaI*. Pour ce travail, un panel de 27 souches isolées des produits de la mer entre 1998 et 2000 et une souche de référence de la collection Pasteur ont été utilisés (tableau 19).

1-1 *Caractérisation par macrorestriction*

Les profils obtenus après digestion avec l'enzyme *ApaI*, se composent de 13 à 19 fragments dont la taille est comprise entre 48,5 et 500 kb (données non montrées). Parmi les 28 souches testées, 26 types différents ont été distingués, les paires de souches B106OF, C62P3 d'une part et A32O3, B1261P2 d'autre part présentant respectivement des profils identiques (tableau 19). Ces 26 génotypes se répartissent dans 16 groupes génétiques à l'intérieur desquels un degré de similarité au niveau des profils électrophorétiques est au moins égal à 90 % \pm 2% (figure 19, p 97). Ainsi, le groupe 6 est représenté par 4 variants génétiques (6a, 6b, 6c, 6d) de même que le groupe 5 (5, 5a, 5b, 5c). Les 4 groupes 1, 3, 11 et 19 contiennent chacun 2 variants : 1 et 1b; 3 et 3b; 11 et 11a; 19 et 19a (tableau 19). Les 10 autres souches présentent des profils distincts et éloignés et portent en conséquence chacune un numéro de groupe génétique différent. Le dendrogramme construit fait également apparaître 2 branches phylogénétiques subdivisant le panel de souches en 2 clusters A et B (figure 19, p 97).

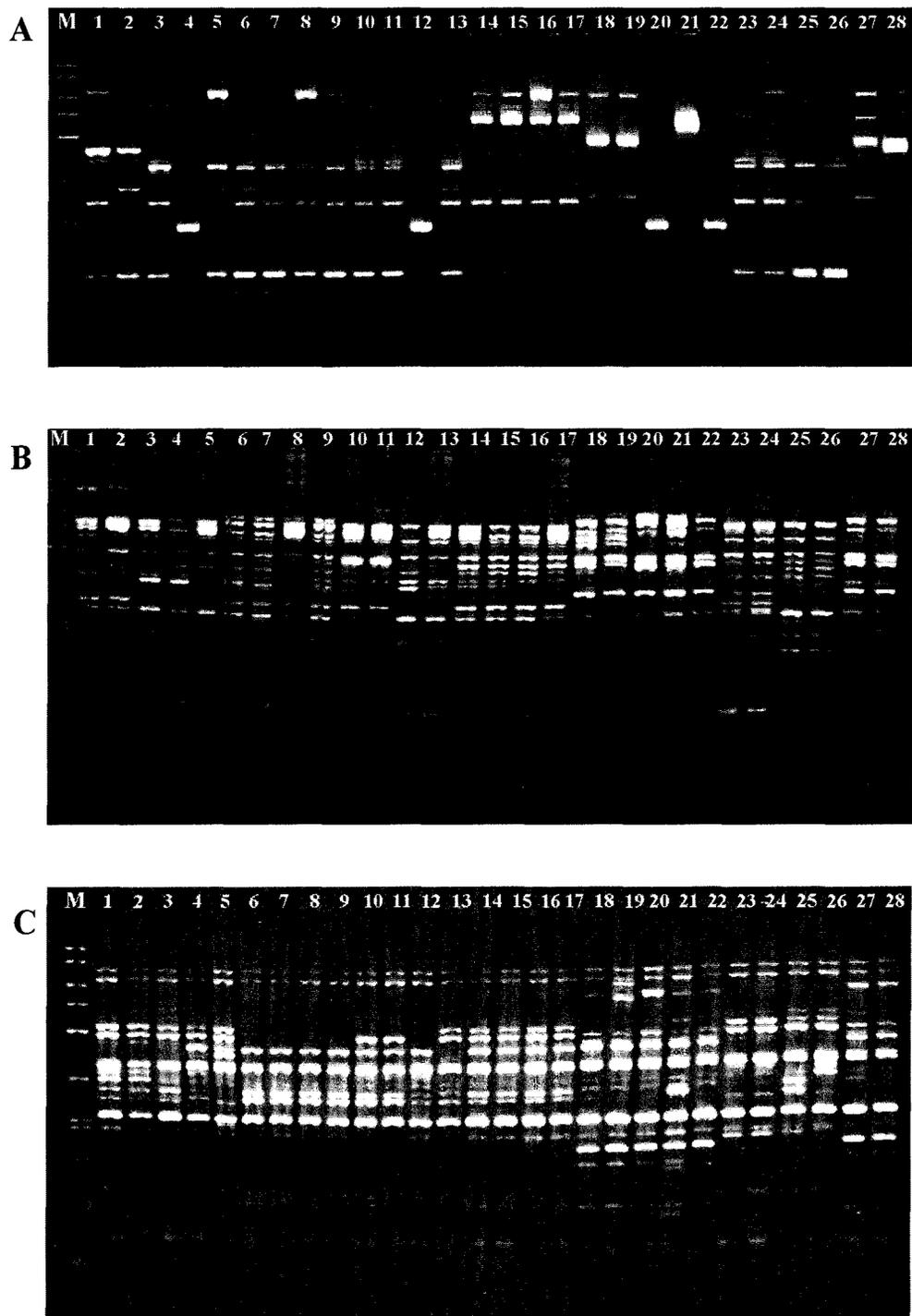


Figure 20 : Profils RAPD obtenus à partir des trois amorces testées en parallèle. A, amorce HLWL74; B, amorce UBC127; C, amorce M13. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire Euroladder L (fragments en pb, 2500, 2000, 1500, 1250, 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100, 50)

1-2 Caractérisation avec l'amorce HLWL74

Les profils générés avec l'amorce HLWL74 ont en moyenne 5 à 6 bandes visibles entre 300 pb et 2 kb (figure 20A). Parmi les 28 souches, 4 affichent un seul fragment autour de 500 pb (B674P1, B85O2, C274P1 et B1400O1, type *h3*). Avec la souche C442O1, une seule bande de forte intensité apparaît également autour de 1 kb (figure 20, piste 21 de A et tableau 19, type *h7*). Au total, 14 génotypes ont été identifiés avec cette méthode et l'assignation des types a été réalisé suivant le même principe que pour les groupes génétiques en macrorestriction : les profils proches portent un même numéro et se différencient par des lettres en minuscules. Sur cette base, seulement 8 groupes de profils sont observés. Les profils du groupe 2 concernent 10 souches sur les 28 testées (tableau 19).

1-3 Caractérisation avec l'amorce UBC127

Avec cette amorce, chaque profil est composé d'une vingtaine de bandes positionnées majoritairement entre 500 et 1500 pb (figure 20B). Parmi les 28 souches, 16 types distincts sont identifiés (tableau 19). Au total, 12 groupes de profils sont observés et chacun ne concerne jamais plus de 4 souches.

1-4 Caractérisation avec l'amorce M13

Avec l'amorce M13, des fragments de 200 à 2000 pb sont amplifiés et se répartissent au niveau des profils de façon homogène (figure 20C). Ainsi, les empreintes visualisées permettent d'identifier 17 types parmi les 28 souches testées. Au total, 12 groupes de profils sont observés et certains permettent de relier 4 et 5 souches : le groupe 4 avec les types *m4* et *m4a*, le groupe 6 représenté seulement par le type *m6* et le groupe 7 avec les types *m7*, *m7a*, *m7b*, *m7c* (tableau 19).

1-5 Comparaison des résultats RAPD avec les résultats de macrorestriction *ApaI*

En combinant les résultats des 3 RAPD, il est possible de distinguer 22 types de *L. monocytogenes* contre 26 types identifiés par macrorestriction *ApaI*. En effet, quelque soit l'amorce utilisée, les souches C1063O1 et B88O ne sont jamais différenciées alors qu'elles appartiennent à 2 groupes génétiques en *ApaI* présentant seulement 58 % de similarité (type 18 et 8). Dans les autres cas, des profils identiques sont générés à partir de souches présentant un degré de parenté avéré en macrorestriction : les souches de type *ApaI* 6a et 6d (97%), et les

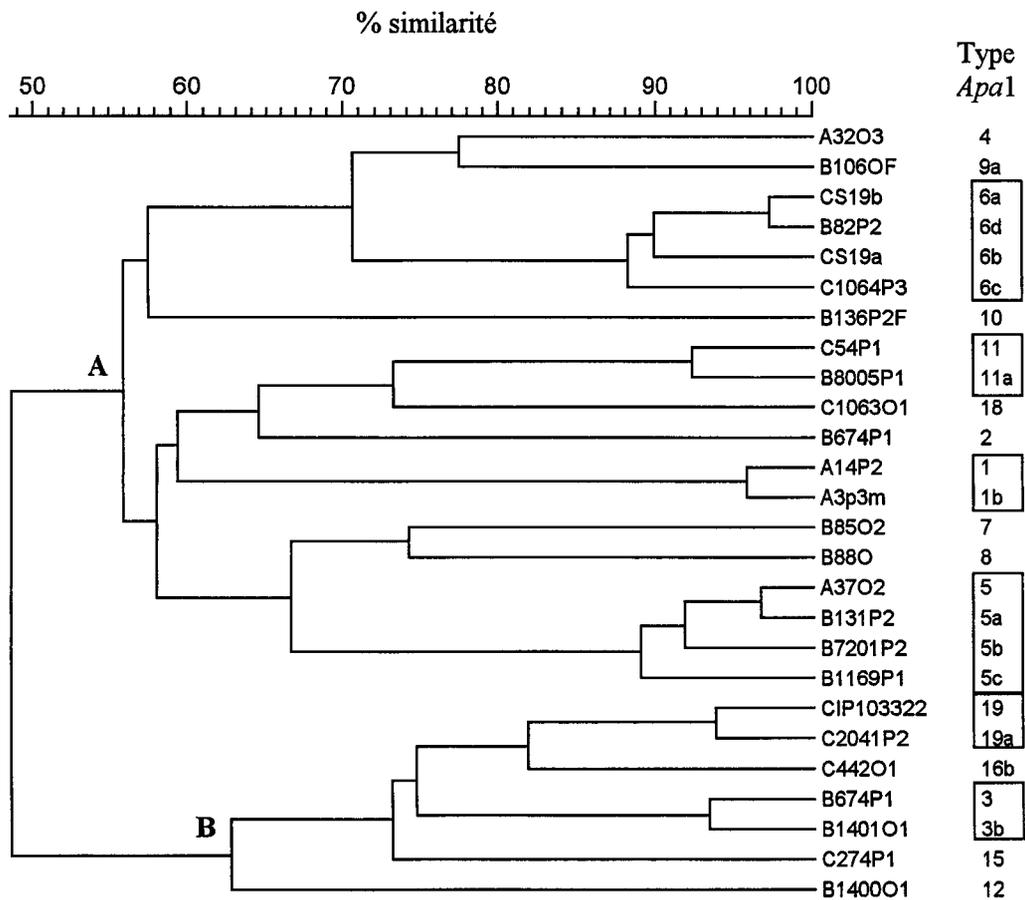


Figure 19: Degré de similarités entre les profils *ApaI* des souches du panel "étude RAPD". Dendrogramme construit avec une tolérance de 1,2%. Les génotypes appartenant à un même groupe génétiques sont entourés d'un rectangle. Deux branches distinctes A et B subdivisent le panel.

souches de type *ApaI* 5 et 5a (97%) ainsi que 5b et 5c (89%). Dans ce dernier groupe génétique 5, seule l'amorce UBC127 permet de distinguer la paire 5/5a de la paire 5b/5c.

A l'inverse, les résultats des RAPD ne permettent pas de subdiviser les 2 paires de souches présentant des profils identiques en macrorestriction (types *ApaI* 9a et 4).

Individuellement, l'amorce HLWL74 génère des profils similaires ou identiques pour des souches génétiquement éloignées en *ApaI* (profils des groupes *h2* et *h3*).

Avec UBC127, les souches de types *ApaI* 3/3b, 15, 16b et 12 sont visualisées par des profils très proches ne permettant pas une nette différenciation (type RAPD *u9/9a*). Dans le dendrogramme, les souches associées à ces types appartiennent effectivement à un même embranchement bien distinct du reste du panel (figure 19, subdivision B) mais les degrés de similarité relevés entre les profils ne suggèrent pas que ces souches dérivent d'une même lignée clonale. En conséquence, il est souhaitable qu'elles soient également différenciées lors du criblage de souches.

C'est essentiellement au niveau de ces mêmes souches que la différence entre les RAPD UBC127 et M13 se situe. Avec cette dernière amorce, les profils restent proches mais se distinguent cependant plus facilement (pistes 18 à 22, figure 20C, types M13 du groupe *m7*, tableau 19). En revanche, d'une façon générale les souches classées dans un même groupe génétique en macrorestriction ne sont pas différenciées en RAPD M13 : groupe *ApaI* 1, 6, 5 et 19 (avec comme exception les groupes 11 et 3).

1-6 Synthèse des résultats

Les résultats montrent que le pouvoir discriminant de la RAPD, quelque soit l'amorce utilisée reste inférieur à celui de la macrorestriction.

Parmi les trois amorces testées, M13 présente cependant le meilleur score en terme de discrimination entre les souches et les profils générés apparaissent homogènes et de lecture facile. La méthode ne permet pas dans tous les cas de différencier des souches d'un même type clonal (c'est à dire dérivant vraisemblablement d'un ancêtre commun et se traduisant par des profils en macrorestriction avec au moins 90 % de similarité). En revanche, la mise en œuvre de la RAPD M13 semble suffisante pour cribler des isolats et repérer rapidement ceux appartenant à des types clonaux différents.

Tableau 20 : Résultats des suivis de fabrication de hareng fumé dans l'entreprise E1

Etapas du procédé de fabrication et nature des prélèvements	no. prélèvements positifs/no. total de prélèvements, niveau de contamination (%) ¹ et types PFGE identifiés ²					
	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4	Visite 5	Visite 6
<i>Site hors activité</i>						
Environnement	0/15	0/15	0/15	0/15	0/23	1/20 T2
Grilles d'évacuation	–	–	2/4 T6-T9a	3/4 T2-T6-T9a	3/4 T2-T9a-T11	3/4 T2-T9a-T11/11a
<i>Site en activité</i>						
Matières premières	0/6	4/6 T5/5c-T11	0/6	3/6 T15	0/6	0/6
Après décongélation						
Filets de hareng	0/5	5/5 (73%) T5/5c ³ -T11	0/5	1/5 (6,6%) T15	0/5	1/5 (6,6%) T20
Bacs inox	0/3	3/3 T5/5c ³ -T11	0/3	2/3 T11-T15	0/3	0/3
Atelier de salage						
Saumure saturée	1/2 (12%) T2	2/2 (100%) T5/5c ³ -T11	0/2	2/2 (100%) T9a-T11-T15	0/2	2/4 (50%) T1-T2-T20 T11/11a
Injecteuse	0/3	1/3 T11	0/3	2/3 T9a-T11-T15	1/3 T2	1/3 T20
Filets de hareng ap. salage	0/5	5/5 (93%) T5/5c ³ -T11	1/5 (7%) T11	5/5 (53%) T9a-T11-T15	1/5 (13%) T2	1/5 (7%) T20
Mains des opérateurs	0/4	1/4 T11	0/4	1/4 T9a	1/4 T9a-T11	1/4 T20
Après fumage						
Filets de hareng fumés	0/5	4/5 (46%) T5/5c ³ -T11	0/5	4/5 (40%) T9a-T15	0/5	1/5 (6,6%) T1
Conditionnement						
Environnement	0/3	0/3	0/3	0/4	2/3 T9a	1/3 T9a
Mains des opérateurs	0/2	0/2	0/2	0/3	1/4 T9a	0/4
Produits finis	0/6	3/6 (33%) T5/5c-T11	0/10	8/10 (40%) T9a-T11-T15 T2-T20	5/10 (17%) T2-T9a	1/10 (7%) T1-T20
No total de prélèv. positifs	1/59	28/59	3/67	31/69	14/77	13/76
No total d'analyses	106	107	123	125	133	138
Niveau de contamination ¹	0,9%	51%	0,8%	45%	18%	17%

¹Le niveau de contamination a été calculé à partir du nombre de prises d'essais positives en *L. mono.* sur le nombre de prises d'essais effectuées par unité de prélèvements (pour les filets, 3x 25g par prélèvement de 200g et 1 unité = 5 X 200 g de produit, voir Matériels et Méthodes)

²Les types PFGE apparaissent en gras. L'assignation des pulsotypes a été réalisée suivant une nomenclature propre au laboratoire. Ceux se différenciant par des lettres minuscules ont des profils génétiques proches avec une similarité ≥ 90 %.

³ Les pulsotypes T5 et T5c ne sont pas distingués en RAPD M13. Les résultats sont donnés par défauts. – non fait.

2- Prévalence en *L. monocytogenes* dans les poissons fumés et étude des voies de contamination

L'objectif de ce travail était de récolter des données sur la prévalence et les niveaux de contamination relevés dans les poissons fumés. Dans cette optique, des suivis de fabrication ont été mis en œuvre sur une période d'un an auprès de 2 industriels sauteurs-saurisseurs. En parallèle, des prélèvements de poissons fumés dans la grande distribution ont été réalisés. Le typage par macrorestriction des souches isolées pour l'ensemble des produits visait d'une part à identifier les voies de contamination en production et d'autre part à faire un premier état des lieux sur les génotypes présents dans ce type de produit.

2-1 Suivis de fabrication auprès de 2 ateliers de fumaison

2-1-1 Contamination des deux sites de production étudiés

Au cours des 6 visites réalisées pour les suivis de fabrication de hareng fumé sur le site E1, 22 % des prélèvements en moyenne étaient contaminés en *L. monocytogenes* avec des variations de 0,8 % à 51 % au maximum suivant les campagnes de prélèvements (tableau 20). D'une façon générale, le pathogène n'a pas été détecté sur les surfaces et l'équipement de la ligne de production après les opérations de nettoyage et de désinfection. Une seule exception a été cependant mise en évidence au cours de la visite 6, avec un prélèvement réalisé au niveau du filtre de l'injecteuse. *A contrario*, la plupart des grilles d'évacuation examinées ont été positives.

Lorsque le site était en activité, 3 scénarios majeurs de contamination ont été observés :

- pour les visites 1 et 3, les lots de matière première n'étaient pas positifs en *L. monocytogenes*, de même que les produits finis résultant de ces fabrications. Cependant, la saumure présentait un niveau de contamination de 12 % lors de la visite 1 et un des prélèvements de filets de hareng après salage lors de la visite 3 était faiblement contaminé (7% de prises d'essais positives à ce point de prélèvement).
- à trois reprises, les lots de matière première étaient contaminés (détection soit avant, soit après décongélation, visite 2, 4 et 6, tableau 20). En final, les produits fabriqués en résultant présentaient une prévalence de 10 % (visite 6) à 80 % (visite 4) avec des niveaux de contamination compris entre 7% (visite 6) et 40 % (visite 4).

Tableau 21 Résultats des suivis de fabrication de saumon fumé dans l'entreprise E2

Etapas du procédé de fabrication et nature des prélèvements	no. prélèvements positifs/no. total de prélèvements, niveau de contamination (%) ¹ et types PFGE identifiés ²		
	Visite 1	Visite 2	Visite 3
<i>Site hors activité</i>			
Environnement	2/13 T1-T2	3/17 T1-T5	10/17 T1-T2-T5
Grilles d'évacuation	2/2 T1-T6a/6e-T7b	3/3 T1-T5-T10a	3/3 T1-T5
<i>Site en activité</i>			
Matière première	0/25	0/15	–
Etape de filetage			
Surfaces de travail	3/9 T1-T2	4/9 T1	8/9 T1-T2
Mains des opérateurs	0/2	2/2 T1-T2	2/2 T1
Filets de saumon	10/12 (58%) T1-T2	6/6 (83%) T1-T2	6/6 (100%) T1-T2
Etape de salage			
Filets de saumon ap. salage	4/12 (16%) T1-T2	6/6 (66%) T1-T2	6/6 (100%) T1-T2
Etape fumage			
Filets de saumon ap. fumage	0/12	2/6 (16%) T1-T2	2/6 (40%) T1
Conditionnement			
Trancheuse	0/1	2/3 T1	3/3 T1
Surface de travail	0/8	0/4	3/4 T1
Mains des opérateurs	0/4	2/2 T1	2/2 T1
Produits finis	0/6	2/3 (44%) T1	3/3 (88%) T1
No total de prélèv. positifs	21/109	35/80	48/65
No total d'analyses	169	113	98
Niveau de contamination ¹	15%	41%	74%

¹Le niveau de contamination a été calculé à partir du nombre de prises d'essais positives en *L. mono.* sur le nombre de prises d'essais effectuées par unité de prélèvements (pour les filets, 3x 25g par filets et 1 unité = 3 filets prélevés et 3 filets en chiffonnage côté chair, voir Matériels et Méthodes)

²Les types PFGE apparaissent en gras. L'assignation des pulsotypes a été réalisée suivant une nomenclature propre au laboratoire. Ceux se différenciant par des lettres minuscules ont des profils génétiques proches avec une similarité $\geq 90\%$.

– non fait.

- au cours de la cinquième visite, 50 % des harengs fumés étaient positifs en *L. monocytogenes* avec un niveau de contamination de 17 % alors que le pathogène n'avait pas été détecté au départ dans la matière première.

Les prélèvements d'environnement réalisés au cours de cette visite contenaient des *L. monocytogenes*, en particulier au niveau de la saumure de l'injecteuse.

A partir de l'entreprise E2, *L. monocytogenes* a été détectée dans 41 % des 254 prélèvements réalisés dans le cadre des suivis de fabrication de saumon fumé (tableau 21). Au fil du temps, le niveau de contamination des produits finis a progressivement augmenté et ceci était fortement relié à une évolution de la contamination observée au niveau des surfaces de la ligne de production de ce site. Par ailleurs, le pathogène n'a jamais été détecté dans les lots de matières premières utilisées. Hors activité, les prélèvements des surfaces de travail et des outils destinés à être en contact avec les produits étaient positifs avec des scores en évolution régulière entre chaque visite (tableau 21). Le profil de contamination observé au cours de la première visite se distingue nettement des deux autres. Ce fut en effet l'unique occasion pour laquelle les prélèvements réalisés dans l'environnement de l'atelier de conditionnement ont été trouvés négatifs ainsi que les produits finis.

2-1-2 Diversité génétique des isolats récoltés

Dans une première étape, les isolats issus d'un même prélèvement positif ont été triés par la méthode RAPD M13. Un exemple des profils obtenus avec cette stratégie de criblage est présentée dans la figure 21 p 103. Au total, 9 et 7 empreintes distinctes ont été mises en évidence respectivement à partir des sites E1 et E2 (données non montrées). Sur cette base, une sélection des isolats a été réalisée pour une caractérisation par macrorestriction avec les enzymes *ApaI* et *AscI*. Les profils obtenus à partir de ces deux digestions ont été combinés en une seule empreinte et a donné lieu à l'assignation d'un unique numéro de type PFGE suivant une nomenclature propre au laboratoire de Boulogne.

A trois reprises, les prélèvements contenaient des souches avec des profils très proches (au moins 90 % de similarité) et ont été notés avec un même numéro de type PFGE et différenciés par une lettre (T5 et T5c, T11 et T11a, tableau 20, T6a et T6e tableau 21). Les souches présentant les types T5 et T5c, n'ont pas été distingués par la méthode RAPD. En conséquence, pour s'assurer que ces deux variants génétiques étaient bien présents en début et en fin de production lors de la visite 2 (tableau 20 p 99), des isolats supplémentaires ont été caractérisés.

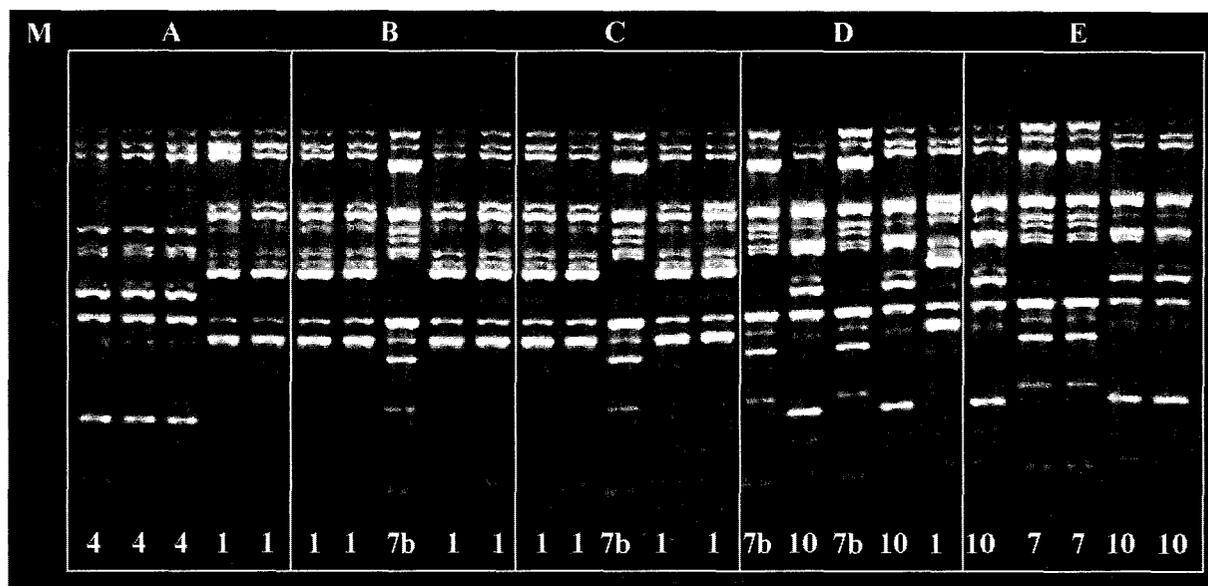


Figure 21 Exemple de profils RAPD lors du criblage des isolats. Empreintes générées à partir de 5 isolats prélevés par boîtes de milieu LMBA notés ici A, B, C, D, E. Les numéros en bas de chaque piste correspondent aux types RAPD M13 (types *m*) identifiés : 1, 4, 7b, 10 correspondent respectivement aux pulsotypes T9a, T6, T15, T11 détectés lors de la visite 4 sur le site E1 (tableau 20). La piste M contient le marqueur de poids moléculaire Euroladder L (Eurobio).

Tableau 22 Distribution des pulsotypes en fonction du point de prélèvement.

Point de prélèvement	No total de types PFGE identifiés*	
	Site E1	Site E2
Avant fumage**	T1-T2-T5/5c-T6 -T9a-T11/11a-T15-T20	T1-T2-T5-T6a/6e-T7b-T10a
Poissons fumés	T1-T2-T5/5c T9a-T11/11a-T15-T20	T1-T2

*Les pulsotypes apparaissant en gras ont été identifiés sur les 2 sites. L'assignation des pulsotypes pour les 2 sites a été réalisée suivant une même nomenclature. Les types portant un même numéro et se différenciant par des lettres minuscules appartiennent à un même groupe génétique.

** Inclus tous types de prélèvements, poisson ou surface en contact avec le produit durant la fabrication. Les types soulignés n'ont été détectés que dans les grilles d'évacuation lors des campagnes de prélèvements.

Au total, 14 types PFGE ont été identifiés en prenant en compte des deux sites examinés (tableau 22). La répartition spatio-temporelle de chacun de ces génotypes est présentée dans les tableaux 20 et 21.

Sur le site E1, les types PFGE T2 et T9a ont été détectés au cours de 4 visites sur les 6 effectuées. Il en est de même pour les types du groupe génétique 11 (T11/11a) présents dans toutes les campagnes de prélèvements après la première visite sur ce site. Pour ces génotypes régulièrement détectés, le lien direct avec la matière première n'a pas été établi, excepté pour T11 lors de la visite 2 (tableau 20). *A contrario*, les types T5/5c, T15 et T20 ont été identifiés respectivement à l'occasion d'un seul suivi de fabrication et ont été retrouvés tout au long de la chaîne de production c'est à dire des lots de matière première jusqu'aux produits finis. Le type PFGE T1 n'a été détecté sur ce site qu'une seule fois lors de la visite 6 à partir de l'étape de salage jusqu'aux produits finis alors que le type T6 n'a été isolé qu'à partir d'un seul prélèvement au niveau d'une grille d'évacuation.

Sur le site E2, les types PFGE T1 et T2 ont prédominé dans les prélèvements indépendamment de leur nature (tableau 21). Aucun autre génotype n'a été identifié dans les produits en cours de fabrication et T1 a représenté l'unique type détecté dans les produits finis. Hors activité, le type T5 a été isolé sur des surfaces de travail après les opérations de nettoyage et de désinfection ainsi que dans des prélèvements au niveau des grilles d'évacuation mais n'a jamais été retrouvé ailleurs. De la même façon, les types T6a/6e, T7b et T10a n'ont été retrouvés qu'au niveau des égouts.

En comparant les différents types retrouvés sur E1 et E2, les 4 groupes génétiques 1, 2, 5 et 6 sont communs aux deux sites et sont représentés respectivement par les types T1, T2, T5/5c, T6/6a/6e (tableau 22). Par ailleurs, d'un point de vue qualitatif, tous les types PFGE identifiés à partir des poissons en cours de fabrication ou des surfaces et équipements directement en contact avec le produit avant l'étape de fumage sont retrouvés également dans les poissons fumés (tableau 22).

2-1-3 Distribution des génotypes en fonction de la méthodologie

Le tableau 23 p 105 présente la répartition des types RAPD en fonction des protocoles d'isolement mis en œuvre pour la récolte d'isolats au cours de la campagne de prélèvement n°2 sur le site E1. Les deux types distingués en RAPD *m6* et *m10*, correspondant respectivement aux types PFGE T5/5c et T11, se répartissent de façon homogène dans les milieux d'isolement lorsque le bouillon d'enrichissement primaire utilisé est le Fraser ½.

Tableau 23 : Distribution des géotypes obtenus par la RAPD M13 en fonction des milieux de cultures
Analyse de la campagne de prélèvement n°2 de l'Entreprise E1.

Milieux de culture	Répartition des géotypes		
	Total	Type RAPD m6*	Type RAPD m10*
Tous protocoles confondus	243 isolats	38,7 %	61,3 %
Fraser ½	56,4 %	45,3 %	54,7 %
Fraser ½ + LA		46,7 %	53,3 %
Fraser ½ + LMBA		48,1 %	51,9 %
Fraser ½ + Fraser + Palcam		40 %	60 %
LRB	43,6 %	30,8 %	69,2 %
LRB + LA		29 %	71 %
LRB + LMBA		29 %	71 %
LRB + Fraser + Palcam		34 %	66 %

* les types RAPD m6 et RAPD m10 correspondent respectivement aux géotypes T5/5c et T11 en PFGE.

Tableau 24 : Distribution des géotypes obtenus par la RAPD M13 en fonction des milieux de cultures
Analyse des campagnes de prélèvements 1 et 2 de l'Entreprise E2.

Milieux de culture	Répartition des géotypes		
	Total	Type RAPD m9*	Type RAPD m2*
Tous protocoles confondus	322 isolats	85,1 %	14,9 %
<i>Répartition par milieux d'enrichissement</i>			
Fraser ½	64,2 %	85,5 %	14,5 %
LRB	35,8 %	84,3 %	15,6 %
<i>Répartition par milieux d'isolement</i>			
LA	23,6 %	81,6 %	18,4 %
LMBA	47,5 %	92,1 %	7,8 %
Palcam**	28,9 %	76,3 %	23,6 %

* les types RAPD m9 et RAPD m2 correspondent respectivement aux pulsotypes T1 et T2.

** l'isolement sur Palcam a été uniquement réalisé à partir de l'enrichissement secondaire (fraser complet).

Tableau 25 : Taux de récupération des *Listeria monocytogenes* en fonction des milieux d'isolement utilisés. Analyse des isolats récoltés lors de la visite 2 sur le site E2.

Milieu d'isolement	No total d'isolats	Résultats de la PCR multiplex	
		<i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria spp*</i>
Tous milieux confondus	261	205	21,4 %
LA	72	40	44 %
LMBA	114	114	0 %
Palcam	75	51	32 %

*autres espèces que *L. monocytogenes*.

En revanche, l'utilisation du bouillon LRB semble favoriser l'émergence du type *m10* avec un score autour de 70 % (alors qu'il était aux alentours de 50 % en Fraser ½) quelque soit le milieu d'isolement utilisé (tableau 23).

De la même façon, la répartition des deux types prédominants identifiés sur le site E2 (T1 et T2) a été examinée en fonction des milieux de culture utilisés (tableau 24). L'analyse, réalisée à partir de 322 isolats récoltés au cours des visites 1 et 2, montre clairement que le type *m2* (correspondant au type PFGE T2) est récupéré avec un score significativement plus faible lorsque le milieu LMBA est utilisé quelque soit le bouillon d'enrichissement primaire mis en œuvre au départ (tableau 24).

2-1-4 Performance des milieux d'isolement

A partir des résultats de la deuxième campagne de prélèvements sur le site E2, un bilan sur le taux de récupération de l'espèce *L. monocytogenes* en fonction des milieux d'isolement a été dressé. L'ensemble des résultats, présenté dans le tableau 25, indique que les performances du milieu LMBA étaient supérieures à celles des géloses LA et Palcam. Au total, 32 % et 44 % des colonies prélevées respectivement sur les milieux LA et Palcam ont été identifiées comme *Listeria* spp avec la PCR multiplex alors que toutes celles sélectionnées sur le milieu LMBA en fonction du critère de Bêta hémolyse étaient positives. Dans ce contexte, 56 % des isolats récoltés au cours de la deuxième visite, provenaient du milieu LMBA.

2-1-5 Origine des matières premières de hareng du site E1

Suite aux résultats des campagnes de prélèvements sur le site E1, un panel supplémentaire de souches issues de divers lots de matières premières en provenance d'Islande a été caractérisé en macrorestriction avec les enzymes *ApaI* et *AscI* (les lots d'origine Norvège présentaient des niveaux de contamination bien inférieurs). Dix pulsotypes différents ont été mis en évidence et appartiennent aux 7 groupes génétiques : 3 (T3), 5 (T5, T5a, T5c), 7 (T7a), 11(T11, T11a), 15 (T15), 16 (T16b) et 20 (tableau 26 p 107). Au total, les lots de hareng avaient été congelés à partir de 4 sites industriels différents localisés sur la côte ouest de l'Islande (figure 22 p 108). L'analyse de 3 lots différents pour 2 des sites indique qu'un même groupe génétique est identifié à chaque fois : le groupe 15 pour le site 17/09 et le groupe 11 pour le site 17/13 (tableau 26). Chaque site affiche un profil de contamination qui lui est propre et seulement 2 groupes génétiques sont communs au moins à 2 sites : les groupes 11 et 5 pour les sites 17/13 et 18/05.

Tableau 26 : Distribution des géotypes matière première hareng en fonction de leurs sites de congélation

Code sanitaire sites de congélation	Dates d'analyse	Pulsotypes
17/09	13 jan 2000	T15
	17 jan 2000	T15
	11 fev 2000	T15
17/06	21 jan 2000	T16b
	17 jan 2000	T3
17/13	20 déc 1999	T11a
	3 jan 2000	T11
	23 fev 2000	T7a T11 T5a
18/05	Juin 2000	T11 T5/5c
	19 fev2001	T20



Figure 22 : Localisation des différents sites de congélation des lots de harengs origine Islande de l'entreprise E1 et des pulsotypes associés.
 Les chiffres sur fond noir correspondent aux groupes génétiques de *L. monocytogenes* identifiés à partir des lots de harengs en provenance de chacun des sites.

Tableau 27 : Résultats de la campagne de prélèvement de poissons fumés dans la grande distribution en décembre 2000.

N° site de production	Nature du poisson fumé	Résultats <i>Listeria monocytogenes</i>					Pulsotypes	
		No d'unités positives	Niveau de Contamination	Dénombrement en ufc/g				
				1	2	3		
11	Saumon Norvège	1 ⁺ /5	7 %	<10	<10	<10	T4a	
32	Saumon Norvège	Absence		<10	<10	<10		
32	Saumon Ecosse	1 ⁺ /5	7 %	<10	<10	<10	T17a	
13	Saumon Ecosse	Absence		<10	<10	<10		
13	Truite	1 ⁺ /5	13 %	820	70	<10	T17a	
13	Saumon Norvège	2 ⁺ /5	13 %	130 7560	<10	<10	T22 T17a	
8	Saumon Norvège	Absence		<10	<10	<10		
8	Hareng doux	1 ⁺ /5	7 %	<10	<10	<10	T13	
8	Saumon Irlande	Absence		<10	<10	<10		
41	Saumon Norvège	Absence		<10	<10	<10		
43	Saumon Norvège	Absence		<10	<10	<10		
23	Saumon Norvège	1 ⁺ /5	7 %	10	<10	<10	T6g	
14	Hareng doux	1 ⁺ /5	7 %	<10	<10	<10	T4	
37	Saumon Norvège	5 ⁺ /5	73 %	<10	<10	<10	T6i	
				<10	<10	<10	T6i	
				10	<10	<10	T6i	T2
				290	20	<10	T6i	T2
				820	<10	<10	T6i	T2
37	Saumon Ecosse	5 ⁺ /5	67 %	<10	<10	<10	T6i	T2
				<10	<10	<10	T6g	T6i
				60	<10	<10		T2
				40	300	<10	T6g	T6i
				<10	<10	<10	T6i	
5	Hareng doux	2 ⁺ /5	13 %	<10	<10	<10	T2	
				<10	<10	<10	T9a	
44	Truite	Absence		<10	<10	<10		
12	Hareng doux	1 ⁺ /5	7 %	<10	<10	<10	T5d	
<i>Total</i>		21 ⁺ /90 (23%)	(12%)					

Note : la codification des sites de production a été réalisée suivant une nomenclature propre au laboratoire de Boulogne. Le site n°5 correspond au site E1 des suivis de fabrication pour le hareng.

Le niveau de contamination a été calculé en fonction du nombre total de prises d'essais positives pour chaque lot analysé (1 lot = 5 unités et 3 prises d'essais/unité examinée)

Toutes les DLC étaient comprises entre le 4/12/2000 et le 8/01/2001.

En gras figurent les résultats de dénombrement hors norme (>100 ufc/g à DLC)

2-2 Poissons fumés prélevés dans la grande distribution

L'ensemble des résultats pour cette campagne de prélèvements est repris dans le tableau 27.

2-2-1 Prévalence

Au total, 90 unités de poisson fumé en provenance de 12 sites de production distincts français ont été prélevées en décembre 2000, au moment des tonnages les plus importants réalisés dans l'année par ces fabricants. *L. monocytogenes* a été détectée dans 23 % des produits analysés avec la répartition des unités positives suivante : 14/60 unités de saumon fumé (23 %), 5/20 unités de hareng fumé (25 %) et 1 unité de truite sur les 10 analysées (10 %). Sur les 12 sites de production, 9 présentaient des lots de produits contaminés à la vente, soit 75 % des saurisseurs examinés.

2-2-2 Niveaux de contamination

Pour chaque type de produits (de nature ou de marque distinctes), 5 unités ont été analysées, soit au total 18 lots de poissons fumés différents. Sur les 11 lots présentant une contamination en *L. monocytogenes*, 7 n'avaient qu'une seule unité positive sur 5 analysées (63 %), 2 avaient 2 unités contaminées sur 5 et enfin 2 lots issus d'un même site de production (site 37) contenaient le pathogène dans toutes les unités examinées. D'une façon générale, *L. monocytogenes* n'a été détectée qu'à partir d'une seule prise d'essai de 25 g sur les trois mises en œuvre par unité analysée, soit un niveau de contamination dans les produits assez faible (12 % des prises d'essais positives au total). Les 2 lots du site 37 font exception, avec 73 % et 67 % d'analyses ayant abouti à l'isolement du pathogène.

A partir des 21 unités positives, 9 présentaient des niveaux de contamination suffisants (≥ 10 ufc/g) pour être appréciés par les méthodes de dénombrement (43%). Parmi ces dernières, 6 étaient hors norme avec des valeurs de 130 à 7560 ufc/g, obtenues dans tous les cas à partir d'une seule prise d'essai de 25 g sur trois. En prenant en compte de la totalité des produits analysés, 7 % des poissons fumés présentaient une contamination supérieure à la tolérance fixée par la réglementation française (100 ufc/g à DLC).

2-2-3 Diversité génétique des isolats récoltés

L'analyse par macrorestriction *ApaI* et *AscI* des isolats préalablement triés par la RAPD M13, a permis d'identifier 9 pulsotypes se répartissant dans les 7 groupes génétiques suivant : 4 (T4, T4a), 5 (T5d), 6 (T6i, T6g), 9 (T9a), 13 (T13), 17 (T17a), 22 (T22). Parmi ces derniers, 4 sont communs au moins à deux sites de production, à savoir les groupes 2 (site 37 et 5), 4 (site 11 et 14), 6 (site 23 et 37) et 17 (site 13 et 32).

2-2-4 Synthèse des résultats

Les résultats montrent qu'il existe un effet de sélection de clones par les milieux de culture. Les voies de contamination des produits au niveau de la production sont fortement liées au contexte de fabrication. La qualité des matières premières et les contaminations croisées ont une incidence significative sur la prévalence retrouvée en final dans le produit pour le site E1. Pour la fabrication de saumon fumé sur le site E2, une contamination endémique des ateliers a été clairement mise en évidence.

La campagne de prélèvements réalisée dans la grande distribution montre que les poissons fumés sont contaminés en *L. monocytogenes* avec une prévalence importante évaluée à 23 % en période de forte production. En revanche, la contamination est de très faible niveau et se répartit dans le produit de façon très hétérogène. Au total, 7 % des sachets examinés dépassent la norme des 100 ufc/g à DLC.

Concernant l'état des lieux au niveau de la diversité des souches, 15 groupes génétiques ont été identifiés pour lesquels jusqu'à 5 variants ont été mis en évidence (groupe 6 avec les types T6, T6a, T6e, T6i, T6g). Au total, les souches ont été récoltées à partir de 17 sites industriels différents (transformation ou congélation). Parmi les 15 groupes génétiques déterminés, 8 sont communs au moins à 2 sites distincts. Le pulsotype 2, régulièrement isolé à partir des sites E1 et E2 a été également retrouvé dans deux lots analysés lors de la campagne de prélèvements au niveau de la grande distribution.

Tableau 28 : Pouvoir discriminant de la macrorestriction avec les enzymes *ApaI*, *SmaI*, *AscI*.

Groupe Génétiques	No souches	Nombre total de types identifiés					
		<i>ApaI</i>	<i>SmaI</i>	<i>AscI</i>	<i>ApaI</i> + <i>SmaI</i> + <i>AscI</i>	<i>ApaI</i> + <i>SmaI</i>	<i>ApaI</i> + <i>AscI</i>
1	33	3	3	4	7	6	5
2	26	3	2	3	3	3	3
3	3	3	2	2	3	3	3
4	4	2	2	2	2	2	2
5	15	5	6	5	8	7	7
6	34	14	6	3	16	16	14
7	10	7	2	5	7	7	7
8	2	1	1	2	2	1	2
9	11	2	2	2	3	3	2
10	3	2	2	2	2	2	2
11	17	3	3	3	4	4	3
12	2	1	1	1	1	1	1
13	3	2	1	2	2	2	2
15	8	2	2	1	2	2	2
16	5	3	2	3	4	4	3
17	4	2	1	2	2	2	2
18	3	3	2	3	3	3	3
19	3	3	3	3	3	3	3
20	1	1	1	1	1	1	1
21	11	2	1	2	2	2	2
22	1	1	1	1	1	1	1
Total	199	65	46	52	78	75	70

3- Caractérisation de souches isolées des produits de la pêche

Afin de vérifier si les souches issues des produits de la pêche présentent des caractères communs qui pourraient être à l'origine d'une certaine spécificité, une collection de *L. monocytogenes* a été constituée et étudiée. Dans un souci de représentativité de la filière, des isolats issus des auto-contrôles réalisés au sein du laboratoire ainsi qu'une collection de souches constituée lors d'une étude antérieure Européenne (projet FAIR) ont été intégrés à la collection initialement construite avec les souches récoltées au cours des suivis de fabrication (sur les sites E1 et E2) et des campagnes de prélèvement dans la grande distribution. Au total, en utilisant toujours la même stratégie de criblage par RAPD M13, environ 3000 isolats ont été triés et provenaient de 40 sites industriels différents. Une sélection de 308 souches (soit environ 10 % de la collection) a été réalisée pour constituer le panel d'étude et une caractérisation a été réalisée par macrorestriction (*ApaI*, *SmaI*, *AscI*) et par sérotypage. Ce travail a été mis en œuvre en plusieurs étapes.

3-1 Caractérisation par macrorestriction avec 3 enzymes

Dans un premier temps, 199 souches ont été caractérisées par macrorestriction avec les 3 enzymes *ApaI*, *SmaI* et *AscI*. L'ensemble des résultats en terme de nombre de types identifiés et de similarités entre les profils est présenté respectivement dans le tableau 28 et la figure 23 page 115.

3-1-1 Empreintes générées (figure 24, p116 à 119)

Après digestion du génome avec *ApaI*, les empreintes générées se composent en moyenne d'une vingtaine de fragments répartis de façon homogène entre 48 et 500 kb. Avec *SmaI*, les profils apparaissent plus complexes car ils présentent également 15 à 20 fragments mais de taille proche se situant majoritairement entre 48 et 200-250 kb. A l'inverse, *AscI* ne génère jamais plus de 10 fragments visibles dans une large gamme de poids moléculaires comprise entre 48 et environ 700 kb.

3-1-2 Pouvoir discriminant

L'enzyme *ApaI* s'est avérée être l'enzyme la plus discriminante avec 65 types identifiés parmi les 199 souches étudiées alors que les enzymes *AscI* et *SmaI* ont permis de distinguer respectivement 52 et 46 types (tableau 28). En combinant les résultats des 3 empreintes, 78 génotypes apparaissent contre 75 en associant *ApaI* à *SmaI* et 70 en associant *ApaI* à *AscI*.

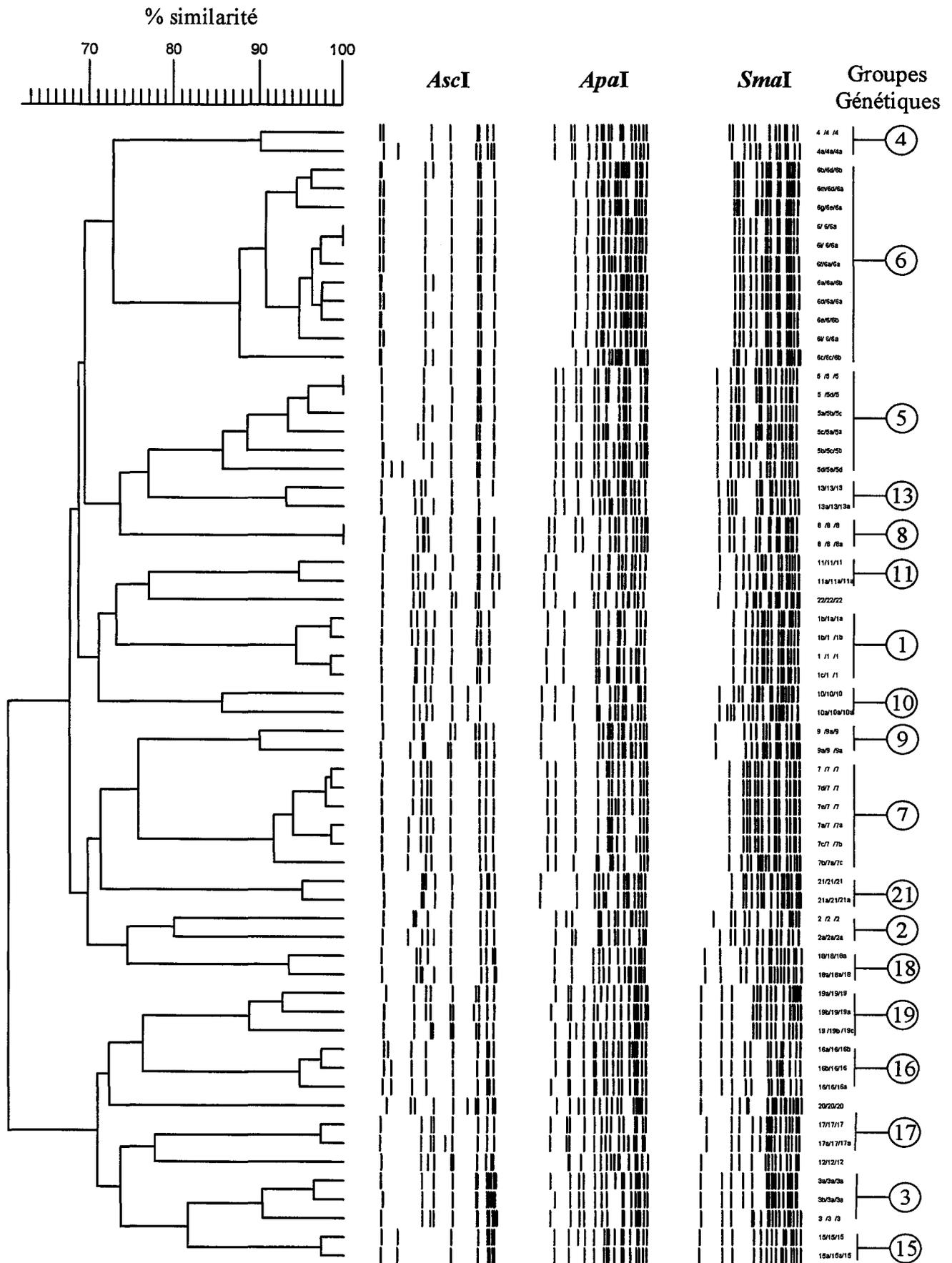
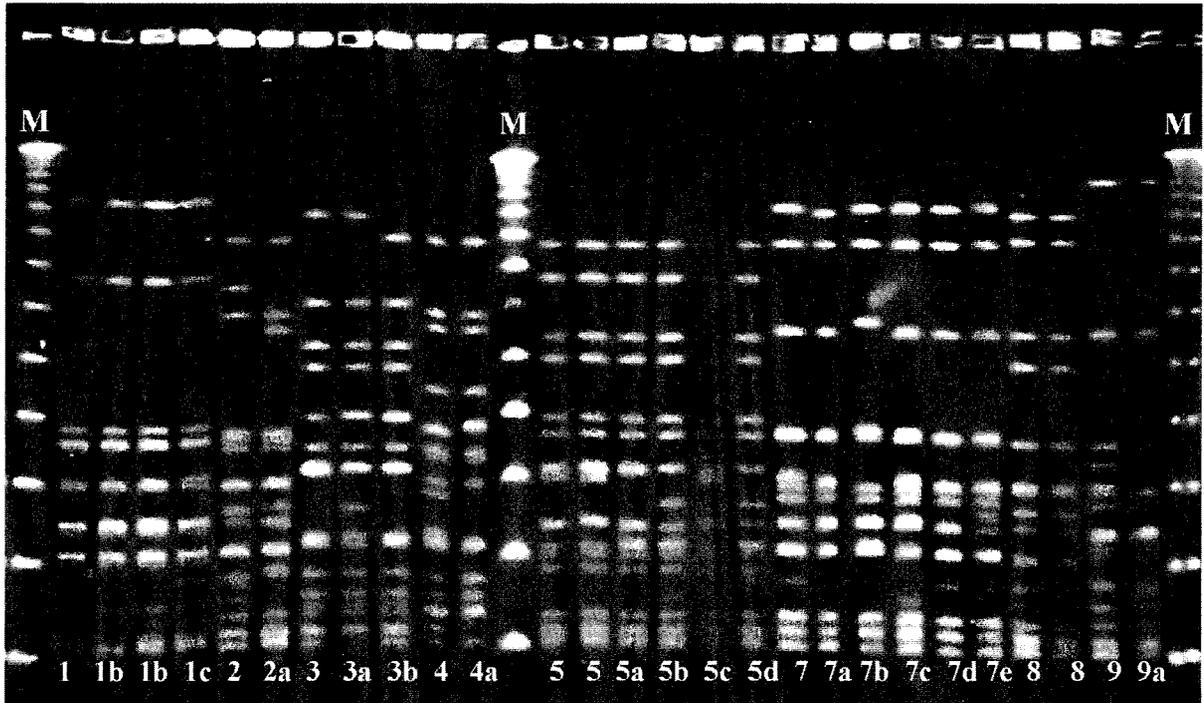


Figure 23 : Analyse du degré de similarité des profils obtenus avec les 3 enzymes *ApalI*, *SmaI* et *AscI*. Dendrogramme construit avec une tolérance de 0,5%. Les numéros en face de chacune des empreintes combinés correspondent respectivement aux types *ApalI*, *SmaI* et *AscI*.

A1



A2

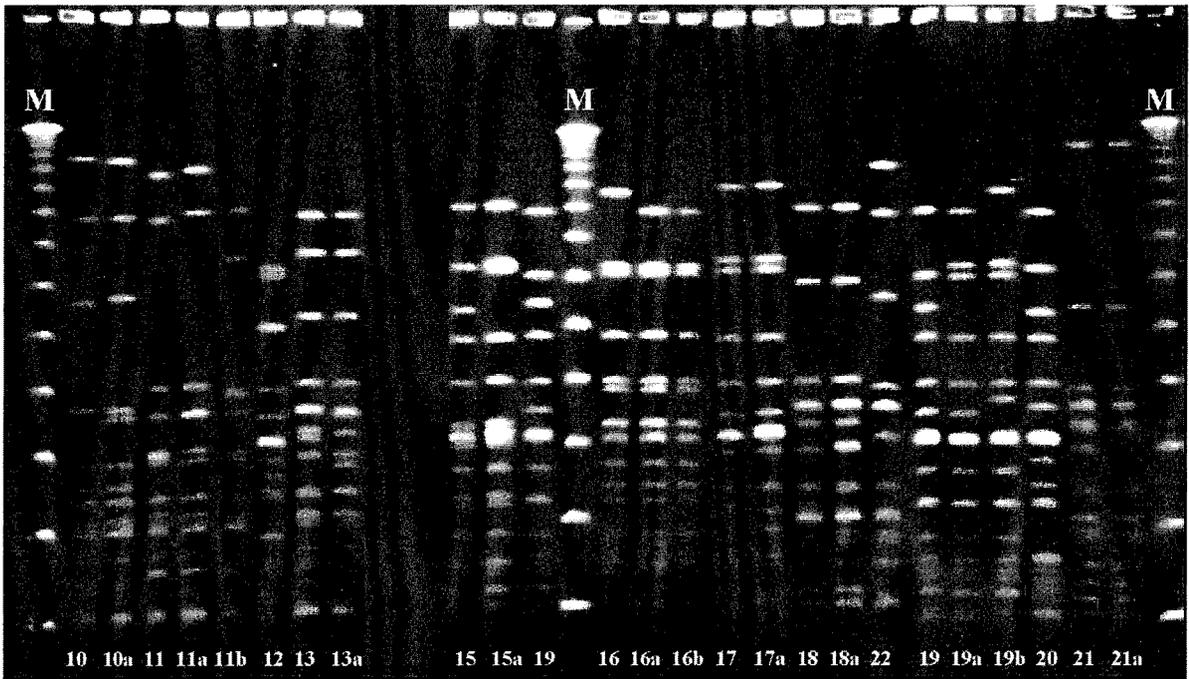
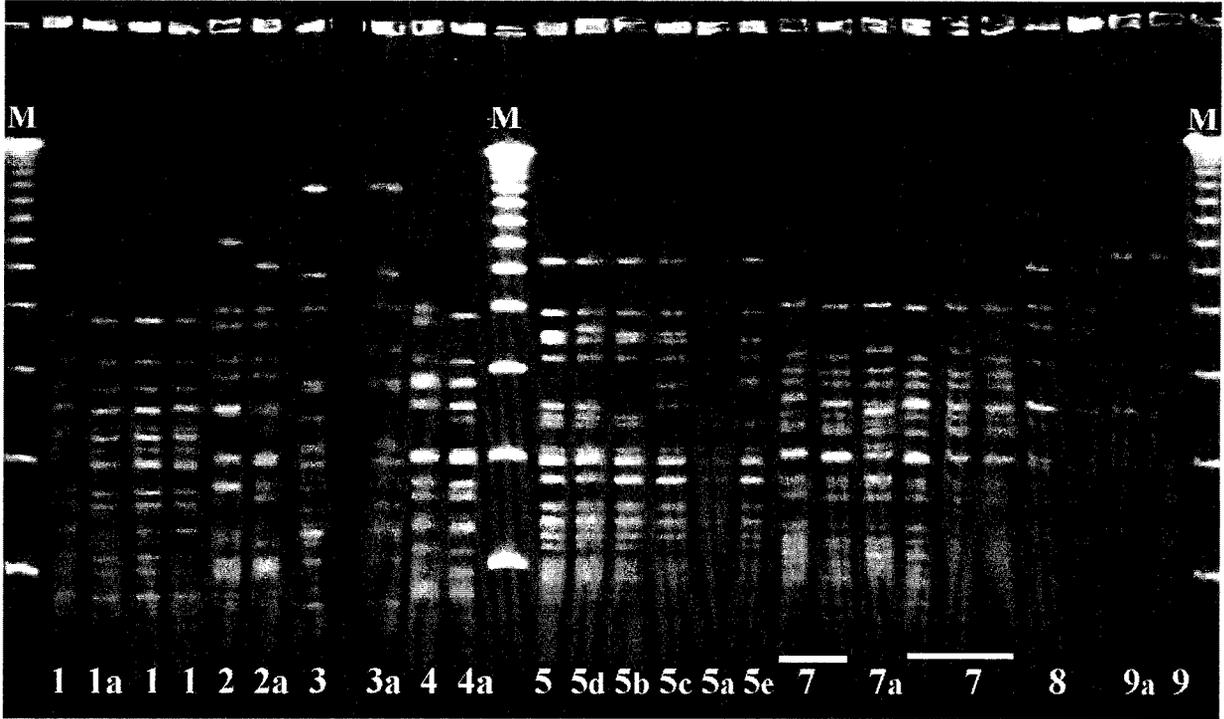
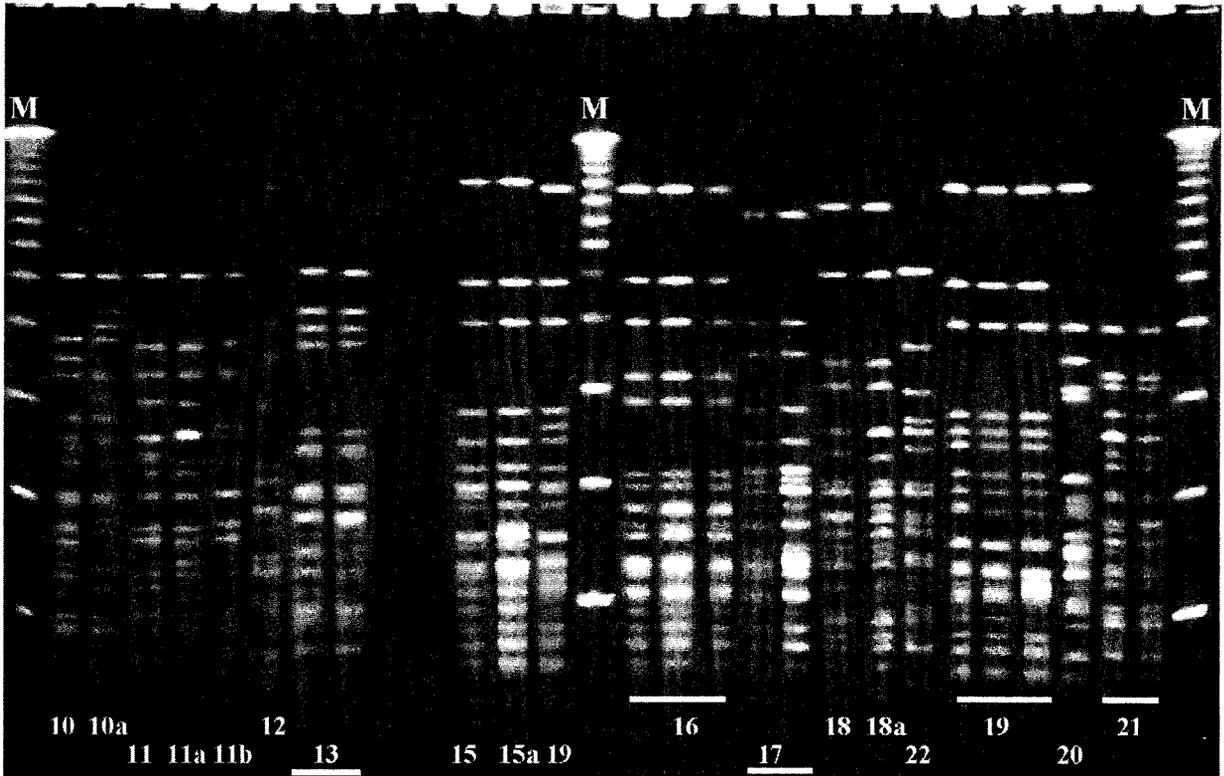


Figure 24 : Exemples de profils générés en macrorestion avec les 3 enzymes de restriction. Gels A1 et A2 = digestions avec *ApaI*, B1 et B2 = digestions avec *SmaI*, gels C1 et C2 = digestions avec *AscI*. La photo D présente les profils associés au groupe génétique 6 après digestion avec *ApaI* et *SmaI* avec des conditions électrophorétiques optimisées. Les numéros figurant en bas de chaque piste indiquent les pulsotypes correspondant. Les pistes M contiennent le marqueur de taille lambda ladder.

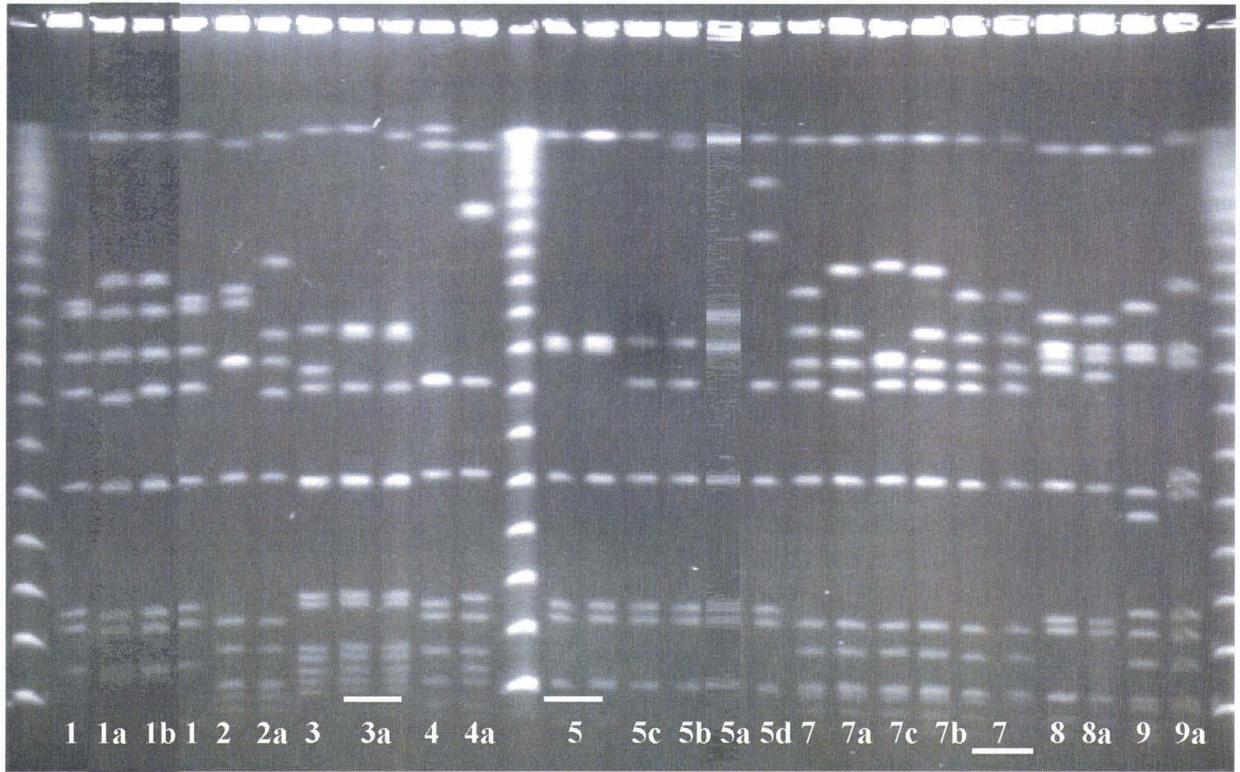
B1



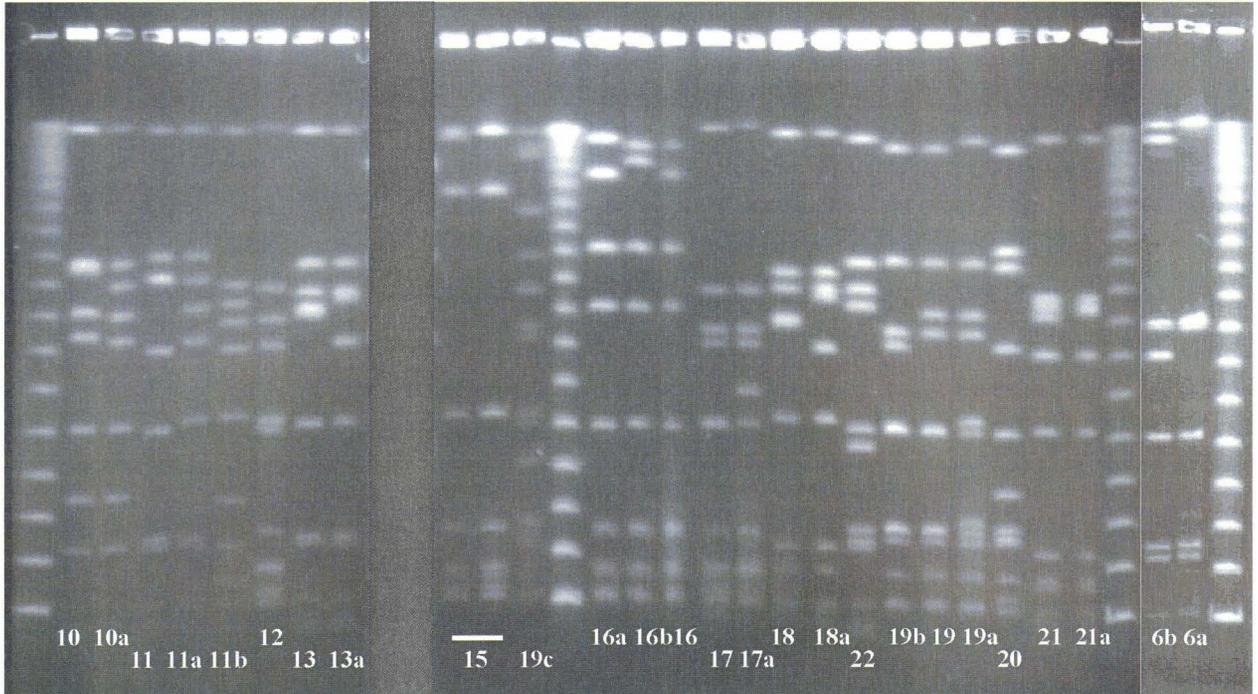
B2



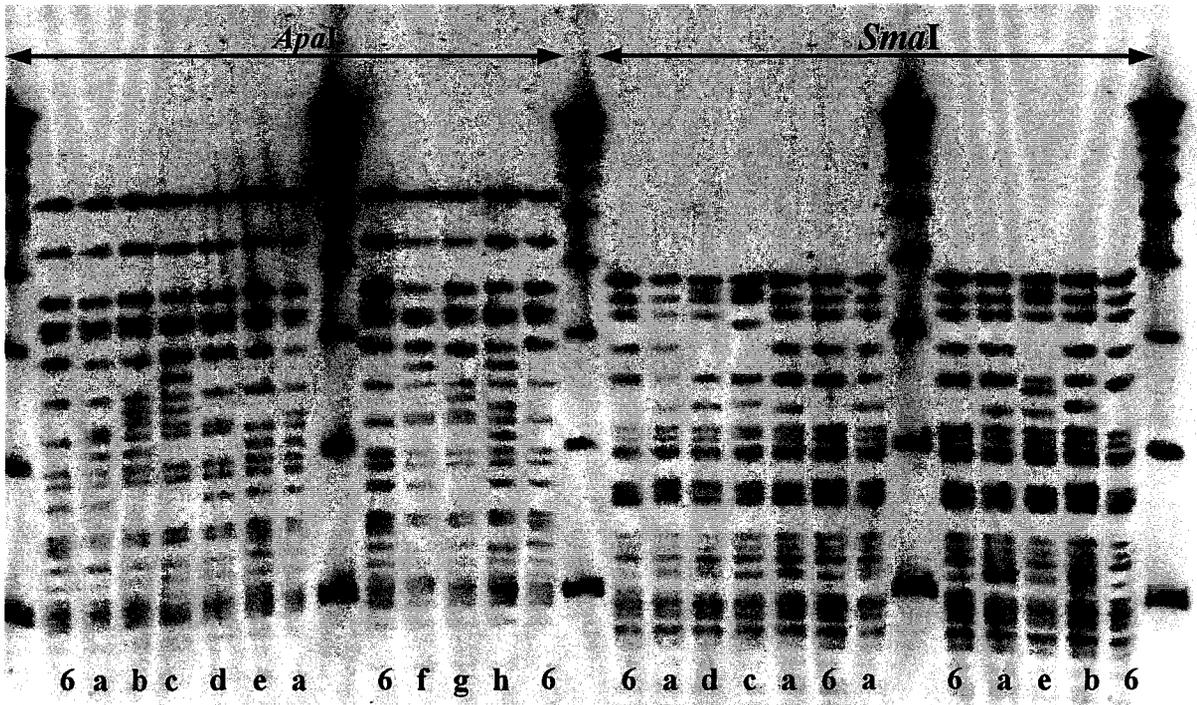
C1



C2



D



3-1-3 Groupes génétiques et variants identifiés

Les profils obtenus avec les 3 enzymes ont été combinés en une seule empreinte et l'analyse du degré de similarité entre chacune a permis de distinguer 21 groupes génétiques (suivant le principe : un groupe réunit les profils ayant au moins 90 % \pm 2 % de similarité) numérotés de 1 à 22 (pas de numéro 14) en reprenant la même nomenclature et le même classement déjà utilisés au moment des suivis de fabrication. La figure 23 donne un aperçu de ces comparaisons à partir des 61 combinaisons majoritairement retrouvées parmi les souches (sur les 78 identifiées au total). Chaque groupe rassemble en moyenne 3 profils très proches correspondant par extension à des variants génétiques. (tableau 28 p 113, combinaison *ApaI* + *SmaI* + *AscI*).

Le groupe 6 se distingue nettement des autres avec un nombre de combinaisons conséquent se traduisant par 16 "versions" différentes détectées. Par ailleurs, les profils générés pour ce même groupe présentent la particularité d'une certaine complexité visualisée avec *ApaI*. En effet, à l'inverse des autres groupes, les profils obtenus avec cette enzyme ne présentent jamais de fragments de taille supérieure à 300 kb pour un même nombre de bandes au total (soit une vingtaine). En conséquence, la détermination précise de chaque sous type a été réalisée suivant une programmation en PFGE ajustée en résolution, spécialement optimisée pour cette application (voir matériels et méthodes).

Les groupes 1 et 5 contiennent 7 à 8 sous-types génétiques et arrivent en deuxième position en terme de nombre de variants génétiques associés à un même groupe.

3-1-4 Stratégie appliquée pour la suite de l'étude

L'identification des groupes génétiques avec seulement l'enzyme *ApaI* est réalisable. Les profils générés par *AscI* confirment l'appartenance à un même type clonal tandis que *SmaI* permet de réaliser une analyse plus fine en terme de discrimination entre les souches.

L'appartenance d'une souche à tel ou tel groupe génétique sera déterminée pour la suite de l'étude selon le principe suivant :

- caractérisation par *ApaI* et *AscI* et analyse des profils (individuellement et combinés).
Un degré de similarité compris entre 88-90 % et 99 % avec un des groupes déjà existant conduit à classer la souche dans le cluster concerné. Lorsque le degré de similarité relevé oscille entre 80 et 88 %, une confirmation est nécessaire à l'aide d'une troisième enzyme (*SmaI*).

Tableau 30 : Classement de chaque groupe génétique par ordre d'importance en fonction du nombre de sites industriels concernés.

No total de sites	Groupe Génétique	No total de souches	Collection Boulogne		Collection FAIR	
			Souches PF/total ¹	No de sites	No souches	No sites
20 (50%)	6	68	18/38	14	30	4
10 (25%)	7	16	5/13	8	3	2
8 (20%)	5	20	12/20	8	–	–
8 (20%)	11	22	8/19	6	3	2
7 (17,5%)	18	10	1/5	5	5	2
6 (15 %)	4	8	4/5	4	3	2
6 (15%)	16	13	2/8	5	5	1
6 (15%)	2	29	13/29	6	–	–
5 (12,5%)	19	7	3/4	3	3	2
5 (12,5%)	10	8	7/8	5	–	–
5 (12,5%)	1	37	20/37	5	–	–
4 (10%)	21	15	1/11	2	4	2
3	3	5	3/5	3	–	–
3	9	14	4/13	2	1	1
3	13	5	1/4	2	1	1
3	17	8	4/7	3	1	1
2	8	2	0/2	2	–	–
2	12	2	0/2	2	–	–
2	15	12	2/8	1	4	1
1	20	2	2/2	1	–	–
1	22	1	1/1	1	–	–
1	24	1	–	–	1	1
1	25	2	–	–	2	1
1	26	1	–	–	1	1
<i>Total : 40</i>		<i>308</i>	<i>111/241</i>	<i>37</i>	<i>67</i>	<i>4</i>

¹ nombre de souches isolées de poissons fumés /nombre total de souches site de Boulogne

- en dessous de 80 % de similarité, l'assignation d'un nouveau groupe génétique est effectuée pour classer la souche.

3-2 Caractérisation du panel de souches "produits de la pêche"

Au total, 308 souches ont été sélectionnées et constituent le panel d'étude pour la caractérisation des *L. monocytogenes* issues des produits de la pêche. Ce panel se compose de 64 souches (21 %) issues du programme Européen FAIR et de 241 souches extraites de la collection de notre laboratoire (collection Boulogne). L'origine des souches concerne majoritairement les espèces saumon et hareng. La répartition exacte par ordre d'importance est présentée dans le tableau 29.

Tableau 29 : Répartition des souches du panel produits de la pêche en fonction de la nature des prélèvements

Origine	saumon	hareng	truite	flétan	perche	thon	colin	lieu	moules	espadon	sole	divers*
No de souches	161	94	13	8	5	4	3	2	2	1	1	14

*prélèvements d'environnement dans des ateliers travaillant plusieurs espèces de poisson ou des plats cuisinés.

Environ la moitié des souches (46 %) récoltées au laboratoire de Boulogne sont issues de poissons fumés (tableau 30). Au total 40 sites industriels répartis sur toute la France ont été examinés (37 pour Boulogne et 4 pour FAIR dont 1 commun aux 2 collections) avec des secteurs d'activité comprenant : le mareyage, l'aquaculture, la transformation (atelier de fumaison principalement) et les plats cuisinés.

3-2-1 Caractérisation par macrorestriction

3-2-1-a Répartition des pulsotypes dans le panel

Le typage moléculaire par macrorestriction avec les enzymes *ApaI* et *AscI* a permis de définir 82 types avec *ApaI* et 68 types par *AscI* (tableau 31 page suivante). En combinant les résultats des 2 enzymes, 104 pulsotypes (notés T) ont été identifiés et se répartissent dans 24 groupes génétiques au total, soit 3 groupes génétiques supplémentaires des 21 précédemment déterminés. Ces 3 nouveaux groupes numérotés 24, 25 et 26 comportent seulement 1 à 2 souches issues de la collection FAIR (le reste étant classé dans un des groupes initialement définis).

Tableau 31: Répartition des variants génétiques dans le panel produits de la pêche.

Groupe génétique	Type <i>Apal</i>	Type <i>Ascl</i>	Pulso-types	No de souches	Code sites	Groupe génétique	Type <i>Apal</i>	Type <i>Ascl</i>	Pulso-types	No de souches	Code sites		
1	1	1	T1	31 (84%)	1-2-4-5	7	7	7	T7	2	3-40		
	1b	1a	T1b	1	1		7a	7a	T7a	1	5		
	1b	1b	T1bb	2	1		7b	7c	T7b	1	1		
	1c	1	T1c	1	nd		7c	7b	T7c	1	22		
2	1	1c	T1c1	2	3	7d	7	T7d	2	nd-25			
	2	2	T2	27 (93%)	1-5-6-7-8-37	7d	7e	T7de	2	39-40			
	2a	7a	T2a	1	5	7e	7	T7e	6	1-2-16-28			
3	2b	2b	T2b	1	6	7f	7d	T7f	1	nd			
	3	3	T3	1	5	8	8	8	T8	1	3		
	3a	3a	T3a	3	9		8	8a	T8a	1	6		
4	3b	3a	T3b	1	10	9	9	9	T9	1	29		
	4	4	T4	3	1-5-14		9a	9a	T9a	11	nd-5		
	4a	4a	T4a	1	11		9a	9	T9a1	1	5		
5	4	4b	T4b	3	39-13	10	9a	9b	T9a2	1	39		
	4	4c	T4c	1	11		10	10	T10	1	15		
	5	5	T5	9 (45%)	1-5-17		10a	10a	T10a	3	1		
6	5a	5c	T5a	2	5-15	10b	10b	T10b	2	9-11			
	5b	5b	T5b	1	5	10c	10a	T10c	2	16			
	5c	5c	T5c	2	5-10	11	11	11	T11	16	1-2-5-16-39-11		
	5c	5a	T5ca	2	5-16		11a	11a	T11a	2	5		
	5d	5d	T5d	3	1-18-12		11a	11	T11a1	1	39		
	5	5d	T5d1	1	10	11b	11b	T11b	1	5			
6	6a	T6	3	5	11c	11d	T11c	1	18				
7	6a	6b	T6a	11 (16%)	1-3-5-6-22-38-39	11	11c	T11c1	1	40			
	6a	6c	T6ac	2	38-39	12	12	12	T12	2	nd-10		
	6a	6f	T6af	3	39		13	13	13	T13	2	2-8	
	6b	6b	T6b	2	5	13a		13a	T13a	3	nd-2-13		
	6c	6b	T6c	1	20	15		15	15	T15	8	5-38	
	6c	6a	T6ca	1	13		15a	15	T15a	2	5-38		
	6d	6a	T6d	3	19-3-26		15c	15a	T15c	2	38		
	8	6e	6b	T6e	1	1	16	16	16a	T16	4	11-30-31	
		6f	6c	T6f	2	39		16a	16b	T16a	2	9	
		6f	6a	T6fa	1	38		16b	16	T16b	5	5-31-39-40	
		9	6g	6a	T6g	9 (13%)	nd-13-23-24-25-27-37-39	16c	16c	T16c	2	40	
			6g	6f	T6gf	2	7-25	17	17	17	T17	1	nd
6h			6b	T6h	1	39	17a		17a	T17a	5	13-32-33	
6i			6a	T6i	6 (9%)	1-37	17b		17a	T17b	1	33	
10			6i	6b	T6ib	4	39-40	17c	17a	T17c	1	33	
			6i	6f	T6if	1	39	18	18	18a	T18	1	20
		6j	6a	T6j	1	3	18a		18	T18a	1	34	
		6k	6a	T6k	1	3	18a		18a	T18aa	1	25	
		11	6l	6a	T6l	1	5	18b	18c	T18b	2	35-36	
	6n		6a	T6n	1	5	18	18b	T18bl	5	38-39		
	6m		6a	T6m	1	21	19	19	19b	T19	3	11-13-39	
	6o		6e	T6o	1	6		19a	19	T19a	1	16	
	6p		6b	T6p	1	13		19b	19a	T19b	2	13-16	
	12		6q	6a	T6q	2	13	19	19c	T19c1	1	35	
			6r	6e	T6r	2	39	20	20	20	T20	2	5
			6X	6X	T6X*	4	38-39		22	22	T22	1	13
21			21	T21	14	6-12-38-39	24		24	19g	T24	1	13
25			21a	21a	T21a	1	6	26	26	26	T26	1	38
			25	25	T25	1	39						
			25a	25a	T25a	1	39						

*non répertorié

nd = non déterminé

Parmi les 104 pulsotypes, 75 % n'ont été identifiés qu'à partir d'un seul site de production. Cependant, pour les groupes génétiques comprenant au moins 15 souches, un des pulsotypes associés apparaît comme prédominant et commun à plusieurs sites. C'est le cas pour les groupes 1, 2, 5, 7, 11, 21 avec respectivement les pulsotypes T1, T2, T5, T7e, T11 et T21. Le groupe génétique 6 rassemble à la fois le plus grand nombre de souches (68) et de pulsotypes associés avec un score de 27 profils différents (mais présentant 90 % de similarité). A l'intérieur de ce cluster, 2 pulsotypes semblent cependant être communs au moins à 7 sites et correspondent aux pulsotypes T6a et T6g.

3-2-1-b Répartition par sites industriels

Les groupes génétiques peuvent être ordonnés en 3 catégories en fonction du nombre de sites à partir desquels ils ont été identifiés qui reflète par extension une certaine fréquence d'identification :

- Catégorie 1, groupes retrouvés dans 10 % à 50 % des sites examinés (tableau 30 p121), soit la moitié des groupes avec par ordre décroissant d'importance : 6, 7, 5, 11, 18, 4, 16, 2, 19, 10, 1 et 21. Le groupe 6 arrive largement en tête et correspond également dans la collection FAIR au seul groupe commun aux 4 sites étudiés. Sur ces 12 groupes, 8 sont également retrouvés dans la collection FAIR et étaient communs au moins à 2 sites dans cette dernière étude (avec une exception pour le groupe 16).
- Catégorie 2, groupes communs à 2 ou 3 sites : 3, 9, 13, 17, 8, 12 et 15. Parmi ces derniers, 3 ne sont pas retrouvés dans la collection FAIR (groupes 3, 8 et 12). Les autres n'étaient identifiés qu'à partir d'un unique site de production dans l'étude FAIR.
- Catégorie 3, groupes représentés par seulement 1 à 2 souches issues d'un seul site de production et spécifiques de chacune des collections : groupes 20 et 22 (collection Boulogne), groupes 24, 25 et 26 (collection FAIR).

Le tableau 32 p 126 présente la répartition des pulsotypes associés à un même groupe génétique en fonction des sites industriels étudiés. A partir de seulement 15 sites différents (soit 37,5 %), il apparaît que 64% des pulsotypes ont été identifiés (67 pulsotypes). Pour un site donné, plusieurs variants génétiques d'un même groupe ont été isolés dans la plupart des

cas à partir de prélèvements distincts (périodes, lots de production, natures différentes). Cependant, des souches présentant un même type clonal ont été mises également en évidence à partir d'une même analyse ou d'une même série de prélèvements. Les 6 cas de figure suivants ont été enregistrés : T5/5c, T5c/5d1, T6a/6e, T6g/6i, T17a/17b/17c et T19a/19b (tableau 32).

Tableau 32 : Répartition des variants génétiques par sites industriels

Localisation	Groupe génétique	Pulsotypes identifiés pour un même groupe génétique	No de Prélèvements*
Site 1	1	T1-T1b-T1bb	3
	5	T5-T5d	2
	6	T6a-T6e-T6i	2
	7	T7b-T7e	2
Site 2	13	T13-T13a	2
Site 3	6	T6a-T6d-T6j-T6k	4
Site 5	2	T2-T2a	2
	5	T5-T5a-T5b-T5c-T5ca	4
	6	T6-T6a-T6b-T6l-T6m	5
	9	T9a-T9a1	2
	11	T11-T11a-T11b	2
	15	T15-T15a	2
Site 6	2	T2-T2b	2
	6	T6a-T6o	2
	21	T21-T21a	2
Site 10	5	T5c-T5d1	2
Site 11	4	T4a-T4c	2
Site 13**	6	T6ca-T6g-T6p-T6q	4
	19	T19-T19b	2
Site 16	19	T19a-T19b	2
Site 31	16	T16-T16b	2
Site 33	17	T17a-T17b-T17c	3
Site 37	6	T6g-T6i	1
Site 38**	6	T6a-T6ac-T6fa-T6X	4
	15	T15-T15a-T15c	3
Site 39**	6	T6a-T6ac-T6af-T6f-T6g-T6h-T6ih-T6if-T6r-T6X	10
	11	T11-T11a1	2
	25	T25-T25a	2
Site 40**	7	T7-T7de	2
	16	T16b-T16c	2

*correspond au nombre minimum de prélèvements analysés pour mettre en évidence les pulsotypes

Les chiffres en gras indiquent les fois où plusieurs pulsotypes ont été détectés à partir d'un même prélèvement ou d'un même lot de produit.

**En grisé, les sites analysés dans le cadre du programme FAIR. Les informations sur la récolte des souches ne sont pas disponibles mais 1 seul isolat a été examiné par prélèvement positif.

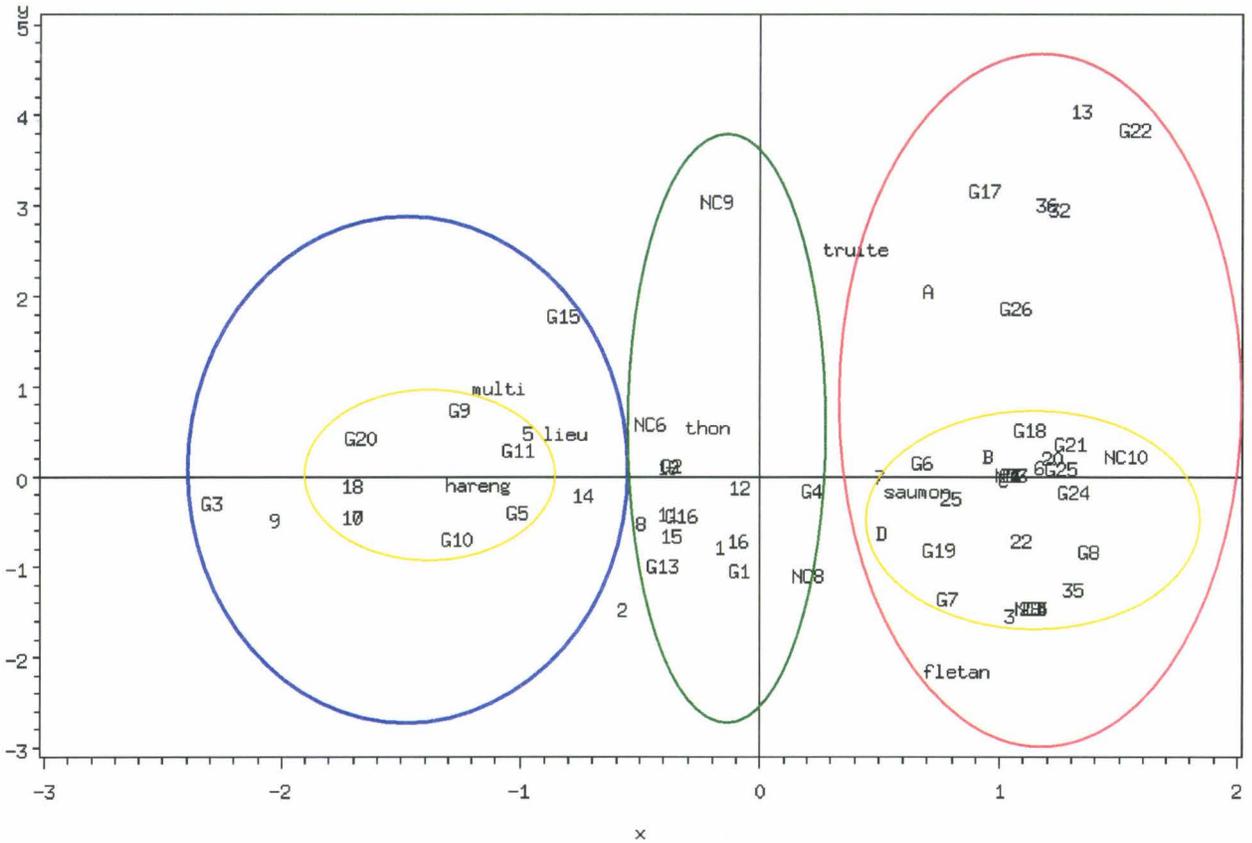


Figure 25 : Analyse Factorielle des correspondances multiples réalisée à partir des données sur les pulsotypes, espèces de poissons et sites industriels.

Les groupes génétiques sont notés G tandis que les sites sont codifiées par des numéros. Lorsque les souches provenaient de sites non identifiés, ceux-ci ont été notés NC (NC1 à NC10). Les usines étudiées dans le cadre du projet FAIR sont notées sur la figure A, B, C, D.

"multi" indique les prélèvements ne concernant pas une espèce en particulier (environnement, plats cuisinés...).

Les cercles jaunes entourent les groupes génétiques significativement associés au hareng (à l'intérieur du cercle bleu) et au saumon (à l'intérieur du cercle rouge).

Tableau 33 : Répartition des groupes génétiques par espèces de poissons

Spécificité des groupes génétiques			
	Classe hareng	Classe intermédiaire	Classe saumon
Spécificité significative	G5	G1	G6
	G9	G2	G7
	G10	G4	G8
	G11	G13	G18
	G20	G16	G19
			G21
		G24	
		G25	
Spécificité relative	G3		G17
	G15		G22
			G26

3-2-1-c Répartition des groupes génétiques par espèce de poisson

La répartition des groupes génétiques en fonction des espèces a été réalisée par une Analyse Factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) à partir des données reliant les pulsotypes, la nature des prélèvements et les sites de production (figure 25). Pour ce travail, les espèces moule, colin, perche, sole et espadon n'ont pas été prises en compte en raison du faible nombre de souches les représentant dans la collection (ainsi le groupe G12 n'apparaît pas sur la figure).

Le positionnement de chacun des groupes sur l'axe horizontal (axe de projection le plus informatif), fait apparaître une répartition en 3 classes :

- En négatif, une prédominance pour l'espèce hareng, (cercle bleu),
- En positif, une prédominance pour l'espèce saumon (cercle rouge).
- Au milieu, une classe intermédiaire, dans laquelle figure le thon.

Le deuxième axe (axe vertical) se caractérise par l'opposition entre les espèces truite et flétan, respectivement positionnées en positif et négatif.

Enfin, plus un point est proche d'une espèce, plus il est significativement associé à l'espèce. Sur ce principe, 2 noyaux apparaissent respectivement autour de hareng et saumon (cercles jaunes) très spécifiques de ces espèces, la classe intermédiaire étant représentée par le cercle vert. A partir de ces observations, les groupes génétiques peuvent être subdivisés en 3 classes suivant le schéma présenté dans le tableau 33 :

- La classe hareng, comprend les 5 groupes apparaissant comme spécifiques G5, G9, G10, G11 et G20. La projection des 2 autres groupes G3 et G15 indique au niveau de leur positionnement une spécificité plus relative.
- La classe saumon se compose des 8 groupes G6, G7, G8, G18, G19, G21, G24 et G25. Les trois autres groupes plus éloignés du noyau spécifique semblent davantage être associés aux sites dont ils proviennent qu'à une espèce en particulier : G17 a été effectivement isolé des sites 32 et 13, G22 vient du site 13, et G26 du site A (soit le site 38 dans la codification du tableau 31 p 123).
- La classe intermédiaire rassemble les 5 groupes G1, G2, G4, G13 et G16 correspondant à 28 % des souches du panel et non associés de façon significative à une espèce de poisson. A cette liste peut être rajouté G12, ne figurant pas dans cette analyse mais ne présentant pas de spécificité (1 souche hareng et 1 souche moules cuites).

Tableau 34: Distribution des sérotypes par groupes génétiques de la collection produits de la pêche.

Groupe Génétique	Total souches	No de souches sérotypées	Répartition par sérotypes					
			1/2a	1/2b	1/2c	4b/e	3a	3b
1	37	36	36					
2	29	27	25	2				
3	5	4		4				
4	8	7	7					
5	20	18	16	2				
6	68	64	60	2			2	
7	16	15	2		13			
8	2	1			1			
9	14	12	11				1	
10	8	7	7					
11	22	21	17	3			1	
12	2	2		1				1
13	5	4	3	1				
15	12	12				12		
16	13	11				11		
17	8	5		4				1
18	10	9	9					
19	7	6				6		
20	2	2				2		
21	15	15	13	1			1	
22	1	1	1					
24	1	1				1		
25	2	2	2					
26	1	1	1					
total	308	283	210	20	14	32	5	2
pourcentage		92 %	74,2 %	7,1 %	4,9 %	11,3 %	1,8 %	0,7 %

Tableau 35 : Répartition des sérotypes dans chacune des collections de souches produits de la pêche.

Collection	Total souches	Souches sérotypées	1/2a	1/2b	1/2c	4b/e	3a	3b
Boulogne	241	216 (90 %)	159 (73,6 %)	19 (8,8 %)	11 (5,1 %)	20 (9,2 %)	5 (2,3 %)	2 (1 %)
FAIR*	277	277	228 (82,3 %)	1 (0,4 %)	7 (2,5 %)	24 (8,7 %)	17 (6,1 %)	0 -

*répartition sur la totalité de la collection FAIR. Données transmises par l'ASEPT.

3-2-2 Caractérisation par sérotypage

3-2-2-a Sérotypes identifiés

La caractérisation par sérotypage a été réalisée sur 92 % des souches du panel produits de la pêche (tableaux 34 et 35). Six sérotypes sur les 13 existants sont représentés dans la collection à savoir par ordre d'importance, les sérotypes 1/2a, 4b/e, 1/2b, 1/2c, 3a et 3b. La majorité des souches appartiennent au sérotype 1/2a avec un score de 74,2 %. Le sérotype 4b/e est représenté dans chacune des collection par des scores voisins : 9,2 % (collection Boulogne) et 8,7 % (collection FAIR) (tableau 35). A partir des données de la collection Boulogne, il apparaît que le sérotype 4b/e a été isolé aussi bien à partir de poissons fumés que de toutes autres natures de prélèvement (matière première, environnement, produits en cours de fabrication...) (tableau 30 p 121, groupes génétiques 16, 19, 15, 20).

En comparant les résultats obtenus entre les deux collections de souches constituées séparément et sur des périodes différentes (projet FAIR 1996-1999), la répartition des sérotypes reste de même ordre (tableau 35). La principale différence se situe au niveau des 1/2 b, quasiment absents de la collection FAIR et majoritairement représentés par les groupes génétiques 3,17 et 12 appartenant à la catégorie 2 (groupes communs à seulement 2-3 sites).

3-2-2-b Relation groupes génétiques et sérotypes

Tous les groupes génétiques définis se caractérisent par un sérotype majoritaire (tableau 34). En ne prenant compte que des groupes représentés au moins par 2 souches, 95 % des souches classées dans les groupes 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 18, 21 et 25 appartiennent aux sérotypes 1/2a (93 %) ou 3a (2 %, c'est à dire de même type flagellaire). De même, les souches des groupes 3, 12 et 17 appartiennent en majorité au sérotype 1/2b (82 %) ou bien dans les autres cas au sérotype 3b (18 %, c'est à dire de même type flagellaire). Le sérotype 1/2c est représenté à 100 % avec les groupes 7 et 8. Enfin, toutes les souches sans exception des groupes 15, 16, 19 et 20 ont été identifiées 4b/e.

En conclusion, une bonne corrélation entre le classement des souches par macrorestriction et par sérotypage a été mise en évidence.

Tableau 36 : Détermination d'un niveau de virulence *in vitro*.

	Groupe génétique	Pulsotype	Sérotype	n°souche	origine	Niveau de Virulence ¹	Ecart type	No de test	
Classe saumon	6	T6g	1/2a	CP512AS1	Saumon fumé	5,41	0,37	3	
		T6i	1/2a	C5204 PS	Saumon fumé	5,10	0,25	3	
		T6a	1/2a	C5138 OS	Saumon frais	5,47	0,05	3	
		T6	1/2b	C2815P	Saumon fumé	5,83	0,25	3	
	7	T7e	1/2c	C5405 OT	Saumon fumé	5,71	0,26	5	
		T7e	1/2c	D139 OT	Saumon fumé	5,80	0,17	3	
	8	T7	nd	DA439P	Environ saumon	5,92	0,10	3	
		T8	1/2c	B88O	Peau saumon frais	5,45	0,28	2	
	18	T18a	1/2a	D2413P1	Hareng congelé	5,52	0,12	3	
	19	21	T21	1/2a	D408 PT	Saumon frais	6,18	0,13	4
		T19	4b	CIP103322	Epidémie Suisse 1987	6,61	0,16	4	
		T19	4b/e	DSS1039BFA1	Hareng fumé	6,33	0,19	4	
		T19	4b/e	DA1591d	Environ saumon	6,09	0,21	3	
	17	T17a	1/2b	CP557CS2	Saumon fumé	5,91	0,04	3	
		T17c	nd	DSFS2	Poisson pané	5,88	0,13	3	
		T17b	nd	DSFSC1	Poisson pané	6,16	0,10	3	
	22	T22	1/2a	CP520APS	Saumon fumé	5,80	0,06	2	
26		T26	1/2a	DA784 3k	Saumon mat 1 ^{ière}	6,74	0,09	2	
Classe hareng	5	T5c	1/2a	CS163P1	Hareng congelé	6,00	0,25	5	
		T5a	1/2b	C1058P	Hareng congelé	5,96	0,09	3	
		T5d	nd	DSS1145RFA1	Hareng fumé	5,92	0,08	3	
	9	T9a	1/2a	CS696 A1	Environ hareng	6,36	0,10	3	
		T10	1/2a	B136P2F	Poisson fumé	5,83	0,01	1	
	10	T10a	1/2a	CL219S2	Environ hareng	Trous*	-	3	
		T10b	1/2a	BSS765BA3	Hareng fumé	Trous*	-	3	
		T10a	1/2a	DSS835CA1	Hareng fumé	Trous*	-	3	
		T10c	1/2a	DPF234HG2	Hareng salé	Trous*	-	3	
		T10c	1/2a	DSS794AA1	Hareng fumé	Trous*	-	3	
		T10b	1/2a	DSS1130BFA2	Hareng fumé	Trous*	-	3	
	11	T11	1/2b	CS165 TP1	Hareng congelé	6,24	0,18	5	
		T11	1/2b	C1056P	Hareng congelé	4,19	0,18	3	
		T11	1/2a	DPF 248.5	Saumon salé	6,45	0,18	3	
	20	T20	4b/e	CS506BPS1	Hareng fumé	6,39	0,21	2	
15		T15	4b/e	C847P1	Hareng congelé	6,22	0,06	2	
Classe intermédiaire	1	T1	1/2a	C3201 O1	Hareng congelé	5,95	0,31	3	
		T1	1/2a	C356S1	Nett & désinfect. E2	5,64	0,23	3	
		T1	1/2a	C5276T	Saumon fumé	5,70	0,09	3	
		T1	1/2a	DS690BS	Hareng fumé	5,81	0,4	3	
	2	T2	1/2a	C698S	Nett & désinfect. E1	6,08	0,24	4	
		T2	1/2a	C369S2	Nett & désinfect. E2	5,53	0,82	4	
		T2	1/2a	DSS1208AFC1	Carpaccio saumon	4,79	0,38	4	
	4	T2	1/2a	D1452OT1	Saumon frais	5,78	0,32	2	
		T2b	1/2a	C5138DNT	Saumon frais	5,57	0,01	2	
		T4	1/2a	CP614CS2	Hareng fumé	5,48	0,19	3	
		T13	1/2a	C4283	Hareng congelé	5,62	0,25	2	
	13	T13a	1/2a	DA1139.1	Saumon mat 1 ^{ière}	5,62	0,06	2	
		T16	4b/e	DHN12	Epidémie Canada 1980	5,14	0,12	3	
		16	T16b	4b/e	C442P1	Hareng congelé	6,24	0,19	3
	T16		4b/e	DPF263 H5	Hareng congelé	6,44	0,11	3	
	nd	nd	1/2a	EGD300**	Type virulent	5,93	0,13	11	
nd	nd	nd	IN12**	Type hypovirulent	3,18	0,48	9		
nd	nd	nd	IN13**	Réf valeur seuil	5,06	0,26	11		

1 = moyenne en log du nombre de plages de lyse pour 10⁷ bactéries déposées par puits.

nd = non déterminé, *Pas de plages de lyse en 24 h, **souches de référence pour le test *in vitro*

En gras apparaissent les souches présentant un niveau de virulence *in vitro* inférieur à la valeur seuil (5,06)

3-2-3 Caractérisation d'un niveau de virulence

Ce travail a été réalisé en deux étapes. Un premier criblage des souches a été effectué avec le test *in vitro* utilisant la lignée cellulaire HT-29, puis des confirmations *in vivo* sur test souris ont été mises en œuvre dans un deuxième temps.

3-2-3-a Résultats des tests *in vitro*

Au total 52 souches ont été caractérisées *in vitro* sur un niveau de virulence et se répartissent de la façon suivante : 47 souches sélectionnées du panel produits de la pêche, 2 souches de collection issues d'épidémies majeures (Suisse 1983 et Canada 1980), 3 souches référencées INRA pour le calibrage du test (tableau 36). Les souches classées dans les 4 groupes génétiques peu représentés dans le panel G3, G12, G24 et G25 n'ont pas été testées. Toutes les expérimentations ont été réalisées en double, en moyenne trois fois avec un bon niveau de reproductibilité (écart type <0,5) excepté pour une souche (C369S2 du groupe 2, tableau 36).

Toutes les souches ont généré des plages de lyse après 24 h d'incubation (conditions normales du test) à l'exception des 6 appartenant au groupe génétique 10 et aux pulsotypes 10a, 10b ou 10c (visualisation de "trous" dans le tapis cellulaire à 24 h). Pour ces dernières, des plages de lyse ont été seulement observées après une incubation prolongée à 72 h (données non montrées). Ce phénomène traduit une possible avirulence nécessitant une confirmation par test sur souris.

A partir des souches issues du panel des produits de la pêche, la gamme des valeurs relevées déterminant un niveau de virulence dans le test *in vitro*, s'est située entre $4,19 \pm 0,18$ (n° C1056P, pulsotype T11) et $6,74 \pm 0,09$ (n° DA784 3k, pulsotype 26) avec une moyenne globale de 5,83 pour un écart type de 0,46. Les deux souches issues d'épisodes épidémiques ont généré des valeurs très différentes entre elles, soit $5,14 \pm 0,12$ (souche Canada) et $6,61 \pm 0,16$ (souche Suisse). Deux souches respectivement classées dans les groupes 2 et 11 se distinguent du reste du panel en affichant des valeurs inférieures à 5 : n° DSS1208AFC1 ($4,79 \pm 0,38$) et n° C1056P ($4,19 \pm 0,18$). En comparaison avec les résultats de la souche IN13, virulente mais associée à une valeur seuil et la souche IN12 identifiée comme hypovirulente, les deux souches DSS1208AFC1 et C1056P sont considérées comme potentiellement hypovirulentes dans le test *in vitro* car elles se positionnent dans la plage 3,18-5,06.

Il n'y a pas de différence significative entre les souches issues des groupes génétiques saumon, hareng et de la classe intermédiaire, les valeurs moyennes relevées étant respectivement de $5,86 \pm 0,38$, $5,96 \pm 0,66$ et $5,73 \pm 0,39$.

Tableau 37 : Niveau de virulence moyen *in vitro* en fonction du sérotype

Sérotype	Nombre de souches	niveau de virulence moyen*	Ecart type
1/2a	23	5,77	0,43
1/2b	5	5,62	0,82
1/2b**	4	5,98	0,18
1/2c	3	5,65	0,15
4b/e	6	6,27	0,13

*moyenne des valeurs relevées dans le test *in vitro* HT-29

**calcul en excluant la souche C1056P identifiée hypovirulente dans le test *in vitro*.

Tableau 38 : Confirmation de l'hypovirulence *in vitro* et *in vivo* par le laboratoire de l'INRA

n°souche	Tests <i>in vitro</i> plages de lyse		Tests <i>in vivo</i> ¹		
	Plages de lyse ² Moyenne (log) ± écart type	Interprétation	Test rate ³ Moyenne (log) ± écart type	Ratio souris ⁴	Interprétation
CL219S2	trous ²	A/hypovirulente ⁵	nf	nf	-
BSS765BA3	trous ²	A/hypovirulente ⁵	nf	nf	-
DSS835CA1	trous ²	A/hypovirulente ⁵	nf	nf	-
DPF234HG2	trous ²	A/hypovirulente ⁵	2,76 ±0,06	2/5	hypovirulente
DSS794AA1	trous ²	A/hypovirulente ⁵	nf	nf	-
DSS1130BFA2	trous ²	A/hypovirulente ⁵	0,47	1/5	hypovirulente
C1056P	3,31 ±0,14	hypovirulente	5,02 ±0,20	5/5	virulente
DSS1208AFC1	4,66 ±0,06	virulente	nf	nf	-
EGD300 ⁶	5,98 ±0,46	virulente	nt	nt	nt
IN12 ⁶	2,58 ±0,11	avirulente	0	0/5	avirulente
IN13 ⁶	3,70 ±0,12	virulente	3,95 ±0,35	4/5	virulente

¹ injection sous cutanée plantaire sur souris immunocompétentes

² moyenne en log du nombre de plages de lyse pour 10⁷ bactéries déposées par puits. Trous = pas de plages de lyse en 24h.

³ moyenne en log du nombre de bactéries dans la rate 3 jours après l'injection.

⁴ nombre de souris infectées/nombre de souris inoculées.

⁵ classées avirulentes/hypovirulentes.

⁶ résultats INRA des souches utilisées pour le calibrage du test plages de lyse lors de la caractérisation du panel produits de la pêche (tableau 36 p 131).

nf = non fait et nt = données non transmises.

De même, en ne prenant en compte que des espèces de poisson dont sont issus les prélèvements, à savoir saumon ou hareng, les valeurs moyennes obtenues restent proches, et correspondent respectivement à $5,77 \pm 0,34$ et $5,91 \pm 0,55$. En comparant les valeurs moyennes issues d'une part des 12 souches isolées de poissons fumés et d'autre part des 19 souches récoltées de produits non transformés (frais ou congelés), un niveau de virulence identique est obtenu soit $5,81 (\pm 0,34$ pour le fumé et $\pm 0,60$ pour le cru).

En revanche, les valeurs moyennes relevées entre les sérotypes présentent une certaine variabilité : d'une part les souches du groupe 1/2 se situent en moyenne autour de 5,68 ($1/2a = 5,77 \pm 0,43$; $1/2b = 5,62 \pm 0,82$; $1/2c = 5,65 \pm 0,15$) alors que le groupe des 4b/e affichent des valeurs toujours supérieures à 6 et se caractérise par une moyenne globale de $6,27 \pm 0,13$ (tableau 37). En excluant la souche 1/2b n°C1056P identifiée comme hypovirulente dans le test *in vitro*, les groupes 1/2b et 4b/e sont associés à des niveaux de virulence autour de 6 avec une dispersion homogène (tableau 37). De plus, les plages de lyses observées à partir des souches de sérotype 4b/e présentaient des tailles supérieures au reste du panel et pouvaient être visualisées et dénombrées après 18h d'incubation (au lieu de 24 h, données non montrées).

3-2-3-b Résultats des tests de confirmation *in vitro* et *in vivo*

A partir des souches classées comme potentiellement avirulentes/hypovirulentes dans le test *in vitro* réalisés lors du criblage de la collection produits de la pêche, des tests de confirmation à la fois *in vitro* et *in vivo* ont été mis en œuvre à l'INRA. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 38.

Les 6 souches de groupe 10 ont été confirmées comme ne formant pas de plages de lyse en 24h dans le test *in vitro* et les résultats des tests sur souris mis en œuvre à partir de 2 d'entre elles (souches n° DSS1130BFA2, du pulsotype 10b et DPF234HG2, du pulsotype 10c) indiquent une hypovirulence avec 1 à 2 souris faiblement infectées en 3 jours sur les 5 inoculées (test rate, tableau T11).

Les deux autres souches, des pulsotypes T11 et T2 ont respectivement été identifiées comme virulentes soit à partir du test sur souris (souches n°C1056P), soit à partir du test *in vitro* (souches n°DSS1208AFC1).

3-2-4 Synthèse des résultats

En combinant les empreintes obtenues en macrorestriction avec *ApaI* et *AscI*, 104 pulsotypes ont été identifiés à partir des 308 souches du panel produits de la pêche. La collection peut être classée en groupes génétiques suivant le degré de similarité observé au niveau des profils électrophorétiques ($90 \% \pm 2\%$ au minimum). Sur cette base, les souches ont été répertoriées dans 24 groupes distincts et chacun se caractérise par un sérotype prédominant. Dans la majorité des cas, les variants génétiques (pulsotypes associés à un même groupe) n'ont été isolés qu'à partir d'un seul site industriel. La moitié des groupes génétiques sont retrouvés au moins à partir de 4 à 18 sites industriels sur les 40 examinés.

Les espèces hareng et saumon ne sont pas contaminées par les mêmes groupes génétiques de *L. monocytogenes*. L'analyse statistique a permis de subdiviser en 3 classes les données suivant le niveau de spécificité visualisé en AFCM : classe hareng, classe saumon et classe intermédiaire (rassemblant les groupes génétiques non associés significativement à une espèce de poisson).

Enfin, 6 souches sur 47 (13 %) sélectionnées du panel produits de la pêche ont été identifiées comme hypovirulentes à partir des tests *in vitro* et/ou *in vivo* (sur souris). Elle appartenaient toutes au groupe génétique 10, spécifique du hareng (d'origine Norvège) et avaient été isolées de 4 sites de production différents.

Tableau 39: Détermination des génotypes de souches autres filières.

n°souche	Année ¹	Filière	Origine	sérotypage	Type macrorestriction		
					<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	Pulsotype ²
A1b	1996	Fromage	Sol en carrelage	1/2b	3c	3b	T3c
A4b	1996	Fromage	Fromage pasteurisé	1/2a	14	14	T14
E4	1997	Fromage	Lait	1/2a	21	21	T21
J12	1996	Fromage	Fines de fromage	1/2c	7	7	T7
F3a	1998	Produits laitiers frais	Lait cru	4b	15	15	T15
F5	1998	Produits laitiers frais	Lait cru	1/2a	23	23a	T23a1
G3	1997	Produits laitiers frais	Lait cru	4b	19	19b	T19
G5a	1998	Produits laitiers frais	Lait cru	1/2b	28	28	T28
H11	1998	Produits laitiers frais	Lait cru	1/2a	27	27	T27
B5	1997	Porc	Bardière	1/2a	6k1	6a	T6k1
B10a	1997	Porc	Epaule porc	1/2a	6f1	6a	T6f1
B21a	1997	Porc	Saucisson	1/2a	6k1	6a	T6k1
B165a	1997	Porc	Petit matériel en inox	1/2a	6d	6a	T6d
C4	1997	Porc	Lardons	1/2a	6f1	6a	T6f1
C6	1997	Porc	Sol en carrelage	1/2a	6i	6a	T6i
C2859	2000	Porc	Rillettes	4b/e	15a	15	T15a
C2952	2000	Porc	Rillettes	1/2a	18a	18	T18a
C1092	2000	Porc	Poitrine fumée	1/2a	6h	6b	T6h
C3260	2000	Porc	Jambon	1/2a	21	21	T21
C8	1997	Volaille	Volaille crue	1/2a	1	1	T1
K5d	1998	Volaille	Sol en résine	1/2b	17b	17a	T17b
K6c	1998	Volaille	Sol en résine	3a	6f1	6a	T6f1
K11c	1998	Volaille	Sol en résine	1/2b	17	17a	T17a1
K17c	1998	Volaille	Sol en résine	1/2a	18a	18b	T18ab
C2956	2000	Volaille	Rillettes d'oie	1/2c	7	7	T7
H7764 ³	?	Volaille	Viande de dinde	1/2a	30	30	T30
C2822	2000	Plats cuisinés	Crêpe campagnarde	1/2a	6f	6a	T6fa
C1868	2000	Plats cuisinés	Ficelle Picarde	1/2a	18a	18	T18a
H7738 ³	?	Plats cuisinés	Hot dog	4b	15'	15	T15'

¹année d'isolement² en gras figurent les pulsotypes déjà identifiés dans le panel produits de la pêche.³à partir des profils publiés, Graves *et al.* 2001.

4- Comparaison des profils génétiques du panel "produits de la pêche" avec ceux issus de souches cliniques et "autres filières" .

L'objectif de ce travail était de vérifier si les souches issues des produits de la pêche présentent une spécificité filière qui pourrait être reliée à une origine commune des souches c'est à dire une même niche écologique constituée par le milieu marin ou d'une façon plus générale le milieu aquatique. Pour cela, la base de données de profils génétiques construite à partir du panel produits de la pêche a été confrontée d'une part à des profils issus d'une collection de souches d'autres filières et d'autre part à des profils générés par des souches isolées de cas cliniques (chez l'homme et l'animal).

4-1 Comparaisons avec le panel "autres filières"

4-1-2 Typage d'une collection de souches "autres filières"

Au total 27 souches isolées des filières fromage, produits laitiers frais, porc, volaille et plats cuisinés ont été caractérisées en macrorestriction avec les enzymes *ApaI* et *AscI*. Les pulsotypes des 2 souches H7764 et H7738 ont été déterminés seulement à partir de leur profils publiés par Graves *et al.* (2001). L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 39. La combinaison des profils obtenus avec les 2 enzymes fait apparaître 23 pulsotypes différents répartis dans 14 groupes génétiques au total dont 9 précédemment définis, à savoir les groupes 1 (T1), 3(T3c), 6(T6k1, T6f1, T6d, T6i, T6h, T6fa), 7(T7), 15(T15, T15', T15a), 17(T17b, T17a1), 18(T18a, T18ab), 19(T19), 21(T21). Cinq nouveaux groupes ont donc été déterminés et sont composés d'un seul pulsotype : 14 (T14), 23 (T23a1), 27 (T27), 28 (T28) et 30 (T30). Parmi ces derniers, 4 d'entre eux sont associés aux produits laitiers et fromage et un à la filière volaille. Pour les 18 autres pulsotypes classés, 12 sont communs avec la base de données de profils génétiques de la filière produits de la pêche et se répartissent de façon homogène dans les 5 autres filières examinées (tableau 39). Une majorité de souches issues de la filière porc (7/10) ont des profils associés au groupe 6.

Parmi les 12 pulsotypes déjà identifiés en produits de la pêche, 9 appartiennent aux groupes de la classe saumon (T6d, T6i, T6h, T6fa, T7, T17b, T18a, T19, T21), 2 sont reliés à une spécificité relative pour le hareng (T15 et T15a) et le dernier est associé à la classe intermédiaire (T1).

Tableau 40 : Résultats des comparaisons inter-filières.

Groupes génétiques	Total souches	Pulso-types	Répartition par filières (nombre de souches)							Nd	
			Alimentaire				Elevage				
			Lait fromage	Porc	Volaille	PDM	Plats cuisinés	Bovin	Caprin		Ovin
Classe saumon	6	T6i/h/fa		27	5			2	1		20
	19		3	1				3	1	2	5
	7	T7	5	8	3			1			14
	18	T18a		5	4		2	6			13
	21	T21	3	2				2			15
	24										0
	25			1				1			2
	8										1
	17	T17/17a	2	3	6		2				5
	26										0
22										0	
Classe hareng	5		5								0
	10										0
	11	T11	5	2			1				0
	9			2				1		1	5
	20										0
	3			1	1						12
15	T15/15a	2	2				6			3	
Classe intermédiaire	1	T1/1b		1	3						4
	2	T2				4					0
	4	T4		1						2	2
	13										0
	16		5	1		1					0
	12		3	1				5	1	1	6
<i>Total en comparaison</i>		483	248 (51 %)	105 (22 %)	31 (6,4 %)	34 (7 %)	9 (2 %)	40 (8,3 %)	10 (2,1 %)	6 (1,2 %)	

Notes : Nd indique le nombre de souches dont l'origine n'est pas déterminée.

Les groupes génétiques apparaissent par ordre décroissant de leur "spécificité" identifiée en AFCM pour les espèces saumon et hareng. Dans la colonne pulsotypes, figurent ceux identifiés comme prédominants pour le groupe concerné. Lorsque rien n'est indiqué, seul le groupe génétique a été identifié avec divers variants.

PDM = produits de la mer.

4-1-3 Comparaison par analyse de profils

Les confrontations de profils génétiques ont été effectuées à partir d'une base de données construite avec une collection de 483 souches isolées de produits transformés ou de prélèvements en élevage. Au total 8 filières étaient représentées avec un nombre important de souches isolées des produits lait/fromage et porc (tableau 40). Néanmoins, 34 souches avaient été isolées des produits de la mer (PDM).

➤ Identification de profils associés à la classe saumon

Sur les 11 groupes génétiques associés au saumon, 4 n'ont pas été identifiés dans la base de données (ou seulement avec un variant) à savoir les groupes 8, 22, 24 et 26 très peu représentés dans la collection produits de la pêche (1 à 2 souches seulement). Les 7 groupes restants concernent un total de 176 souches, soit 36 % de la collection autres filières. Bien que 42 % des souches concernées n'ont pas pu être analysées en fonction de leur origine, les profils associés aux groupes 6, 19, 7, 18 et 21 ont été retrouvés au moins dans 3 à 5 filières différentes avec des pulsotypes identiques dans la majorité des cas excepté pour le groupe 19. Cependant T19 avait été identifié précédemment avec la souche G3 (tableau 39). Le groupe 25 est retrouvé dans au moins 2 filières et le groupe 17, associé de façon plus relative aux prélèvements de saumon, apparaît présent dans 4 filières.

➤ Identification de profils associés à la classe hareng

Les 7 groupes caractérisant l'espèce hareng en AFCM, concernent 50 souches autres filières soit 10 % de la collection, et dans 60 % des cas l'origine des souches est connue. Les groupes 10 et 20 n'ont pas été identifiés dans cette base de données et le groupe 5 n'est représenté que par 5 souches de la filière lait/fromage (profils en *ApalI* proches et identiques en *AscI*). Les groupes 11 et 9 sont retrouvés respectivement dans 3 autres filières ainsi que les groupes 3 et 15, associés de façon plus relative au hareng. Pour ces derniers, un nombre plus important de souches leur est associés (14 dans les 2 cas contre 5-9 pour les autres). En ne considérant que les groupes 5, 10, 11, 9 et 20 significativement associés à l'espèce hareng en AFCM, seulement 4,5 % des souches autres filières y sont répertoriées.

Tableau 41 : Types moléculaires des souches issues d'épisodes épidémiques chez l'homme.

N°souche	Année	Origine	sérotypage	Types macrorestriction		
				<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	Pulso-type ²
DHN 1				19'	19b	T19'
DHN2	1985	USA (Californie), fromage à pâte molle "mexican style"	4b	19'	19b	T19'
DHN3				19'	19b	T19'
CIP103322	1987	Suisse, fromage à pâte molle "Vacherin"	4b	19	19b	T19
DHN6				19'	19b'	T19''
DHN7	1983	USA (Massachussets), lait pasteurisé	4b	19e	19d	T19e
DHN8				19a	19	T19a
DHN9				19a'	19	T19a'
DHN10	1976	France, origine non déterminée	4b	19a'	19	T19a'
DHN11				19a'	19	T19a'
DHN12				16	16a	T16
DHN13	1980	Canada (Nova Scotia), salade de chou cru	4b	16	16a	T16
DHN14				16	16a	T16
DHN16	1992	France, langue de porc en gelée	4b	19	19b	T19
CLIP22573	1992	France, origine humaine	4b	19d	19f	T19d
DM 3368	1993	France, origine rillettes	4b	16	16	T16'
DM 5267	1993	France, environnement usine	4b	16a	16a	T16aa
DM 5333	1993	France, environnement usine	4b	16a	16a	T16aa
G4599 ¹	1993	Italie, salade de riz, gastro-entérite, collection CDC	1/2b	12a	12a	T12a
G6006 ¹	1994	USA, lait chocolaté. Gastro-entérite, collection CDC	1/2b	3'	3c	T3c1

¹ à partir des profils publiés, Graves *et al.* 2001

² en gras figurent les pulsotypes déjà identifiés dans le panel produits de la pêche.

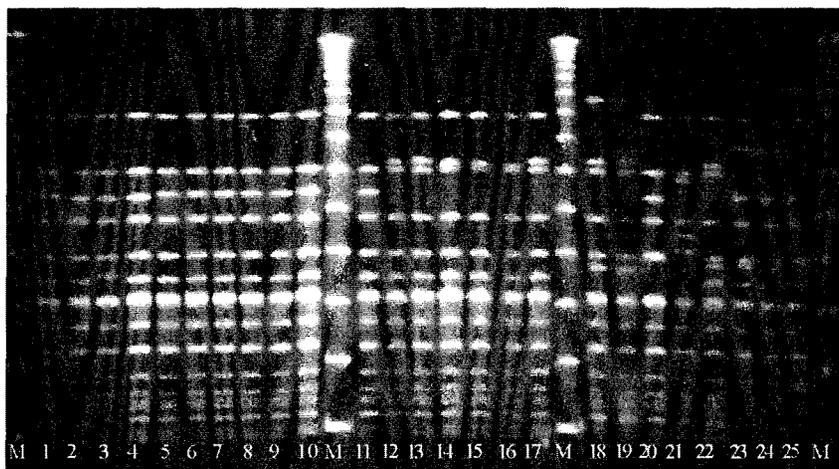


Figure 26 : Profils *ApaI* de souches associées au groupe 19 et 24.

Les souches cliniques de pulsotype T19 apparaissent en pistes 2 et 4 à 9; de type T19' en piste 3, T19a en pistes 12 et 17, T19a' en pistes 14 à 16, T19c, T19d et T19e en pistes 20, 21, 22, T24 en pistes 23 et 24, T24a en piste 25. Les profils des souches produits de la pêche figurent respectivement en pistes 1(T19), 4(T19), 11(T19), 13 (T19a), 18 et 19 (T19b). La piste 11 contient la souche autre filière G3 (T19). Les pistes M contiennent le marqueur lambda ladder.

➤ Identification de profils de la classe intermédiaire

Au total 41 souches sont réparties dans les 6 groupes génétiques de la classe intermédiaire, soit 8,5 % de la collection. Le groupe 2 est seulement retrouvé dans les produits de la mer et le groupe 13 n'a pas été identifié. Tous les autres groupes apparaissent dans 1 à 2 filières à l'exception du groupe 12 très présent dans cette collection (5 filières et 17 souches) alors qu'il ne concerne que 2 souches dans le panel produits de la pêche. Des souches du groupe 16 ont été identifiées également à partir de produits de la mer.

En excluant le groupe 12 (déjà écarté pour l'analyse AFCM), les groupes de classe intermédiaire sont peu représentés avec un score de 5 %, proche de celui de la classe hareng (sans les groupes 3 et 15).

4-2 Comparaison avec des profils de souches cliniques

4-2-1 Profils de souches épidémiques

Les pulsotypes de 20 souches épidémiques ont été déterminés par typage excepté pour les 2 souches G4599 et G6006 analysées d'après leur profils publiés par Graves *et al* (2001) utilisant les mêmes conditions électrophorétiques (voir matériels et méthodes). L'ensemble des résultats figure dans le tableau 41. Au total, 12 pulsotypes ont été mis en évidence et se répartissent dans les 4 groupes génétiques 3, 12, 16 et 19 précédemment définis. Plus de la moitié des souches (12 sur les 20 analysées) sont reliées au groupe 19 et génèrent des profils très proches en *ApaI*. Par exemple, la différence entre les types 19 et 19' se situe au niveau du positionnement d'une seule bande plus ou moins décalée (figure 26, comparaison des pistes 3 et 4 pour la bande n°6 en partant du haut). Parmi les 12 pulsotypes identifiés, 3 avaient déjà été détectés à partir des souches du panel produits de la pêche (tableau 41, T16, T19 et T19a et figure 26).

4-2-2 Profils de souches isolées de cas sporadiques

Au total 7 souches issues de cas sporadiques ont été examinées en majorité à partir de leurs profils publiés en *ApaI* et *AscI* (Graves *et al.*, 2001), les 2 souches DAL1 et DAL2 étant les seules caractérisées au laboratoire. L'ensemble des résultats est repris dans le tableau 42 p 143. A partir de ce panel, 7 pulsotypes différents associés à 6 groupes génétiques ont été mis en évidence. Parmi ces derniers, 5 avaient déjà été prédéfinis (les groupes 3, 7, 9, 15 et 21) et 1 est nouveau (groupe 31). Les trois pulsotypes T7d, T9 et T15c sont retrouvés également dans la collection de souches issues des produits de la pêche.

Tableau 42 : Types moléculaires de souches issues de cas sporadiques chez l'homme

N°souche	Année	Origine	sérotyp	Types macrorestriction		
				<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	Pulso-Type ²
DAL1	?	France, origine non déterminée	1/2a	21b	21b	T21b
DAL2	1999	France, origine non déterminée	4b/e	15c	15a	T15c
H2446 ¹	?	USA, collection CDC, origine ?	1/2a	9	9	T9
L940	1986?	Grande Bretagne, collection CDC, origine ?	1/2c	7d	7	T7d
G0039 ¹	?	USA, collection CDC, origine ?	3b	3b	3	T3b1
F7954 ¹	?	USA, collection CDC, origine ?	4b	15c1	15a	T15c1a
H1255 ¹	?	USA, collection CDC, origine ?	1/2a	31	31	T31

¹ à partir des profils publiés, Graves *et al.* 2001

² en gras figurent les pulsotypes déjà identifiés dans le panel produits de la pêche.

Tableau 43 : Types moléculaires des souches issues de listériose animale

N°souche	Année	Origine	sérotyp	Types macrorestriction		
				<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	Pulso-type ¹
DHN17	1990			24a	19e	T24a
DHN18	1990	Espagne, épizootie, troupeau de moutons	4b	24	19f	T24f1
DHN19	1990			15d	15b	T15d
DN107	?	Listeriose caprine	nd	15c	15c	T15cc
DN12	?	Listeriose caprine	nd	19c	19b	T19c
DN34	?	Listeriose caprine	nd	19	19b	T19
DN18	?	Listeriose caprine	nd	23	23	T23
DNCharron	?	Listeriose caprine	nd	4	4	T4

nd = non déterminé

¹ en gras figurent les pulsotypes déjà identifiés dans le panel produits de la pêche.

Tableau 45 : Résultats PFGE avec 3 enzymes, souches produits de la pêche, souches épidémiques.

Souches	Année	Origine	Code site	Types en macrorestriction			Type clonal*
				<i>ApaI</i>	<i>AscI</i>	<i>SmaI</i>	
CIP103322	1987	Epidémie Suisse 83-87	-	19	19b	19	A
DA1591d	1998	Environnement usine saumon fumé	39	19	19b	19	A
DSS1039BF	2001	Hareng fumé	11	19	19b	19	A
C4151OS	2000	Filets de flétan congelé	35	19	19c	19a	B
C2041P2	2000	Chutes de saumon fumé	16	19a	19	19b	C
DHN8	1983	Epidémie lait pasteurisé USA	-	19a	19	19c	C1
DHN9	1976	France origine indéterminée	-	19a'	19	19b	C'
C2238P1	2000	Chutes de saumon fumé	16	19b	19a	19b	D
D1366.2	1998	Matière première saumon	13	19b	19a	19b	D
DHN12	1980	Epidémie Canada	-	16	16a	16c	E
C1364O1	2000	Filets de perche du Nil	30	16	16a	16	F
D1571PS1	2001	Filets de perche du Nil	31	16	16a	16b	G
DPF263H5	2001	Matière première Hareng	11	16	16a	16	F

*combinaison des 3 enzymes

Les souches issues de cas cliniques apparaissent sur fond rose.

4-2-3 Profils de souches à l'origine de listériose animale

Au total 8 souches ont été caractérisées et les empreintes combinées obtenues avec *ApaI* et *AscI* ont permis de mettre en évidence 8 pulsotypes répartis dans les 5 groupes génétiques prédéfinis 4, 15, 19, 23 et 24. Seulement 2 pulsotypes sont communs avec la base de données de profils génétiques issus des produits de la pêche, à savoir T19 et T4 (tableau 43).

4-2-4 Comparaison des profils avec 3 enzymes

Au total 6 souches du panel produits de la pêche présentent des pulsotypes identiques à des souches épidémiques à savoir T19, T19a et T16 (combinaison *ApaI* + *AscI*). Des comparaisons avec les profils générés par *SmaI* ont alors été entrepris. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 45. Deux souches isolées en 1998 (DA1591d) et en 2001 (DSS1039BF) de sites distincts sont identiques avec les 3 enzymes à la souche d'origine humaine isolée lors de l'épidémie Suisse en 1987 (noté pulsotype A). La souche C2041P2, isolée de chutes de saumon en 2000 est de même type clonal qu'une souche isolée en 1976 en France (noté C et C'). La différence entre ces 2 dernières souches se situe sur les profils *ApaI* au niveau de l'écartement légèrement différent entre 2 fragments (figure 26 p 141, pistes 13 et 14, deuxième et troisième bandes dans les hauts poids moléculaires).

Concernant les trois souches isolées en 2000 et 2001 de poisson matières premières (perche ou hareng) de pulsotype T16, ces dernières se distinguent en *SmaI* de la souche isolée lors de l'épidémie canadienne en 1980. Néanmoins, le type clonal F associé au poisson ne présente qu'un seul fragment de différence avec le type clonal noté E (souche canadienne).

Au total, 3 souches du panel des produits de la pêche récoltées entre 1998 et 2001 ont des profils identiques à 2 souches épidémiques isolées sur des lieux géographiques et à des périodes très différentes à savoir la France en 1976 et la Suisse en 1987. Deux souches issues de matière première poisson sont très proches du type clonal à l'origine de l'épidémie au Canada en 1980.



Figure 27 : Exemple de résultats obtenus après digestion du génome des souches 4b/e par *Mbo*I et *Sau*3AI. Les pistes 1-12 correspondent respectivement aux souches : CIP103322, DN34, DA1591, G3, C2441P2, C2238P1, DA1366.2, DN12, CLIP22573, DM5333, DM5267, DM3368. Toutes les souches appartiennent au groupe génétique 19 excepté les 3 dernières classées dans le groupe 16. La piste M contient le marqueur de poids moléculaire EuroladderL. En A, résultats des digestions par *Mbo*I et en B par *Sau*3AI.

Tableau 46 : Digestion génomique des souches de sérotype 4b/e par *Mbo*I et *Sau*3AI.

Groupe génétique	Pulso-type	n°souches	Résultats Digestion		Groupe génétique	Pulso-type	n°souches	Résultats Digestion	
			<i>Mbo</i> I	<i>Sau</i> 3AI				<i>Mbo</i> I	<i>Sau</i> 3AI
15	T15a	CS499S1	+	+	19	T19a	C2041P2	+	-
	T15	CS455S1	+	+		T19c1	C4151OS	+	-
	T15	CH248P1	+	+		T19b	DA1366.2	+	-
	T15	C847P1	+	+		T19	DA1591d	+	-
	T15c	DA1382.1	+	+		T19	DSS1039BF	+	-
	T15	DA1292	+	+		T19b	C2238P1	+	-
	T15a	DA908.2	+	+		T19	CIP103322	+	-
	T15cc	DN107	+	+		T19'	DHN2	+	-
	T15d	DHN19	+	+		T19''	DHN6	+	-
	T15c	DAL2	+	+		T19e	DHN7	+	-
	T15	F3a	+	+		T19a	DHN8	+	-
16	T16	D1571PS1	+	+	T19a'	DHN9	+	-	
	T16b	C4650PS	+	+	T19	DHN16	+	-	
	T16	C3779P2	+	+	T19	DN34	+	-	
	T16a	C2449P	+	+	T19c	DN12	+	-	
	T16	C1364O1	+	+	T19d	CLIP22573	+	-	
	T16b	C442P1	+	+	T19	G3	+	-	
	T16a	DSS758AF	+	+	20	T20	CS506BP	+	+
	T16b	DA550 n1	+	+		T20	DS662S1	+	+
	T16c	DA1459n2	+	+	24	T24	DA1612 f	+	-
	T16	DPF263H5	+	+		T24f1	DHN18	+	-
	T16	DHN12	+	+		T24a	DHN17	+	-
	T16a	DM5333	+	+					
	T16aa	DM5267	+	+					
	T16aa	DM3368	+	+					

Notes : en bleu, les souches issues de la collection produits de la pêche,
en rouge, les souches cliniques
en vert, les souches autres filières.

4-2-5 Caractérisation des groupes génétiques 4b/e par *MboI/Sau3AI*

En final, les 5 groupes génétiques 15, 16, 19, 20 et 24 subdivisent le sérotype 4b/e en prenant en compte toutes les souches typées au laboratoire issues des panels "produits de la pêche", "cas cliniques" et "prélèvements autres filières" (soit 47 souches au total). Après digestion de leur génome avec les 2 enzymes *MboI* et *Sau3AI* en parallèle, seules les souches associées aux groupes 19 et 24 apparaissent comme réfractaires à la coupure de leur ADN par *Sau3AI* suggérant une méthylation des cytosines sur les sites GATC (figure 27 et tableau 46). Les différentes origines des souches (pêche, clinique ou autres filières) n'ont pas eu d'incidence sur ces résultats, les groupes ayant donné une réponse homogène.

4-2-6 Analyse de l'ensemble des pulsotypes

Le dendrogramme présenté dans la figure 28 p 147, a été construit avec les profils combinés obtenus par *ApaI* et *AscI* des 3 collections de souches typées au laboratoire (produits de la pêche, cas cliniques et prélèvements autres filières). Les différents groupes génétiques identifiés se répartissent de façon homogène dans le dendrogramme indépendamment de leur spécificité précédemment définie par AFCM (classe saumon, hareng et intermédiaire). Trois clusters distincts A, B, C apparaissent dans la hiérarchisation des pulsotypes :

- le cluster A regroupe la majeure partie des souches du panel "produits de la pêche" et se caractérise par les sérotypes 1/2a et 1/2c.
- le cluster B contient les groupes génétiques 1 et 26 ainsi que le pulsotype T31 à l'origine d'un cas sporadique (collection du CDC). Toutes ces souches sont de sérotype 1/2a et se distinguent nettement du reste de la collection "produits de la pêche".
- le cluster C se subdivise en 2 sous-groupes composés d'une part de toutes les souches de sérotypes 4b/e (groupes génétiques 15, 16, 19, 20 et 24) et d'autre part toutes les souches de sérotype 1/2b (groupes génétiques 3 et 12).

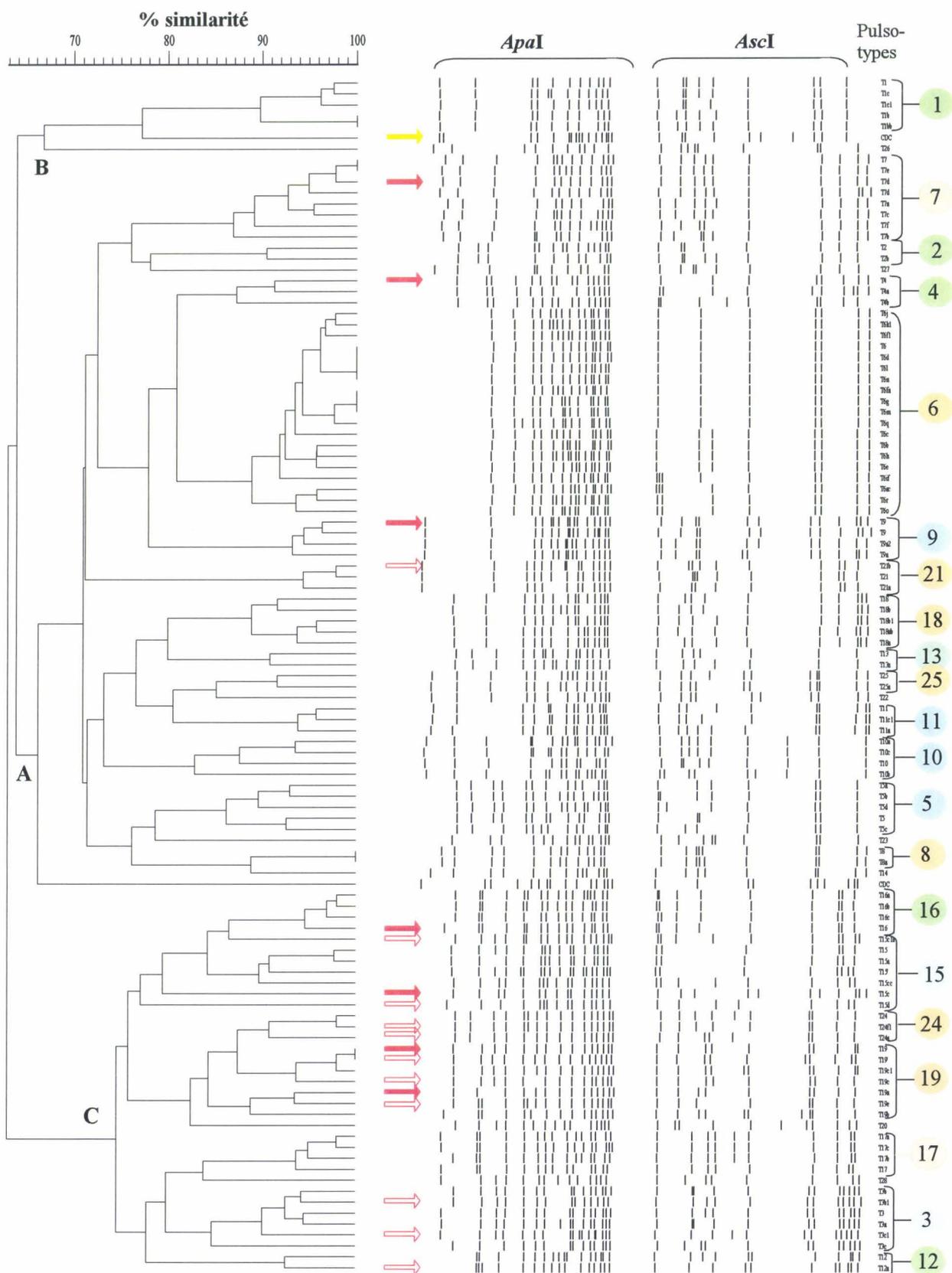


Figure 28 : Dendrogramme des profils combinés *ApaI* et *AscI* des 3 collections de souches typées (pêche, clinique, autres filières). Figure construite avec une tolérance 1,1%.

Les flèches rouges pleines indiquent les pulsotypes communs pêche/clinique, les flèches à contours rouges indiquent les souches cliniques se plaçant dans un des groupes génétiques définis, la flèche jaune indique un profil clinique sans similarité avec le reste de la collection. Les groupes génétiques apparaissent à droite de la figure : bleu = classe hareng, orangé = classe saumon, vert = classe intermédiaire.

4-3 Synthèse des résultats

La comparaison des pulsotypes associés aux souches "produits de la pêche" avec ceux issus d'autres filières fait apparaître que les groupes génétiques de la classe saumon sont communément retrouvés dans divers secteurs de l'agro-alimentaire et suggère que ce sont des types de *L. monocytogenes* très répandus.

Les groupes de la classe hareng ou intermédiaire affichent une certaine spécificité en étant plus rarement identifiés dans les autres filières. Le groupe 10, significativement associé au hareng et présentant une hypovirulence dans les tests *in vitro* et *in vivo* sur souris n'a pas été identifié parmi les 483 souches de la collection "autres filières". De même le groupe 2 apparaît spécifique des produits de la mer.

Les profils de souches cliniques examinés ont été identifiés dans la collection produits de la pêche. Au total, 3 souches sont parfaitement identiques avec les 3 enzymes *ApaI*, *AscI* et *SmaI* aux profils générés par deux souches à l'origine d'épidémies sur les périodes 1976-1987. Par ailleurs, 2 souches isolées de poisson matière première sont très proches du type clonal à l'origine de l'épidémie canadienne en 1980.

Par ailleurs toutes les souches des groupes génétiques 19 et 24 se distinguent des autres souches de sérotypes 4b/e en étant réfractaires à la digestion de leur génome par l'endonucléase *Sau3AI*, correspondant à une des particularités du type clonal épidémique appelé "yellow clone".

Enfin, la hiérarchisation des pulsotypes suivant leur degré de similarité fait apparaître 3 clusters significativement corrélés aux sérotypes des souches. Cette dernière analyse montre également que les groupes génétiques associés aux classes hareng, saumon et intermédiaire se répartissent de façon homogène au sein du dendrogramme.

RÉSULTATS

VII

INFLUENCE DE LA MATRICE SAUMON FUMÉ SUR LE PHÉNOTYPE

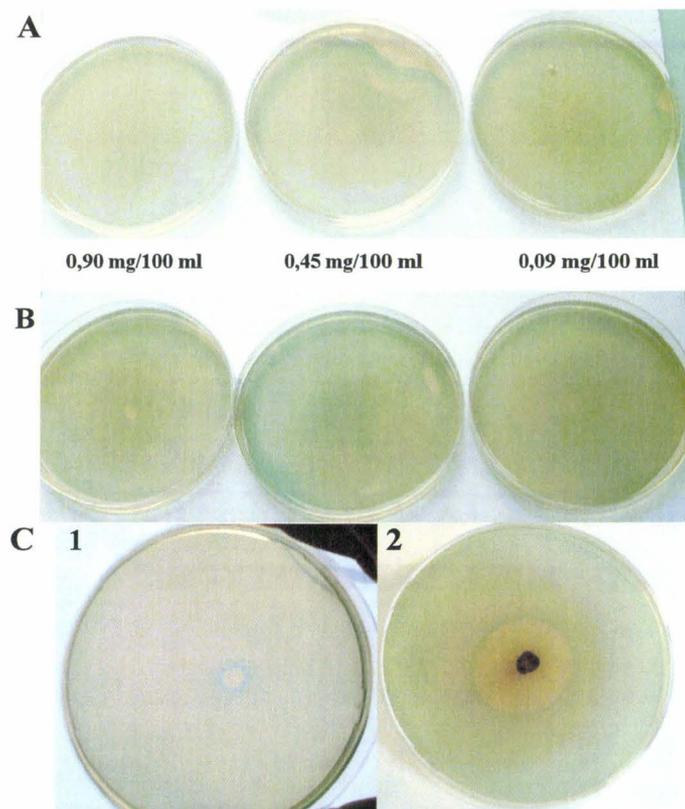


Figure 29 : Résultats du SOS spot test sur les composés de la fumée

A et B montrent respectivement les résultats pour 10 μ l de dépôt de fumée liquide et d'extrait de fumée classique (produite à partir de bois de hêtre) pour des concentrations en phénols décroissantes : 0,90 mg/100 ml, 0,45 mg/100 ml et 0,09 mg/100ml.

C1, le résultat pour 10 μ l d'extrait de fumée à 0,90 mg de phénols pour 100 ml comparé à C2, 10 μ l de fumée liquide concentrée à 22-26 mg/ml de phénols.

1- Induction du système SOS par les composés de la fumée

L'objectif de cet essai était de mettre en évidence la présence de composés dans la fumée pouvant avoir une action génotoxique sur le génome bactérien. Le SOS chromotest utilisé dans sa version "spot test" a été mis en oeuvre pour la détection de la dérégulation du système SOS induit après lésions de l'ADN sur la souche *E. coli* PQ37 (Quillardet *et al.* 1985).

1-1 Comparaison entre la fumée traditionnelle et la fumée liquide commercialisée

Les essais du SOS spot test pour la fumée traditionnelle ont été mis en oeuvre à partir d'une solution d'eau physiologique chargée en composés de la fumée produite à partir de bois de hêtre. En parallèle, une série réalisée avec une fumée liquide commercialisée a servi de témoin. L'ensemble des résultats est présenté dans la figure 29.

➤ visualisation d'un anneau bleu autour du dépôt après 24-48h d'incubation

Pour une concentration en phénols ajustée à 0,90 mg/100 ml (ou 100 g dans la matrice poisson), un anneau bleuté au centre de la boîte est observé seulement à partir de l'extrait de fumée traditionnelle (Figure M1, B et C1). En revanche, aucune réaction n'apparaît après dilution de cet extrait au 1/2 et au 1/10 (soit 0,45 mg/100 ml et 0,09 mg/100ml en taux de phénols).

Avec la fumée liquide, une légère réaction a été visualisée seulement à partir de la solution concentrée non diluée correspondant à un taux de phénols 2000 fois plus élevé que les conditions précédemment choisies (figure 29 C2).

➤ zone d'inhibition autour du dépôt

Avec l'extrait de fumée traditionnelle, une zone d'inhibition franche mais de faible diamètre est observée en comparaison à celle visualisée autour du dépôt de fumée liquide. (figure 29, C1 et C2). Cette dernière met en évidence la toxicité du produit dont le pH est très acide (pH autour de 3).

1-2 Synthèse des résultats

L'extrait de fumée traditionnelle contient des composés dont la présence induit une réponse SOS dans le génome bactérien pour des concentrations habituellement observées dans les poissons fumés (taux de phénols autour de 0,90 mg /100g ou 100 ml dans les expérimentations).

Tableau 47 : Résultats des contaminations artificielles sur matrice saumon conservées à +8°C.

Jours de stockage	Dénombrement sur matrice crue			Dénombrement sur matrice fumée		
	Moyenne en log ufc/g ± écart type (nombre d'expérimentations)			Moyenne en log ufc/g ± écart type (nombre d'expérimentations)		
	T6g	T7e	T19	T6g	T7e	T19
0*	0,63 ± 0,03 (1)	0,79 ± 0,03 (1)	0,92 ± 0,03 (3)	0,78 ± 0,13 (3)	0,86 ± 0,06 (3)	0,92 ± 0,03 (3)
3	1,15 ± 0,21 (1)	1,85 ± 0,00 (1)	1,39 ± 0,36 (1)	1,24 ± 0,00 (1)	1,18 ± 0,24 (1)	1 ± 0,00 (1)
4	–	–	2,13 ± 0,03 (2)	1 ± 0,00 (2)	1,24 ± 0,08 (2)	1,18 ± 0,00 (2)
7	3,84 ± 0,08 (1)	4,22 ± 0,02 (1)	4,12 ± 0,12 (3)	1,85 ± 0,72 (3)	2,51 ± 0,41 (3)	2,53 ± 0,29 (3)
10	5,63 ± 0,10 (1)	6,16 ± 0,05 (1)	6,01 ± 0,05 (1)	3,35 ± 0,07 (1)	4,22 ± 0,04 (1)	3,06 ± 0,08 (1)
12	–	–	–	3,48 ± 0,01 (2)	4,36 ± 0,39 (2)	–
13	–	–	7,97 ± 0,21 (2)	–	–	4,68 ± 0,36 (2)
14	7,59 ± 0,05 (1)	8,26 ± 0,11 (1)	7,89 ± 0,09 (1)	3,95 ± 0,03 (1)	5,19 ± 0,01 (1)	4,74 ± 0,10 (1)
15	–	–	–	4,61 ± 0,84 (2)	5,20 ± 0,66 (2)	5,21 ± 0,20 (2)
17	8,31 ± 0,17 (1)	8,55 ± 0,04 (1)	8,32 ± 0,09 (1)	4,87 ± 0,08 (1)	4,57 ± 0,11 (1)	4,88 ± 0,08 (1)
19	–	–	8,66 ± 0,14 (2)	5,77 ± 0,37 (2)	6,81 ± 0,09 (2)	–
20	–	–	–	–	–	6,32 ± 0,20 (2)
21	8,68 ± 0,04 (1)	7,67 ± 0,01 (1)	8,66 ± 0,04 (3)	6,28 ± 0,30 (3)	6,75 ± 0,57 (3)	6,63 ± 0,17 (3)

*taille de l'inoculum en log (ufc/g) calculé sur la moyenne des dénombrements sur boîtes réalisés en double.
En gras figurent les moyennes sur 2ou 3 expérimentations indépendantes.

2- Influence de la matrice fumée sur la croissance

Dans cette partie, l'objectif était de vérifier l'incidence de la matrice poisson fumé sur la croissance de *L. monocytogenes*. Pour cela, des comparaisons ont été mises en œuvre à partir de contaminations artificielles réalisées en parallèle sur des tranches ionisées de saumon crues et fumées provenant d'un même poisson. Trois souches ont été sélectionnées pour ces expérimentations et appartiennent à trois groupes génétiques de la classe saumon (G6, G7 et G19) et se caractérisent également par 3 sérotypes différents à savoir 1/2a (souche T6g), 1/2c (souche T7e) et 4b/e (souche T19). La souche de pulsotype T19, isolée de hareng fumé présente un profil identique en macrorestriction à la souche épidémique Suisse CIP103322 isolée d'un cas humain en 1987 (avec les 3 enzymes *ApaI*, *AscI* et *SmaI*).

Des portions de 25g de matrice ont été contaminées de façon à obtenir à J0 environ 10 bactéries /g, puis les produits ont été stockés sous vide à +8°C jusqu'à leur analyse.

2-1 Résultats des dénombrements et reproductibilité

Au total, les expérimentations ont été réalisées trois fois par souche et par type de matrice excepté pour les pulsotypes T6g et T7e avec 1 seul lot contaminé en saumon cru. Les produits ont été analysés en moyenne tous les 3 jours jusqu'à 21 jours de stockage à +8°C. Les dénombrements ont été réalisés sur les 2 milieux en parallèle TSAYE et Palcam ensemencés en double par dilutions. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 47.

♦ taille des inoculums

Avec le protocole utilisé (voir matériels et méthodes) les niveaux de contamination à J0 étaient dans tous les cas <10 ufc/g (tableau 47). Deux préparations d'inoculums ont été réalisées de façon à obtenir :

- dans la première série, 1 matrice contaminée par point d'analyse
- dans la deuxième série, 2 matrices contaminées par point d'analyse.

A partir des dénombrements sur boîtes, la taille des 3 inoculums (3 souches) est apparue plus hétérogène lors de la première série de contaminations artificielles (test 1) avec en final de 4 à 8 ufc/g alors que dans la deuxième série (tests 2 et 3) le niveau de contamination théorique était compris entre 7 et 9 ufc/g.

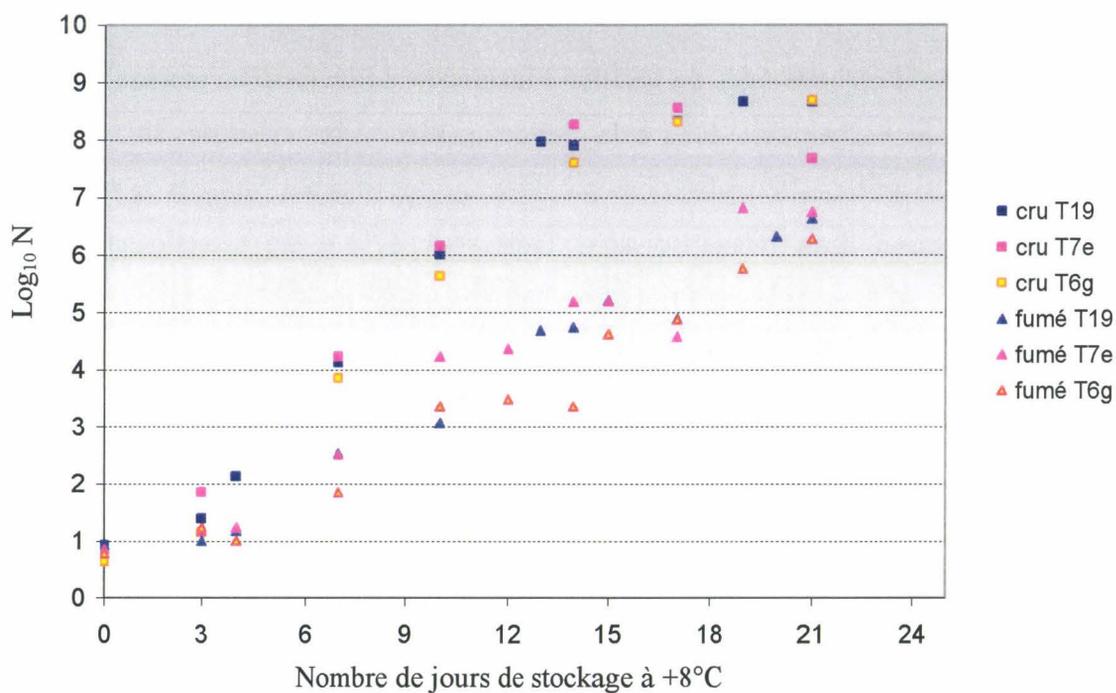


Figure 30 : Résultats sur la croissance en matrices saumon crues et fumées ionisées des trois pulsotypes T6g, T7e et T19.

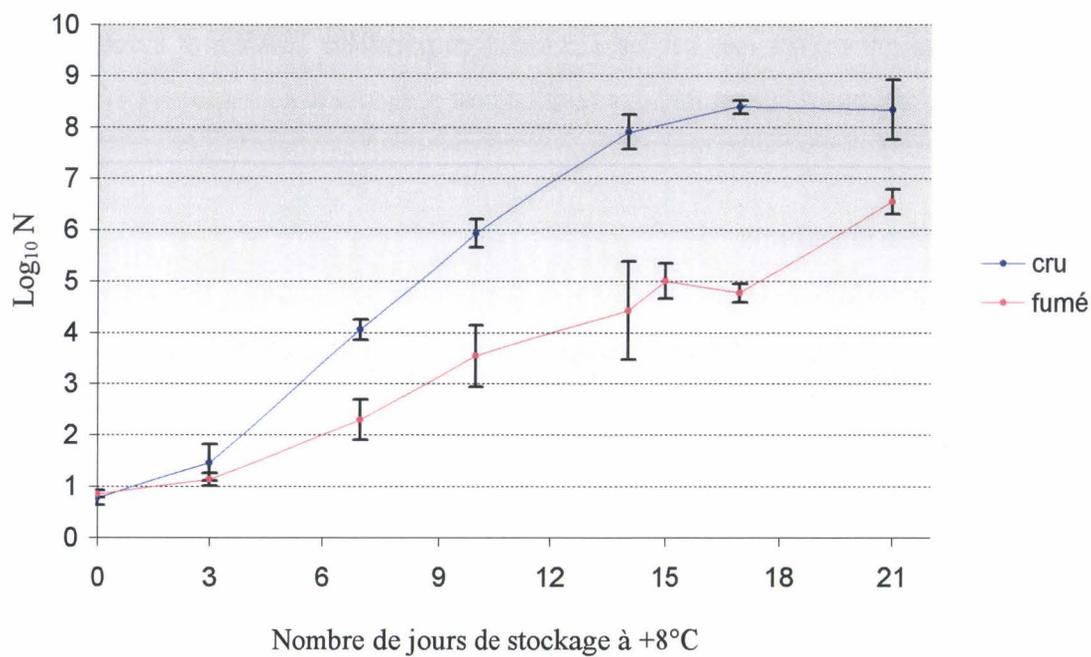


Figure 31: Moyenne des résultats à partir des trois souches pour les essais de croissance en matrices ionisées de saumon cru et fumé.

♦ dénombrements

Les écarts types relevés pour chaque point d'analyse oscillent globalement entre $\pm 0,00$ et $\pm 0,20$ avec une exception à $\pm 0,49$ (test 3, souche T19, matrice crue à J+19 jours). D'une façon générale, les dénombrements issus de TSAYE et Palcam présentaient une bonne corrélation et confirmaient ainsi l'absence de contaminations accidentelles lors de l'ensemencement des matrices.

♦ moyenne des résultats sur plusieurs tests avec une même souche

Les moyennes relevées entre deux ou trois séries de tests s'accompagnent d'écarts types compris entre $\pm 0,00$ et $\pm 0,30$ dans la plupart des cas. Une dispersion supérieure à un $\frac{1}{2}$ log en matrice fumée est observé dans les 3 cas de figure suivants : T6g à J +7 et 15 jours, T7e à J+15 jours (tableau 47). Les résultats obtenus à partir de la souche T19 apparaissent comme les plus homogènes.

2-2 Comparaison des valeurs relevées pour les trois souches

A partir des matrices crues, les valeurs relevées pour chaque point d'analyse avec les trois souches sont très proches. Les résultats moyens affichent des écarts types autour de $\pm 0,30$ excepté pour le dernier point de mesure à J+21 avec une moyenne en log de $8,34 \pm 0,58$ (figures 30 et 31).

Les résultats avec les trois souches en saumon fumé apparaissent plus dispersés. Les moyennes en log sont associées à des scores $\pm 0,30$ mais deux points de divergence apparaissent à J+10 et J+14 avec des écarts types respectivement de $\pm 0,6$ et $\pm 0,96$ (figures 30 et 31).

Toutefois, l'ensemble des résultats ne montre pas de différences significatives entre les trois souches quelque soit le type de matrice.

2-3 Analyse des courbes de croissance

En comparant les courbes moyennes construites à partir de l'ensemble des résultats, une différence significative apparaît entre la croissance en matrice crue et fumée (figure 31). Dans du saumon non transformé (et pour une même taille d'inoculum), la phase de ralentissement précédant la phase stationnaire est amorcée dès J+14 jours de stockage à $+8^{\circ}\text{C}$. Le plateau

s'établit ensuite pour une population de $2 \cdot 10^8$ ufc/g. En matrice fumée, à J+21 jours les bactéries sont encore en phase exponentielle de croissance avec $3 \cdot 10^6$ ufc/g. Pour les mêmes points d'analyse compris entre l'intervalle de temps J+7 et J+17, une différence de 2,5 log en moyenne est observée entre les deux matrices. Le temps de génération des bactéries calculé sur cette période en matrice fumée est environ le double de celui enregistré en matrice crue à savoir respectivement de l'ordre de 22 h et 11 h.

2-4 Synthèse des résultats

Les expérimentations montrent qu'avec de très faibles niveaux de contamination, de l'ordre de 10 *L. monocytogenes* par gramme, une différence significative est visualisée entre la croissance sur saumon cru et sur saumon salé-séché-fumé. A +8°C, les bactéries se développent globalement deux fois plus vite en matrice crue qu'en matrice fumée.

Il n'y a pas de différence significative entre les courbes de croissance générées avec les trois souches testées, de pulsotypes et de sérotypes distincts.

Tableau 48 : Niveaux de virulence de la souche DSS1039 BFA1 incubée en saumon fumé à +8°C.

Matrice nature + n° lot	Point d'analyse	Niveau de contamination du produit en ufc/g	Dilution de travail ¹	Nombre de plages de lyse observées ²	Niveau de virulence ³ ± écart type
fumée n°1	J+20	1,5 10 ⁶	1,0 10 ⁻¹	12-13-10	2,89 ± 0,06
fumée n°1	J+20	1,5 10 ⁶	0,5 10 ⁻¹	5-20-21	3,23 ± 0,36
fumée n°1	J+20	1,5 10 ⁶	1,0 10 ⁻²	2-10-7	3,54 ± 0,37
fumée n°2	J+20	3,3 10 ⁶	1,0 10 ⁻¹	12-25-12	2,67 ± 0,18
fumée n°2	J+20	3,3 10 ⁶	0,5 10 ⁻¹	39-44-46	3,41 ± 0,04
fumée n°2	J+20	3,3 10 ⁶	1,0 10 ⁻²	17-24-17	3,76 ± 0,09
Témoin BHI ⁴					6,58 ± 0,00

¹ indique la dilution utilisée de la matrice pour l'étape d'infection du tapis cellulaire. Seule la dilution primaire notée 10⁻¹ a été réalisée en eau peptonée tamponnée, les autres ont été réalisées en DMEM base.

² Pour chaque dilution, 3 puits ont été infectés.

³ Log₁₀ du nombre de plages de lyse pour 10⁷ bactéries /puits.

⁴ correspond aux conditions standards du test en bouillon cœur-cerveille à 37°C.

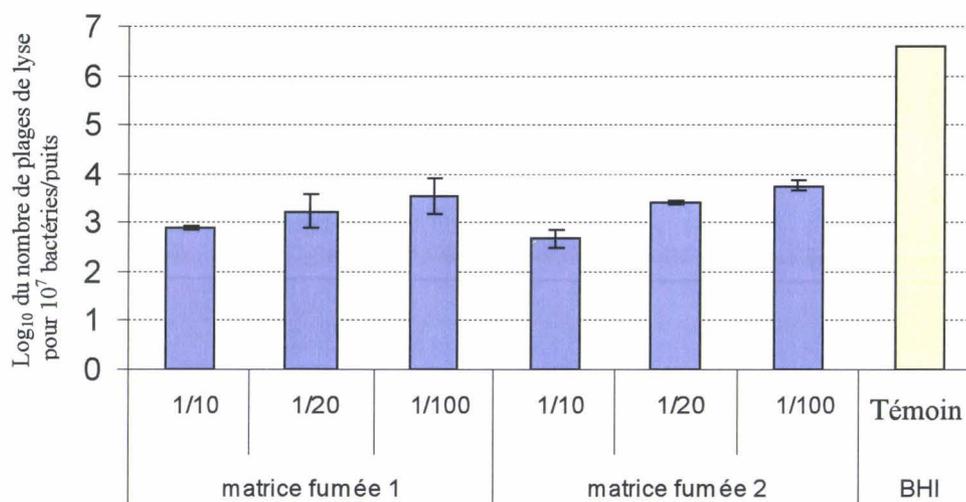


Figure 33 : Tendence observée à partir des différentes dilutions de la matrice saumon fumée sur le niveau de virulence détecté *in vitro*.

Le témoin BHI est réalisé à 37°C en bouillon coeur-cerveille (conditions standards du test).

3- Influence de la matrice saumon fumé sur l'expression de la virulence

L'objectif de ce travail était d'apporter des éléments de réponse sur l'hypothèse d'une incidence de la matrice poisson fumé sur l'expression de la virulence des *L. monocytogenes*.

L'exposé des résultats reprend les points qui ont permis de faire évoluer la démarche vers un protocole d'essai optimisé. L'analyse statistique n'est pas applicable au regard du nombre d'expérimentations, c'est pourquoi les données ont été analysées seulement en terme de tendance.

3-1 Dilution de la matrice saumon fumé et niveaux de virulence détectés *in vitro*.

En parallèle des courbes de croissance réalisées en saumon (paragraphe 2, p154), des tests de plages de lyse ont été mis en œuvre avec la souche DSS1039BFA1 à J + 20 jours de conservation à + 8°C en matrice fumée. Deux lots ont été examinés avec des niveaux de contamination différents. Tous les essais ont été réalisés en microplaque P96 avec des séries de dilutions au 1/10 et au 1/20 du produit afin d'obtenir un nombre approprié de bactéries par puits. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 48.

♦ Résultats en fonction de la dilution de la matrice

Les valeurs obtenues à partir des 2 lots de matrices fumées analysées et pour un même facteur de dilution sont semblables. Les séries de dilutions montrent une corrélation inverse entre le nombre de plages de lyse observé et le nombre de bactéries déposées par puits. Ainsi, une différence de 0,7 à 1 log apparaît entre les dilutions au 1/10 (valeurs autour de 2,80) et au 1/100 (valeurs autour de 3,60) (tableau 48 et figure 33).

♦ Comparaison entre les séries saumon fumé et la valeur standard en BHI.

Les valeurs relevées à partir des séries en matrice saumon fumé sont inférieures de 2,8 à 3,8 log à la valeur standard de virulence de la souche DSS1039BFA1 déterminée à partir de cette même souche cultivée en parallèle à 37°C en bouillon cœur-cervelle (noté témoin BHI dans la figure 33).

En résumé, dans cette série d'essais, une tendance semble se dégager et suggère que la matrice saumon fumé génère une modification du niveau de virulence dans le test *in vitro*. Le phénomène semble être directement relié au facteur de dilution de cette dernière. En d'autres termes, plus la matrice est concentrée, plus la capacité des souches à former des plages de lyse diminue.

Tableau 49 Pré-incubation du tapis cellulaire en matrice saumon. Niveaux de virulence détectés pour la souche DSS1039BFA1 après lavage ou non des cellules HT-29.

Nature de la suspension	Nb de lavages du tapis cellulaire avant le test	Niveau de virulence* ± écart type
Matrice fumée 1/10	4 lavages	6,41 ± 0,20
Matrice fumée 1/10	2 lavages	6,53 ± 0,03
Matrice fumée 1/10	Sans lavage	5,76 ± 0,13
Matrice crue 1/10	4 lavages	6,36 ± 0,06
Matrice crue 1/10	2 lavages	6,55 ± 0,09
Matrice crue 1/10	Sans lavage	5,71 ± 0,12

* Log_{10} du nombre de plages de lyse pour 10^7 bactéries /puits. Valeurs moyennes des essais réalisés en double.

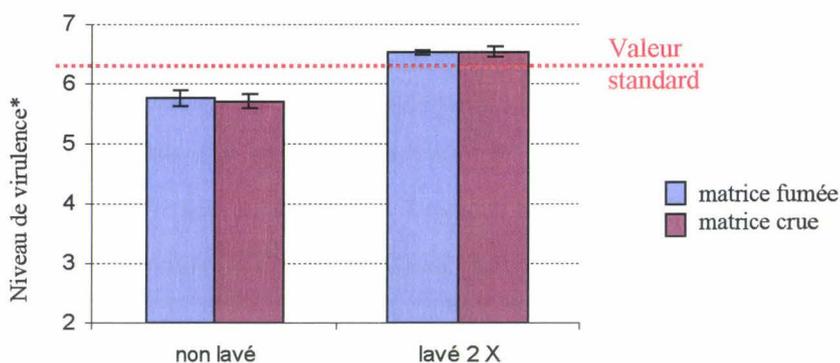


Figure 34 Effet du lavage du tapis cellulaire pré-incubé en matrice saumon sur le niveau de virulence *in vitro* de la souche DSS1039BFA1.

La valeur standard est donnée à titre d'élément de comparaison et correspond au niveau de virulence moyen déterminé en BHI à 37°C à partir de 4 expérimentations indépendantes ($6,33 \pm 0,19$ tableau 36, p131)

* Log_{10} du nombre de plages de lyse pour 10^7 bactéries /puits

3-2 Appréciation de l'effet de la matrice poisson fumé sur les bactéries et sur les cellules HT-29

L'objectif de cette nouvelle série d'essais était de vérifier si l'effet matrice poisson fumé observé précédemment dans le test *in vitro* résultait d'une action sur le tapis cellulaire ou sur les bactéries. Pour vérifier ce point, 2 expérimentations ont été mises en œuvre en parallèle. D'une part, le tapis cellulaire a été incubé 1 heure à 37 °C avec une suspension de saumon cru et fumé diluée au 1/10 puis des tests dans les conditions standards ont été réalisés avec la souche DSS1039BFA1 après lavage ou non des cellules HT-29. En comparaison, des tests de plages de lyse ont été réalisés à partir d'une culture de la même souche incubée 1 h dans les suspensions de saumon puis déposée sur un tapis cellulaire préparé dans les conditions standards.

3-2-1 Effet de la matrice saumon sur le tapis cellulaire

L'ensemble des résultats pour cette série d'essais est repris dans le tableau 49 et la figure 34. Quelques soient les conditions appliquées (non lavé, 2 ou 4 lavages) il n'y a pas de différence entre les résultats provenant d'un tapis cellulaires pré-incubés avec une suspension de saumon cru ou de saumon fumé.

Le niveau de virulence de la souche DSS1039BFA1 déterminé à partir d'un tapis cellulaire lavé 2 ou 4 fois ne varie pas non plus (valeurs autour de 6,40/6,50 pour le cru et le fumé).

En revanche, les valeurs relevées à partir d'un tapis cellulaire non lavé sont inférieures d'environ 0,7 log à celles des séries "tapis lavés" et se situent autour de 5,70 (pour le cru et le fumé).

Une pré-incubation du tapis cellulaire avec une suspension de saumon cru ou fumé modifie le niveau de virulence détecté *in vitro*. En revanche, cet effet est réversible puisqu'il disparaît après seulement 2 lavages des cellules HT-29 avant la mise en œuvre du test. De plus, la valeur affichée après lavage du tapis cellulaire est très proche de celle obtenue dans les conditions standards du test (figure 34). Ici, la valeur utilisée à titre de comparaison et désignée sous le nom de "valeur standard" correspond à la moyenne de 4 expérimentations indépendantes réalisées avec la souche DSS1039BFA1 (soit $6,33 \pm 0,19$ voir tableau 36, p131)

Tableau 50 : Pré-incubation des bactéries en matrice saumon

Pré-incubation des bactéries		Test plages de lyse	
Nature de la suspension	Dilution de la suspension**		Niveau de virulence ± écart type
	Nature du diluant	Facteur de dilution de la matrice	
Saumon fumé*	Saumon fumé*	10 ⁻¹	3,83 ± 0,13
Saumon fumé*	DMEM base	10 ⁻⁵	6,80 ± 0,03
Saumon cru*	Saumon cru*	10 ⁻¹	4,37 ± 0,04
Saumon cru*	DMEM base	10 ⁻⁵	6,94 ± 0,02

* saumon en suspension en EPT (dilution au 1/10 puis broyage au stomacher)

**le niveau de contamination de la suspension au départ étant de 4,8 10⁸ ufc/ml, des séries de dilutions au 1/10 ont été mises en œuvre de façon à obtenir un nombre approprié de bactéries par puits.

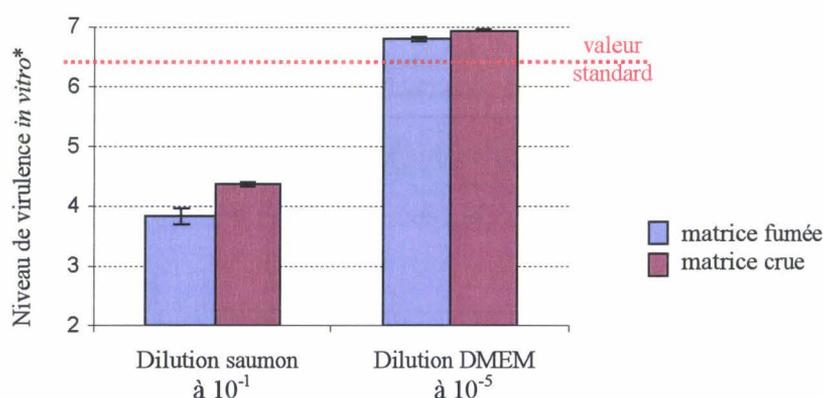


Figure 35 : Niveaux de virulence *in vitro* de la souche DSS1039BFA1 après dilution des suspensions de saumon dans lesquelles les bactéries avait été pré-incubées pendant 1 heure. La valeur standard est donnée à titre d'élément de comparaison et correspond au niveau de virulence moyen déterminé en BHI à 37°C à partir de 4 expérimentations indépendantes (6,33 ± 0,19 voir tableau 36 p131).

* Log₁₀ du nombre de plages de lyse pour 10⁷ bactéries /puits

3-2-2 Effet de la matrice sur les bactéries

Des cultures de la souche DSS1039BFA1 ont été pré-incubées 1 h en matrice saumon (cru et fumée) puis l'étape d'infection du tapis cellulaire a été réalisée à partir de séries de dilutions en DMEM base d'une part et en matrice saumon d'autre part (suspension de saumon cru ou fumé au 1/10 en eau peptonée tamponnée). Le tableau 50 et la figure 35 présentent les niveaux de virulence détectés pour chacune des séries.

La différence entre les séries réalisées en diluant matrice crue et fumée est seulement d'un demi log et les 2 séries de dilutions en DMEM base aboutissent à des niveaux de virulence voisins autour de 6,8/6,9. En revanche, un écart de 2 à 3 log est enregistré entre les séries diluées en DMEM base et celles réalisées en "diluant saumon". La différence observée est associée au facteur de dilution des composés du saumon (10^{-1} ou 10^{-5}) et modifie le niveau de virulence détecté dans le test *in vitro*.

La présence de saumon (cru ou fumé) en suspension au 1/10 dans de l'eau peptonée au moment de l'infection du tapis cellulaire modifie le niveau de virulence détecté de la souche DSS1039BFA1. Cet effet est réversible puisqu'il suffit de diluer en DMEM la culture de bactéries pré-incubées en saumon pour que le niveau de virulence soit similaire à celui détecté dans les conditions standards du test (soit autour de $6,33 \pm 0,19$ figure 35).

En comparant les valeurs obtenues pour un traitement préalable du tapis cellulaire ou des bactéries, il n'y a pas de différence entre les matrices de saumon crues ou fumées en suspension en EPT. Celles-ci modifient le niveau de virulence détecté *in vitro* en agissant sur le tapis cellulaire et/ou sur les bactéries.

3-2-3 Effet de la matrice sur les bactéries après 20 jours ou 1 h d'incubation.

Le niveau de virulence de la souche DSS1039BFA1 incubée pendant 20 jours en saumon fumé était en moyenne de $2,78 \pm 0,16$ (tableau 48 p 159, moyenne fumée 10^{-1} n°1 et n°2) alors qu'il se situe autour de $3,83 \pm 0,13$ (tableau 50) après une incubation d'une heure, soit 1 log de plus dans les mêmes conditions d'infection du tapis cellulaire (saumon fumé au 1/10 en EPT).

L'appréciation d'une possible influence d'une incubation prolongée des bactéries en matrice sur la capacité à former des plages de lyse dans le test *in vitro* a alors été mis en œuvre.

Tableau 51 : Niveaux de virulence *in vitro* de 2 souches incubées 8-14 jours en matrices alimentaires

Souche (pulsotype)	Date	Contamination des matrices en ufc/g	Dilution de la matrice	Niveau de virulence <i>in vitro</i> * ± écart type
<i>Matrice crue</i>				
D1093 PS1 (T1)	04/09/2001	8,5. 10 ³	1.10 ⁻²	6,48 ± 0,01
D1093 PS1 (T1)	12/09/2001	1,1. 10 ⁸	1.10 ⁻⁵	5,97 ± 0,08
D1093 PS1 (T1)	12/09/2001	2,6. 10 ⁶	1.10 ⁻³	5,99 ± 0,08
D1093 PS1 (T1)	10/10/2001	5,9. 10 ⁸	1.10 ⁻⁴	5,86 ± 0,01
CIP103322 (T19)	28/08/2001	8,6. 10 ⁸	0,25. 10 ⁻⁶	6,07 ± 0,08
CIP103322 (T19)	12/09/2001	1,5. 10 ⁸	0,5. 10 ⁻⁴	6,23 ± 0,03
CIP103322 (T19)	12/09/2001	2,5. 10 ⁶	1.10 ⁻³	5,68 ± 0,04
CIP103322 (T19)	03/10/2001	4,4. 10 ⁵	0,5. 10 ⁻²	5,46 ± 0,02
<i>Matrice fumée</i>				
D1093 PS1 (T1)	12/09/2001	1,5. 10 ⁵	1.10 ⁻²	6,22 ± 0,02
D1093 PS1 (T1)	12/09/2001	9,7. 10 ⁴	1.10 ⁻²	6,07 ± 0,03
D1093 PS1 (T1)	10/10/2001	3,3. 10 ⁷	1.10 ⁻³	6,07 ± 0,02
CIP103322 (T19)	28/08/2001	5,4. 10 ⁸	0,25. 10 ⁻⁶	5,99 ± 0,02
CIP103322 (T19)	12/09/2001	2,5. 10 ⁵	1. 10 ⁻²	6,06 ± 0,06
CIP103322 (T19)	12/09/2001	3,8. 10 ⁵	1. 10 ⁻²	5,53 ± 0,18
CIP103322 (T19)	03/10/2001	4,7. 10 ⁴	0,5. 10 ⁻¹	5,73 ± 0,15
<i>Matrice lait UHT demi-écrémé**</i>				
D1093 PS1 (T1)	18/09/2001	3,7. 10 ⁶	0,5. 10 ⁻³	6,39 ± 0,00
CIP103322 (T19)	18/09/2001	1,6. 10 ⁷	0,5. 10 ⁻⁵	6,78 ± 0,07
CIP103322 (T19)	03/10/2001	2,8. 10 ⁶	10 ⁻³	6,09 ± 0,05
<i>Matrice Rillettes de porc</i>				
D1093 PS1 (T1)	18/09/2001	1,6. 10 ⁸	10 ⁻⁵	6,08 ± 0,09
CIP103322 (T19)	18/09/2001	1,1. 10 ⁶	10 ⁻⁵	6,00 ± 0,04
CIP103322 (T19)	03/10/2001	8,1. 10 ⁷	10 ⁻⁵	5,63 ± 0,06
<i>valeurs standards du test***</i>				
D1093 PS1 (T1)		Moyenne sur 5 déterminations		5,95 ± 0,43
CIP103322 (T19)		Moyenne sur 4 déterminations		6,48 ± 0,36

*Log₁₀ du nombre de plages de lyse pour 10⁷ *Listeria*/puits

**Les niveaux de contamination sont ici exprimés en ufc/ml

***déterminées en bouillon cœur-cervelle incubé à 37°C.

3-3 Influence d'une incubation prolongée des bactéries en matrices alimentaires

Des séries de tranches ionisées de saumon cru et fumé ont été artificiellement contaminées respectivement avec 2 souches de *L. monocytogenes* : une souche épidémique (épisode Suisse en 1987, souche CIP103322 de pulsotype T19) et une souche (D1093PS1) de pulsotype T1 à l'origine de la contamination endémique de l'atelier de fumaison E2. Les niveaux de virulence *in vitro* des souches ont été déterminés après 8-14 jours de conservation des produits sous vide à +8°C. En parallèle et suivant le même protocole, les deux souches ont été incubées 8-14 jours à +8°C dans des rillettes de porc et du lait demi-écrémé.

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 51.

♦ Niveaux de contamination et dilutions de travail pour la réalisation des tests

Les matrices alimentaires étaient contaminées au moment des tests entre $8,5 \cdot 10^3$ ufc/g et $8,6 \cdot 10^8$ ufc/g pour le saumon et entre $1,1 \cdot 10^6$ et $1,6 \cdot 10^8$ ufc/g (ou ml) pour le lait et les rillettes de porc. En conséquence, des dilutions ont été mises en œuvre afin d'obtenir un nombre de bactéries (ou de plages de lyse) approprié pour le test *in vitro*. Une seule série d'essais a été réalisée avec la souche D1093PS1 pour le lait et les rillettes alors que les expérimentations ont été répétées deux fois avec la souche épidémique.

Les déterminations ont été réalisées en microplaque P6 pour toutes ces séries d'analyses sauf celle du 10/10/01 mise en œuvre en P96.

♦ Analyse de l'ensemble des valeurs relevées à partir des différentes séries

- Pour les deux souches, les valeurs relevées à partir des matrices crues et fumées pour des facteurs de dilutions identiques (ou très proches) sont similaires avec moins d'un demi-log de différence.

- En prenant, les valeurs associées aux plus hautes dilutions appliquées, les niveaux de virulence relevés entre les matrices poisson et rillettes restent également très proches avec moins d'un demi log de différence, pour les 2 souches testées.

- Les valeurs obtenues à partir du lait apparaissent supérieures à celles obtenues en matrice poisson et rillettes. Pour des facteurs de dilution comparables, la différence est d'environ :
 - 0,5 log (dilution 10^{-3}) à 0,7 log (dilution 10^{-5}) pour la souche CIP 103322
 - 0,4 log (dilution autour de 10^{-3}) pour la souche D1093PS1

En résumé, l'ensemble des résultats indique qu'il n'y a pas d'effet mesurable de la matrice sur le niveau de virulence déterminé *in vitro* pour les deux souches testées après une incubation de 8-14 jours en matrices alimentaires.

Par ailleurs, le pulsotype T1 n'étant pas significativement associé ni à la classe saumon, ni au poisson fumé d'une façon générale et la souche CIP103322 ayant été isolée depuis plus de 10 ans, les expérimentations se poursuivent avec la souche DSS1039BFA1, de pulsotype T19 (classe saumon) récemment isolée (2001) et sélectionnée du panel produits de la pêche.

La matrice saumon broyée au 1/10 dans de l'eau peptonée et utilisée telle quelle pour l'infection du tapis cellulaire contient beaucoup de matières solides en suspension. La présence de "fibres" et de débris cellulaires issus du muscle du poisson peut interférer sur la phase d'infection en modifiant le taux de pénétration des bactéries dans les cellules HT-29. Cette hypothèse expliquerait également pourquoi une différence significative est visible entre les tests "matrice lait", et les autres matrices testées, les rillettes présentant autant sinon plus de fibres en suspension que le saumon, une fois broyées au 1/10. Il y avait donc là un effet "fibres" et non pas un effet "texture". Afin de vérifier cette hypothèse, une dernière série d'expérimentations a été mise en œuvre à partir de filtrats de saumon.

Tableau 52: Influence d'une incubation du tapis cellulaire ou de la souche DSS1039BFA1 dans du filtrat de saumon sur le niveau de virulence détecté *in vitro*.

Élément traité	Nature du filtrat	Niveau de virulence ¹ ± écart type
Souche DSS1039BFA1 pré-incubée 1 h ²	Saumon fumé au 1/10 en EPT	4,59 ± 0,11
	Saumon fumé au 1/5 en EPT	3,80 ± 0,02
	Saumon cru au 1/10 en EPT	5,41 ± 0,01
	Saumon cru au 1/5 en EPT	4,85 ± 0,03
Tapis cellulaire Pré-incubé 1 h	Saumon fumé au 1/10 en EPT	6,22 ± 0,02
	Saumon fumé au 1/5 en EPT	6,08 ± 0,08
	Saumon cru au 1/10 en EPT	5,81 ± 0,05
	Saumon cru au 1/5 en EPT	5,45 ± 0,10

¹ Log₁₀ du nombre de plages de lyse pour 10⁷ bactéries /puits. Valeurs moyennes des essais réalisés en triple.

² Les dilutions pour l'étape d'infection ont été réalisés avec les filtrats correspondant respectivement à chacune des séries.

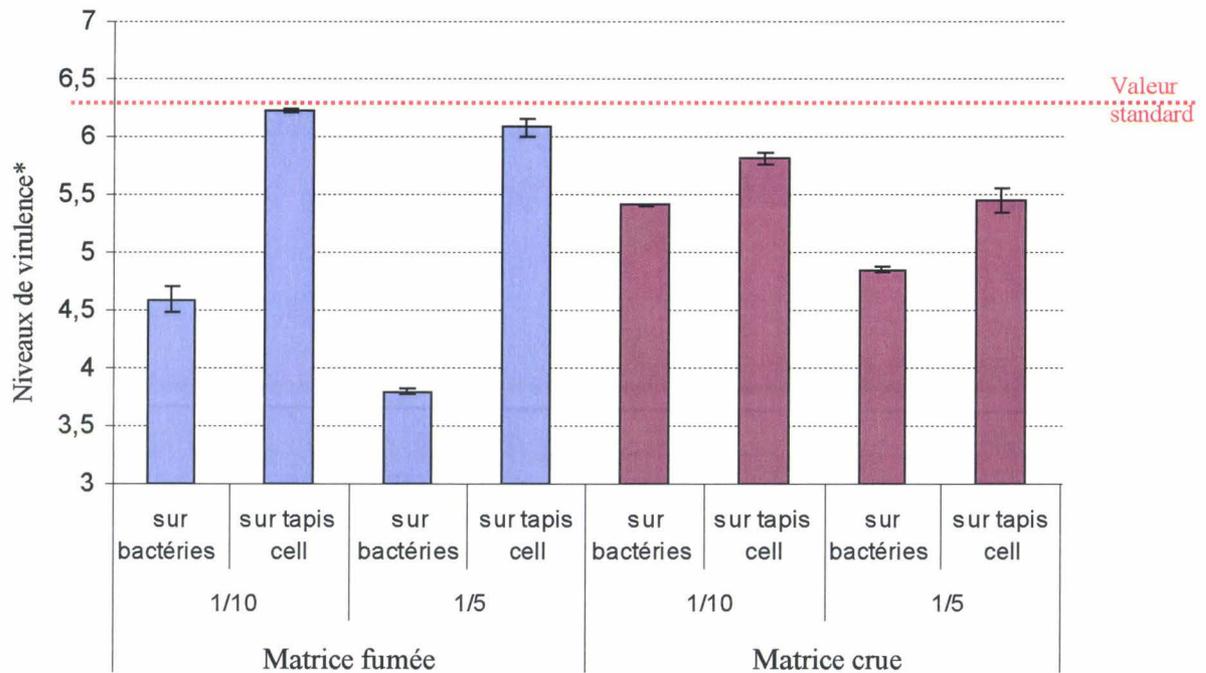


Figure 36 : Influence de la matrice saumon fumé sur le niveau de virulence *in vitro* de la souche DSS1039BFA1.

Série matrice crue ou fumée, correspond au traitement du tapis cellulaire ou des bactéries avec des filtrats de saumon dilués au 1/10 ou au 1/5 en EPT.

La valeur standard est donnée à titre d'élément de comparaison et correspond à la valeur moyenne enregistrée à partir d'une série de quatre tests avec une culture en cœur-cervelle (BHI) incubée à 37°C (6,33 ± 0,19, tableau 36 p 131)

*exprimé en log₁₀ du nombre de plages de lyse pour 10⁷ bactéries /puits

3-4 *Influence d'un filtrat de saumon sur le niveau de virulence détecté in vitro.*

L'objectif de cette série d'expérimentations était de vérifier l'existence d'un effet matrice saumon fumé en utilisant une suspension de saumon en EPT filtrée à 0,2 µm. En suivant la même démarche que précédemment, l'incidence des composés du saumon cru et fumé a été évaluée en parallèle sur le tapis cellulaire et sur les bactéries. Pour cette nouvelle série d'essais, la matrice saumon a été diluée au 1/10 et au 1/5 dans l'eau peptonée tamponnée pour apprécier un possible effet de concentration. Toutes les dilutions pour la phase d'infection du tapis cellulaire ont été mises en œuvre avec les filtrats correspondant à chacune des séries (soit 4 séries au total, filtrats de saumon cru et fumé au 1/5 et au 1/10). L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 52 et la figure 36.

3-4-1 Répétabilité

Chaque série d'essais a été réalisée en triple pour l'étape d'infection du tapis cellulaire (3 puits/dilution). Les écarts types associés aux moyennes des niveaux de virulence varient entre $\pm 0,01$ et $\pm 0,11$ et suggèrent des résultats peu dispersés et une bonne répétabilité pour chaque série d'expérimentation.

3-4-2 Effet du filtrat de saumon sur le tapis cellulaire

Pour la série "filtrats de saumon fumé sur le tapis cellulaire", les niveaux de virulence relevés pour la souche DSS1039BFA1 à partir des 2 dilutions 1/10 et 1/5 restent très proches (6,22/6,08) et avoisinent la valeur standard de la souche déterminée avec une culture en bouillon cœur cervelle incubée à 37°C (soit une valeur moyenne déterminée à partir de 4 essais de $6,33 \pm 0,19$, tableau 36, p131). Il en est de même pour les résultats associés au saumon cru avec moins de 0,4 log de différence entre les 2 dilutions et des valeurs inférieures aux conditions standards de 0,4 à 0,8 log.

Un pré-traitement du tapis cellulaire avec des composés de saumon cru modifie sensiblement le niveau de virulence détecté de la souche DSS1039BFA1 alors que ce n'est pas le cas avec les filtrats contenant des composés de la fumée.

3-4-3 Effet du filtrat de saumon sur les bactéries

Les niveaux de virulence relevés à partir des bactéries incubées en filtrats de saumon fumé sont inférieurs de 0,8 à 1 log aux séries incubées en matrices crues pour les mêmes facteurs de dilution. Par ailleurs, à l'intérieur de chacune des séries crues et fumées une différence entre

les dilutions 1/5 et 1/10 est visualisée avec des écarts respectifs de 0,6 log (cru) et 0,8 log (fumé).

Les filtrats contenant des composés de la fumée modifient significativement la capacité de la souche DSS1039BFA1 à former des plages de lyse. Cet effet est d'autant plus marqué que le filtrat est concentré. Une différence de 1,6 log à 2,4 log est observée entre les valeurs obtenues à partir des filtrats et la valeur standard déterminée avec une culture en bouillon cœur-cervelle incubée à 37°C.

3-4-4 Comparaison des différentes séries

Les composés de la fumée appliqués sur le tapis cellulaire ne modifient pas le niveau de virulence détecté *in vitro* de la souche DSS1039BFA1, en revanche l'effet sur les bactéries est significatif et a pour conséquence un abaissement du niveau de virulence détecté.

En examinant seulement l'effet du filtrat de saumon cru, les différences observées entre le tapis cellulaire et les bactéries restent peu marquée. Les facteurs de dilutions n'induisent pas n'ont plus de différences remarquables. Un écart d'environ 1 log avec la valeur standard montre que les composés de la matrice saumon cru modifient les niveaux de virulence détectés de la souche DSS1039BFA1 en agissant sur le tapis cellulaire et/ou sur les bactéries.

3-5 Synthèse des résultats

L'incubation prolongée de souches de *L. monocytogenes* en saumon fumé (8-14 jours à +8°C) ne modifie pas leur niveau de virulence détecté *in vitro* par rapport à un témoin réalisé en saumon cru. Les valeurs relevées pour les deux séries sont similaires et ne se distinguent pas non plus d'une incubation en rillettes de porc.

En revanche, lorsque les bactéries sont en contact durant la phase d'infection du tapis cellulaire avec les composés de la matrice poisson fumé dilués au 1/10, la capacité à former des plages de lyse diminue. Cependant, les valeurs relevées dans le test *in vitro* à partir des matrices crues dans les mêmes conditions ne sont pas significativement différentes. Les résultats montrent que le saumon en suspension cru ou fumé en EPT affecte les résultats du test *in vitro* en agissant sur le tapis cellulaire et/ou sur les bactéries.

Suite à ces observations, les matrices en suspension ont été filtrées et les composés du saumon cru et fumé en solution ont été utilisés pour vérifier si leur présence modifiait le niveau de virulence détecté *in vitro* de la souche DSS1039BFA1. Les résultats montrent que le filtrat de saumon cru abaisse dans une faible proportion le niveau de virulence détecté en agissant sur le tapis cellulaire et/ou sur les bactéries. En revanche, les composés de la fumée n'agissent que sur les bactéries et modifient significativement les valeurs du test de plages de lyse. Les scores affichés dans ces conditions sont abaissés de 2 log par rapport au témoin "matrice fumée sur le tapis cellulaire" et à la valeur standard déterminée avec une culture de la même souche en bouillon coeur-cerveille incubé à 37°C.

1- Analyse d'une stratégie pour la récupération de la diversité génétique des populations de *L. monocytogenes* dans les poissons fumés.

Afin de vérifier si les poissons fumés sont effectivement contaminés ou non par un type particulier de *L. monocytogenes*, la démarche choisie a consisté à faire un état des lieux des génotypes présents dans la filière. Pour ce faire, la récolte d'isolats a constitué la première étape de ce travail notamment au niveau des suivis de fabrication qui ont été mis en œuvre auprès de 2 sauteurs-saurisseurs boulonnais et des campagnes de prélèvements de poissons fumés dans la grande distribution. L'objectif majeur était de récupérer au mieux la diversité génétique des populations de *L. monocytogenes* naturellement présentes dans les prélèvements afin d'établir une "photographie" du profil de contamination des poissons fumés la plus informative et représentative possible. Dans cette optique, une stratégie prenant en compte l'impact des méthodologies sur le recouvrement des *L. monocytogenes* a été définie en prenant appui sur les points exposés ci-après. Il a été clairement établi que plusieurs types (sérotypes et/ou génotypes) pouvaient coexister au sein d'un même prélèvement positif (Ryser *et al.* 1996, Ericsson *et al.*, 1997). Cependant la récupération de cette diversité s'avère dépendante d'une part des méthodes de culture mises en œuvre (effet de sélection de certains clones) et d'autre part du nombre d'isolats caractérisés par échantillons positifs (Lewis *et al.* 1991, Loncaveric *et al.* 1996).

Concernant les milieux d'enrichissement développés à ce jour, aucun n'est spécifiquement recommandé pour l'analyse des produits de la mer et à fortiori des poissons fumés. De surcroît, diverses études ont montré que les milieux classiquement utilisés n'étaient pas optimisés pour la détection du pathogène dans ces types de produits : des interférences avec notamment des bactéries du genre *Corynebacterium* (présentes sur le poisson matière première) ont été mises en évidence conduisant à de fausses présomptions (virage de l'indicateur à une coloration noire avec le bouillon de Fraser) de la présence de *L. monocytogenes* (Embarek, 1994). Cette population n'étant pas inhibée, elle devient visiblement majoritaire dans les enrichissements et conduit à un abaissement de la sensibilité de la détection. Enfin, il a été démontré que le principal compétiteur de *L. monocytogenes in vitro* à partir des bouillons UVM et Fraser est *L. innocua* (Petran *et al.* 1993, Curiale *et al.* 1994). En effet, une différence de 2 à 3 log est observée entre les 2 espèces au bout de 24 heures d'incubation dans les bouillons avec un avantage sélectif pour *L. innocua* (Petran *et al.*

1993). En revanche, cette observation ne correspond pas avec les événements se produisant *in situ* : les expériences menées à partir de chair de crabe ou de sauce au bleu ne révèlent pas des temps de génération différents entre les 2 espèces de *Listeria* (Petran *et al.* 1993, Rawles *et al.* 1995). A ce problème de manque de spécificité par rapport à la flore associée visée par les agents sélectifs s'ajoute l'état physiologique de la bactérie dans le prélèvement qui conditionne en grande partie l'application avec succès ou non d'un milieu de culture. En effet, après avoir été soumises aux divers traitements sublétaux des procédés de fabrication, notamment dans le cas présent, après les opérations de salage-séchage-fumage, l'état de stress généré chez les bactéries se traduit par la perte de la capacité à former une colonie visible sur un milieu sélectif solide ou non (Brissonnet *et al.* 1994, Catteau 1999). Pour cette raison, une étape dite de "revivification" s'avère souvent indispensable et consiste à procéder à une pré-incubation des suspensions mères dans des conditions non sélectives pendant un temps plus ou moins long. Une autre solution consiste à utiliser un bouillon tel que le LRB (*Listeria* Repair Broth) (Bush *et al.* 1992) dont la formulation a été optimisée pour la récupération des cellules lésées à la suite d'un traitement thermique (chauffage ou congélation) ou d'une exposition à des molécules chimiques actives pour la désinfection des sites industriels. Son emploi comprend également une phase d'incubation non sélective de 4h visant à améliorer la "réparation des dommages cellulaires" puis l'addition des agents inhibiteurs est réalisée. Par ailleurs, des réserves sont également émises sur les performances du milieu Palcam vis-à-vis de la récupération des populations qui seraient altérées par des procédés industriels (NF V08-055). Il est donc suggéré d'utiliser en parallèle le milieu Oxford (NF EN ISO 11290-1) moins sélectif et de ce fait permettant un meilleur recouvrement des cellules stressées. Les comparaisons des milieux d'isolements réalisées par Johansson (1998) conduisent à préférer pour les mêmes raisons le milieu LA (*Listeria* Agar selective medium) pour les détections par isolement direct (ou numération) et le milieu LMBA (*Listeria* Mono. Blood Agar) pour les isolements après enrichissement primaire ou secondaire. De toute évidence, combiner au moins 2 méthodes de culture basées sur des principes de sélection différents s'avère d'un intérêt certain en terme de performance au niveau de la sensibilité (action sur des flores associées en compétition), de la récupération des cellules altérées (action sur l'état non cultivable) et de la diversité génétique (action contre l'effet de sélection de clones) (Flanders *et al.* 1995, Loncaveric *et al.* 1996, Pritchard *et al.* 1999).

Consécutivement à la phase d'isolement, et toujours dans un souci de récupération de la diversité, il est apparu essentiel de pouvoir caractériser un nombre important d'isolats par prélèvement positif. Une procédure en 2 étapes a donc été mise en œuvre et s'appuie sur l'utilisation de la technique RAPD comme outil de criblage rapide des isolats et la méthode de macrorestriction comme moyen de comparer les différents génotypes, d'établir leur possible lien de parenté suivant le degré de similarité entre leurs profils, de les classer par groupes génétiques sur ces mêmes critères. En appliquant ce schéma de typage, environ 10 % des isolats au total ont été sélectionnés dans un premier temps pour être ensuite caractérisés par pulsotypage soulignant ainsi l'intérêt de la démarche dans la mesure où 44 % et 28 % des prélèvements respectivement en provenance des sites E1 et E2 contenaient au moins 2 types de clones *L. monocytogenes*. Lors des suivis de fabrication, la diversité des populations a été surtout détectée au niveau des grilles d'évacuation, des saumures saturées mais aussi des produits finis avec jusqu'à 5 pulsotypes distincts identifiés. De plus, tous les lots de harengs fumés positifs en sortie de fabrication présentaient au moins 2 types différents de souches. Ces résultats confirment d'une part qu'effectivement les produits alimentaires sont communément contaminés par plusieurs clones comme l'avaient souligné d'autres équipes (Ryser *et al.* 1996, Ericsson *et al.* 1997) et que d'autre part, le pouvoir discriminant de la technique RAPD M13 apparaît suffisant pour le criblage des isolats et la détection rapide de la présence de différents types de *L. monocytogenes* au sein d'un même prélèvement. Quelques exceptions ont cependant été observées sur ce dernier point. Il n'a pas toujours été possible de distinguer des souches d'un même type clonal, c'est à dire présentant un degré de similarité tel au niveau des profils électrophorétiques qu'à l'origine, elles dérivent vraisemblablement d'un même ancêtre commun. Dans ce travail, le degré de parenté avéré a été appliqué pour des souches présentant des empreintes proches à 90 % avec 2 enzymes dont au moins *ApaI*. Ainsi, les pulsotypes T5 et T5c (types combinés *ApaI* + *AscI*), ne sont pas distingués en RAPD alors que leurs profils en macrorestriction présentent 89 à 92 % de similarité (suivant le nombre d'enzymes utilisées). A contrario, les pulsotypes T6a et T6e ainsi que T11 et T11a similaires respectivement à 98% et 95 % sont nettement différenciés par la technique PCR. L'identification de types très proches pouvant être assimilés à des variants génétiques (dérivant d'un même clone) au sein d'un même prélèvement ou d'une même zone d'environnement examinée a également été décrit lors d'investigations en ateliers

de fumaison (Johansson *et al.* 1999, Dauphin *et al.* 2001). Bien que ces micro-évolutions soient détectées, peu d'éléments permettent de déterminer à quel moment elles sont apparues, à savoir au sein de l'environnement naturel ou durant la phase d'isolement *in vitro*. Dans la mesure où T5/5c et T11/11a ont été identifiés au moins dans deux prélèvements différents, la diversité observée existait selon toutes probabilités avant la mise en œuvre des analyses. Pour les pulsotypes T6/6e, une possible incidence des milieux de culture sur la stabilité du génome n'est pas à exclure. Ce phénomène a d'ailleurs été mis en évidence suite à des repiquages en série d'un même panel de souches à l'occasion d'une étude multicentrique sur le typage moléculaire par macrorestriction (Brosch *et al.* 1996). La présence de ces variants génétiques est discutée plus loin avec la construction de la base de données des empreintes de souches issues des produits de la pêche.

L'impact de la procédure d'isolement a été clairement démontrée sur un autre plan au cours de ce travail et les événements générés *in vitro* au cours de cette phase induisent significativement un biais analytique. En effet, les données récoltées sur la répartition des pulsotypes en fonction des milieux de culture montrent qu'elles ne reflètent pas la répartition *in situ*, à savoir dans le produit analysé ou le prélèvement d'environnement examiné. Suivant les cas de figure et notamment les clones en compétition initialement présents, les milieux d'enrichissement ou d'isolement peuvent favoriser l'émergence d'une fraction d'entre eux d'une façon sélective. L'exemple de la fréquence de détection du pulsotype 2 au cours des 2 premières visites sur le site E2 illustre au mieux ce phénomène et son impact sur l'interprétation des données. Au cours des 2 séries de prélèvements concernées, le milieu LMBA est apparu comme le plus efficace au niveau du taux de récupération de l'espèce *L. monocytogenes*. En conséquence, plus de la moitié des souches récoltées (56 %) avaient été isolées de ce milieu en dépit de la mise en œuvre en parallèle des milieux LA et Palcam. A l'inverse de ses performances évidentes en terme de sensibilité, le milieu LMBA a affiché le plus faible score pour l'isolement du pulsotype 2. Son utilisation conduit même à le détecter trois fois moins qu'avec les 2 autres milieux alors que tous protocoles confondus, ce pulsotype est déjà sous représenté avec seulement 15 % des isolats (tableau 24, p 105). Dans ce contexte, il n'est pas exclu que les produits finis fabriqués sur le site E2 étaient en définitive contaminés à la fois par les pulsotypes 1 et 2 bien que ce point n'ait pas été mis en évidence de façon directe. Cette hypothèse se trouve confortée par les résultats obtenus à

partir du site E1 sur lequel les pulsotypes 1 et 2 ont également été isolés. A deux reprises, les produits en sortie de fabrication comportaient des souches de type T2 associées à d'autres génotypes excepté le type T1. Il est alors intéressant de noter que la seule occasion pour laquelle ces deux pulsotypes ont été détectés simultanément s'est opérée lors du sixième suivi de fabrication mis en œuvre, à partir d'un prélèvement de saumure saturée. Cependant, seul le pulsotype T1 a été par la suite mis en évidence dans les produits finis (tableau 20, p 99). Il est possible que les composés de la fumée, de nature toxique pour les bactéries et présentant une activité listéricide de surcroît (Faith *et al.* 1992, Sunen 1998), combinés aux agents chimiques présents dans les milieux synthétiques agissent en augmentant la pression de sélection et la compétition entre les souches. Dans ces conditions, singulièrement différentes de la composition d'un produit destiné à l'alimentation humaine, les clones prédominants isolés sont sans doute les mieux adaptés *in vitro* mais ne correspondent peut-être pas à ceux ayant une dynamique de croissance « à risque » dans l'aliment lorsque celui-ci est conservé dans les conditions usuelles c'est à dire à basses températures. L'incidence de la matrice alimentaire sur la détection des *L. monocytogenes* durant la phase d'enrichissement a déjà été mise en question par une équipe belge mais sur un autre plan (Balimandawa *et al.* 1994). Leurs travaux montrent qu'à partir du milieu L-Palcamy, une dilution au 1/100 de produits carnés conduit à deux fois plus de récupération du pathogène qu'une dilution au 1/10. Cette différence n'étant pas observée avec les produits laitiers ou d'origine végétale, les auteurs suggèrent qu'il existe dans la viande des composés neutralisant les inhibiteurs du milieu de culture. Ainsi, le développement d'une flore annexe aurait pour conséquence de masquer la présence de *L. monocytogenes*.

Toutes ces observations suggèrent fortement que ce qui est visualisé de façon artificielle peut être complètement décalé d'une certaine réalité. Il est alors important d'interpréter les données avec prudence surtout dans le domaine de la caractérisation du risque. La phase d'enrichissement *in vitro* conduit inévitablement à des compétitions entre les différents clones d'une même espèce et/ou entre les différentes espèces de bactéries présentes et peut alors être comparée à une "boite noire dans laquelle se déroulent des événements trop souvent mal maîtrisés qui perturbent évidemment les résultats" (Catteau 1993 et 1999). Ce problème de sélection de clones pour *L. monocytogenes* est régulièrement évoqué à la fois par des équipes ayant combiné au moins deux protocoles de détection en parallèle (Loncaveric *et al.* 1996,

Ryser *et al.* 1996) et également par ceux qui n'ont pas mis en œuvre une telle procédure mais qui émettent des réserves sur leurs observations (Gendel *et al.* 2000, Norton *et al.* 2001). Dans leur discussion, Ryser *et al.* (1996) suggèrent de rechercher plus spécifiquement les fractions de clones à l'origine des épidémies majeures dans la mesure où la présence de ces derniers peut potentiellement être masquée à la suite d'un phénomène de compétition.

En résumé, combiner plusieurs milieux de culture avait suscité jusqu'alors un intérêt surtout pour augmenter la sensibilité de la détection du pathogène (Flanders *et al.* 1995, Pritchard *et al.* 1999, Johansson 1998), la démarche contribue également à apporter une meilleure vision de la diversité des souches et de leur distribution mais avec des limites avérées. La solution n'est sans doute pas de combiner d'autres conditions de culture, ce qui "alourdirait" davantage les investigations. Les résultats soulignent que de nouveaux outils doivent être développés à la fois pour la caractérisation du risque et pour une meilleure compréhension de l'écologie microbienne.

2 - Prévalence, origine et profil de la contamination des poissons fumés

A partir des suivis de fabrication mis en œuvre sur les deux sites de production et avec la stratégie de récolte des isolats appliquée, les voies de contamination ont clairement été déterminées. La principale différence entre les 2 entreprises réside au niveau des facteurs ayant un impact significatif sur la contamination finale des produits fumés. Sur le site E1, les résultats montrent que la qualité de la matière première est déterminante alors que la colonisation de l'atelier de fumaison par deux clones distincts est à l'origine de la contamination endémique de la production sur le site E2 (pulsotypes T1 et T2, tableau 21 p 101). L'identification de quelques clones prédominants qui persistent dans l'environnement au fil du temps et deviennent la source majeure de contamination de la production est rapportée dans la plupart des investigations menées en ateliers de fumaison (Rorvik *et al.* 1995, Autio *et al.* 1999, Johansson *et al.* 1999, Dauphin *et al.* 2001, Fønnesbech Vogel *et al.* 2001, Norton *et al.* 2001). Dans le cas de l'entreprise 2, l'inspection visuelle des locaux hors activité a fortement suggéré que l'établissement de ces clones résultait d'une procédure de nettoyage et de désinfection déficiente. L'eau du réseau utilisée dans la région est particulièrement dure et le tartre déposé sur les surfaces, notamment sur l'acier inoxydable, a de toute évidence contribué à réduire l'efficacité des agents chimiques entrant dans la composition des produits utilisés. Cette hypothèse devient plausible en se référant aux travaux de Holah *et al.* tout récemment publiés (2002). Les auteurs soulignent que ce problème de persistance de clones n'est pas relié à une augmentation de la résistance des bactéries envers les désinfectants mais plutôt à des conditions d'application des produits défavorables comme l'utilisation d'une eau calcaire. De plus, de possibles mécanismes de résistance aux ammoniums quaternaires chez *L. monocytogenes* ont été décrits (Aase *et al.* 2000, Mereghetti *et al.* 2000) mais pas à l'hypochlorite de sodium (Holah *et al.* 2002), utilisé par cet industriel au moment des campagnes de prélèvements. La diversité des souches sur ce site n'a été observée qu'à partir des grilles d'évacuation et indique que des souches labiles circulent néanmoins dans les locaux mais sont sans incidence sur la contamination finale des produits. Ce phénomène suggère que les clones "installés" se comportent vraisemblablement comme une flore de barrière en empêchant l'intrusion et l'établissement d'autres types de *L. monocytogenes*. Le pulsotype T1 avait déjà été mis en évidence en 1998 lors d'une étude antérieure sur ce même site (Dauphin *et al.* 2001) et sa présence persistante 4 ans après conduit à penser que le clone a pu se disséminer amplement sur l'ensemble du site et que des phénomènes d'adaptation ont pu se produire au cours du temps rendant ainsi son élimination

sans doute d'autant plus difficile. Concernant le deuxième clone, représenté par le pulsotype T2, son identification sur l'autre site examiné (E1) s'est présentée de façon régulière au niveau de l'environnement avant le démarrage de la production et également aux différentes étapes du procédé de fabrication sans qu'un lien direct avec la matière première n'ait pu être établi. Ainsi, malgré une stratégie de nettoyage et de désinfection apparaissant comme particulièrement efficace sur ce site, la présence significativement marquée et la circulation de ce clone dans les locaux suggère sa probable persistance environnementale dans la mesure où de surcroît, il a effectivement été détecté une fois au niveau du filtre rotatif "propre" de l'injecteuse. Par ailleurs, quelques mois seulement avant la mise en œuvre de la première campagne de prélèvements, ce pulsotype avait déjà été mis en évidence de façon sporadique sur des surfaces de travail de l'atelier de conditionnement après nettoyage et désinfection et sur un lot de hareng fumé fabriqué en mars 2000. Des mesures correctives avaient alors été mises en place par l'industriel pour éradiquer ce problème récurrent. L'identification d'un génotype spécifique comme T2, commun aux deux sites de production et fortement relié à une contamination environnementale conforte l'idée que certaines souches présentent probablement des propriétés d'adhérence et/ou une aptitude à former des biofilms particulières comme l'ont suggérés d'autres équipes (Fonnesbech Vogel *et al.* 2001, Norton *et al.* 2001). De récentes études montrent effectivement que les souches peuvent être classées suivant leurs performances sur ces deux derniers points (Kalmokoff *et al.* 2001, Djordjevic *et al.* 2002). Toutefois les méthodologies mises en œuvre ne donnent pas un même profil de réponse et les résultats semblent être influencés par la nature des supports utilisés ou les températures d'incubation appliquées. Dans les travaux de Kalmokoff *et al.* (2001), 1 seule souche sur les 36 testées développe un biofilm sur une surface en acier inoxydable à température ambiante tandis que la mise en œuvre d'un test en microplaque PVC incubée à 32°C permet de visualiser des différences significatives entre les 31 souches étudiées (Djordjevic *et al.* 2002). Le classement de ces dernières fait apparaître une possible corrélation entre les performances visualisées et les 3 branches phylogénétiques antérieurement définies à partir de marqueurs moléculaires reposant d'une part sur le polymorphisme des gènes impliqués dans la virulence *hly*, *inlA*, *actA* et d'autre part sur le ribotype (Wiedman *et al.* 1997). Néanmoins, sur les 5 souches apparaissant comme résidentes dans les ateliers de fumaison au cours de l'étude de Norton *et al.* (2001), seulement 2 se distinguent vraiment du reste du panel examiné dans les conditions expérimentales appliquées de cette dernière étude (Djordjevic *et al.* 2002). Les tests *in vitro* développés dans ce domaine ne permettent donc pas encore de relier ce qui est observé *in situ* à une aptitude particulière

des souches à l'implantation et à la persistance en atelier de production. Les mécanismes de formation des biofilms chez *L. monocytogenes* ne sont pas encore connus, il semblerait que la température y joue un rôle important (Norwood *et al.* 2001) et il n'est pas exclu que la présence d'autres espèces de bactéries pourrait favoriser l'implantation des souches (Chasseignaux, 1999). Sur ce site E1, deux autres pulsotypes ont été identifiés de façon répétée sans qu'un lien direct avec la matière première travaillée puisse toujours être établi (pulsotypes T9a et T11, tableau 20 p 99). En l'absence de leur détection dans les locaux hors production, il est difficile de déterminer leur véritable origine.

Sur cette ligne de fabrication de harengs fumés (E1), le mode de salage en saumure et l'environnement de l'atelier de conditionnement représentent les deux sources potentielles de dissémination à l'origine de contaminations croisées. Le problème du procédé d'injection, dans lequel la saumure saturée est recyclée en continu plusieurs heures et dans certains cas tout au long de la journée de production est communément considéré et reconnu comme un point critique de contamination majeur (Autio *et al.* 1999, Rapport FAO 1999, Fonnesbech Vogel *et al.* 2001). Par ailleurs, les lots de harengs congelés utilisés en tant que matières premières présentaient une contamination assez conséquente en *L. monocytogenes* une fois sur deux et exclusivement lorsqu'ils étaient en provenance d'Islande. Des investigations supplémentaires sur ces fournisseurs ont permis de mettre en évidence que les poissons provenaient d'une même zone de pêche mais étaient congelés à terre sur 4 sites distincts. La caractérisation des souches isolées sur les lots réceptionnés montre que le profil de contamination de chacun de ces sites industriels est spécifique. En effet, les pulsotypes identifiés sont significativement différents pour 3 usines sur 4 et les clones détectés pour 2 d'entre eux ont été mis en évidence à 3 reprises. Ces résultats suggèrent là encore une contamination endémique des locaux plutôt que la présence de souches indigènes sur les harengs frais. De la même façon que la colonisation des locaux au niveau des abattoirs peut être à l'origine de la contamination des saumons frais (Rorvik *et al.* 2000b), le même scénario semble se dérouler pour les harengs au niveau de l'étape de congélation. Ce point souligne que chacune des étapes de transformation doit être prise en considération lors de la mise sous assurance qualité d'un procédé de fabrication y compris celles en amont des ateliers de fumaison. La mise en place de cahiers des charges vis-à-vis des fournisseurs de matières premières semble être le seul recours pour les industriels, la réglementation n'imposant pas de critères particuliers pour ces lots de poisson destinés à la transformation. Il y a là, à la fois un vide juridique et méthodologique (milieux de culture ou techniques non spécifiques pour l'analyse des produits de la mer) qui ne permet pas une maîtrise de la qualité à l'importation.

De plus l'harmonisation des méthodes au niveau international pour la détermination du statut sanitaire d'un lot de produits de la mer vis-à-vis de *L. monocytogenes* serait également intéressante à mettre en œuvre. Dans le cas précis, les interlocuteurs islandais déclaraient les lots " *Listeria free*" mais n'utilisaient ni le même mode de prélèvement ni les mêmes milieux de culture (application de bouillon UVM au lieu de LRB et Fraser dans notre étude). Enfin, il est à noter qu'après caractérisation des souches, sur les 7 groupes génétiques de *L. monocytogenes* identifiés sur ces lots de harengs, 3 rassemblaient des souches appartenant au sérotype 4b (G15, G16, G20) majoritairement impliqué dans les cas cliniques humains.

Alors que la prévalence en *L. monocytogenes* dans les poissons fumés oscille d'une façon générale entre 10 % et 60 % (Rapport FAO, 1999), elle ne semble pas avoir d'incidence en terme de listériose. Ce constat conduisant à s'interroger sur la variabilité des souches, il était intéressant de vérifier si le procédé de fumage sélectionnait ou pas des types particuliers de *L. monocytogenes*. Avec la stratégie de récolte des isolats mise en œuvre, les données qualitatives relevées à partir des différentes étapes de fabrication ne démontrent pas qu'il existe différents niveaux de sensibilité des clones vis-à-vis du procédé de fumage. En effet, il apparaît que tous les pulsotypes identifiés avant cette étape, dans les poissons ou l'environnement pouvant être en contact avec le produit en cours de transformation (en excluant donc les grilles d'évacuations) ont été retrouvés après fumage sans aucune exception (tableau 22, p 103). En revanche, les données quantitatives ont permis de clairement visualiser l'impact du salage-fumage sur la réduction du niveau de contamination et confirment ainsi l'action potentiellement listéricide du "process" comme l'avaient également décrit Rorvik *et al.* (1995, 2000a) et Johansson *et al.* (1999). Cependant, l'effet enregistré apparaît plus ou moins marqué et varie suivant le mode de salage appliqué, à savoir l'injection de saumure saturée (site E1) ou l'utilisation de sel sec (site E2). Au cours des suivis de fabrication de saumon fumé (site E2), la contamination des produits s'est opérée par contact avec l'environnement conduisant à une localisation des *L. monocytogenes* en surface des filets. Dans ces conditions, salage et fumage semblent agir efficacement et en synergie en réduisant de façon significative la contamination globale de 2,5 fois (visite 3) jusqu'à l'élimination complète du pathogène (visite 1) suivant le niveau de contamination initial relevé après l'étape de filetage (tableau 21, p 101). L'effet combiné du sel et du taux de phénol a été par ailleurs démontré sur l'allongement de la durée de vie du produit (Leroi *et al.* 2000). Dans cette dernière étude, une forte interaction entre les deux facteurs a été mise en évidence, même pour de faibles concentrations et ceci conforte ainsi cette hypothèse. A l'inverse, le salage par injection sur le site E1 augmente significativement le niveau de contamination des

filets et les bactéries se retrouvant "à cœur" apparaissent alors moins sensibles à la fumée (tableau 20, p 99). Toutes ces observations sont en accord avec d'autres travaux rapportés par Rorvik (2000a) et soulignent que le fumage à froid constitue réellement une étape de maîtrise de la qualité des poissons fumés. Ainsi, pour la filière, éviter tous risques de recontamination au niveau du tranchage et du conditionnement représente une priorité pour le maintien de faibles niveaux de contamination dans les produits finis (Rorvik 2000a, Sabanadesan *et al.* 2000).

L'origine de la contamination des poissons fumés est donc fortement liée au contexte de fabrication. Outre la qualité des matières premières, les procédés technologiques employés (salage à sec, salage par injection) et les mesures d'hygiène appliquées sur les sites ont un rapport direct avec la prévalence en *L. monocytogenes* dans les produits finis. Cette situation se reflète dans les résultats de la campagne de prélèvements de poissons fumés dans la grande distribution. Les scores obtenus révèlent d'une part que le pathogène est omniprésent dans la filière avec 9 sites sur 12 examinés présentant des produits contaminés à la vente et conduisant à une prévalence globale importante de 23 %, et d'autre part que le niveau de contamination est plutôt faible, réparti dans le produit de façon très hétérogène. En effet, dans la majorité des cas, 1 seule prise d'essai de 25g sur les 15 réalisées pour la caractérisation d'un lot (5 sachets) a abouti à l'isolement du pathogène. Cependant, en final 7 % des poissons fumés analysés dépassaient le seuil réglementaire des 100 ufc /g en fin de DLC. Sur ce dernier point, il est intéressant de noter que là encore pour un même sachet incriminé, jamais plus d'une seule prise d'essai sur 3 n'a permis de mettre en évidence ces scores hors norme. Les résultats de dénombrements montrent donc que la détection du pathogène reste très hétérogène sur la surface du produit suggérant la présence de "spots" de contamination isolés. Ainsi, en se référant au plus haut des scores obtenus au cours de cette campagne de prélèvement dans la grande distribution (tableau 27, p 109), que le consommateur mange 25 g ou 75 g de saumon fumé, il aura en tout et pour tout ingéré au maximum $1,9 \cdot 10^5$ *L. monocytogenes*. Par comparaison, un pot de rillettes contaminé entre 10^2 et 10^4 ufc/g (cas de l'épidémie française en 1993, Goulet *et al.* 1998) pour une portion moyenne de 50 g/personne reviendrait à ingérer un nombre similaire de bactéries ($5 \cdot 10^3$ à $5 \cdot 10^5$ *L. monocytogenes*). La dose infectieuse n'étant toujours pas connue à ce jour et étant multi-factorielle car vraisemblablement dépendante de l'état de santé de la personne et en particulier de son système immunitaire, des caractéristiques de la souche (hypothèse de souches plus ou moins virulentes) mais également du type d'aliment absorbé (hypothèse d'un effet matrice), il n'est pas excessif de dire que le consommateur est sporadiquement exposé au risque "*Listeria*"

avec les poissons fumés. De plus, dans notre étude, les produits ont été conservés dans des conditions de températures très stables (+8°C) et maîtrisées, ne reproduisant pas nécessairement celles d'un frigo ménager ouvert plusieurs fois dans la journée et pouvant avoir une incidence déterminante sur le niveau de contamination final du produit. Dans ce contexte, associé au fait que la France soit le premier producteur mondial dans ce secteur, il est étonnant de n'avoir pas identifié jusqu'à présent de cas groupés de listérioses reliés à la consommation de poissons fumés. Ce décalage apparent conforte l'idée que d'autres facteurs puissent interférer sur le développement de l'infection avec ce type de produit.

3 - Des types de *L. monocytogenes* non spécifiques de la filière poisson fumé

La prévalence significative en *L. monocytogenes* dans les poissons fumés n'ayant pas en apparence d'incidence en termes de listériose, il paraissait légitime de s'interroger sur la variabilité des souches et de leur virulence dans cette filière. En effet, l'hypothèse que cette classe de produits soit contaminée par un type particulier de *L. monocytogenes* pourrait reposer sur une origine commune des souches issues d'une niche écologique bien spécifique que constitue le milieu marin. Ce cas de figure implique que ce sont les matières premières qui véhiculent principalement l'entrée du pathogène sur les sites de production, comme l'a d'ailleurs suggéré Eklund *et al.* (1995) et n'est pas incompatible avec la présence de souches résidentes dans les ateliers de fumaison qui peut alors résulter de l'implantation d'une fraction de ces souches indigènes, initialement présentes sur les poissons et persistant par la suite dans l'environnement. D'autres éléments confortent également l'idée d'une population particulière de *L. monocytogenes* dans les produits de la mer. D'une part, peu d'épisodes de cas groupés de listériose incriminant cette catégorie de produits ont été rapportés dans la littérature et ces derniers n'ont impliqué qu'un nombre très limité de patients (tableau 55). D'autre part, les travaux de Estela *et al.* (1992) sur la caractérisation de souches isolées exclusivement des produits de la mer non transformés montraient une prédominance de profils lysotypiques, retrouvés quelque soit la nature du prélèvement ou son origine géographique.

Tableau 55 : Cas groupés de listériose invasive ayant incriminés des produits de la mer.

Pays	Année	Nombre de cas	Nature du produit	Référence
USA	1989	10	Crevettes	Riedo <i>et al.</i> 1994
Nouvelle Zélande	1992	2	Moules fumées	Brett <i>et al.</i> 1998
Suède	1994-95	9	Truite marinée	Ericsson <i>et al.</i> 1997
Canada	1996	2	Surimi aromatisé au crabe	Farber <i>et al.</i> 2000

Afin d'apprécier la diversité génétique des souches issues de cette filière et leur possible spécificité, la démarche mise en œuvre a consisté dans un premier temps à faire un état des lieux des génotypes détectés. Ce travail s'est traduit par la construction d'une base de données de profils génétiques obtenus par macrorestriction avec les enzymes *ApaI* et *AscI*. Dès la caractérisation des premiers isolats, des empreintes très similaires, ne différant que sur un nombre limité de fragments, ont fréquemment été identifiées. Dans cette situation, rassembler

au sein d'un même groupe génétique de tels profils dans le sens où ils représentent vraisemblablement un même type clonal se justifie pour plusieurs raisons. En premier lieu, les travaux de typage moléculaire, ont permis de démontrer que les populations de *L. monocytogenes* présentent une structure clonale comme également *Salmonella enterica* (Piffaretti *et al.* 1989, Rasmussen *et al.* 1995, Wiedman *et al.* 1997, Jinneman *et al.* 2001) par opposition à d'autres bactéries dites panmictiques comme les *Neisseria* ou les genres *Campylobacter*/*Helicobacter* (Picard *et al.* 1998, Dijkshoorn *et al.* 2000). En effet, les recombinaisons intraspécifiques ne semblent pas être des événements fréquents pour ce genre (Piffaretti *et al.* 1989). Vraisemblablement, la variabilité génomique des souches dans leur environnement naturel résulte alors essentiellement de "micro-évolutions" (Struelens *et al.* 1998), ayant lieu au cours de processus de colonisation ou d'adaptation à des niches écologiques ou par exemple en réponse à la présence d'agents antimicrobiens comme cela peut être le cas sur les sites de production alimentaire. Ceci rejoint l'idée qu'une souche bactérienne dans la nature est rarement "pure" (Dijkshoorn *et al.* 2000) et en conséquence le terme de clone en épidémiologie a évolué vers un concept plus large pour refléter un groupe de bactéries à l'intérieur d'une espèce qui présente un haut niveau de similarité provenant d'un ancêtre commun, ces similarités n'étant pas présentes chez les autres souches de l'espèce (Picard *et al.* 1998, Dijkshoorn *et al.* 2000). Le pouvoir résolutif de la macrorestriction permet de détecter ces micro-évolutions et se traduit sur les profils par des différences de 2 à 3 fragments résultant de la perte ou l'acquisition de sites de restrictions (Tenover *et al.* 1995). En final, la caractérisation des 308 souches du panel "produits de la pêche" a permis de distinguer 104 pulsotypes se répartissant dans 24 groupes génétiques. Dans la majorité des cas, ces groupes se sont caractérisés d'une part par la présence d'un profil prédominant, commun à plusieurs sites industriels, et d'autre part par l'identification de "variants génétiques" du "profil type", spécifiques d'un lieu de production donné (tableau 31, p 123). En effet, parmi les 104 pulsotypes identifiés, 75 % d'entre eux n'ont été détectés qu'une seule fois. Ce constat conduit inévitablement à se demander quel facteur induit ces micro-évolutions, si elles sont générées *in vitro* durant les procédures d'isolement ou bien *in situ*. En examinant la répartition spatiale de ces variants, il apparaît qu'à partir d'un même site, sont identifiés à la fois pour un groupe donné, le profil type et plusieurs variants génétiques uniques (tableau 32, p 126). A titre d'exemple, sur le site 6, les pulsotypes T2, T6a, T21 correspondent aux profils types alors que les versions T2b, T6o et T21a ne sont pas identifiées ailleurs. Dans certains cas, les variants ont été mis en évidence à partir d'un même prélèvement ou d'un même lot de produits analysés. Ces observations confirment que ces

variants génétiques dérivent bien d'un ancêtre commun à l'origine, identifié ici par les souches présentant des "profils types" et peuvent donc être reliés à une même lignée clonale désignée dans ce travail par les groupes génétiques. Peut-on alors parler d'une réelle diversité dans la mesure où parmi les 24 groupes génétiques définis, la moitié seulement sont identifiés régulièrement et sont retrouvés au moins dans 10 % des sites, 7 groupes sont isolés de façon nettement plus sporadiques et sont reliés à seulement 2-3 sites, enfin 5 groupes ne concernent qu'une seule souche. Avec la stratégie de récolte des isolats appliquée, il est difficile de procéder à des comparaisons avec d'autres études en raisonnant sur un nombre de souches caractérisées. Néanmoins, à partir des travaux de Chasseignaux (1999) et Kerouanton-Le Gall (1999) sur les filières volaille-porc en ateliers de transformation, il apparaît que l'examen de 5 sites de production génère respectivement 96 et 73 pulsotypes, soit une diversité beaucoup plus importante si ces résultats sont comparés aux 104 pulsotypes identifiés pour 40 sites industriels dans la filière produits de la pêche à dominance poissons fumés. En revanche, lorsque les filières sont étudiées plus en amont des sites de transformation, il semblerait que la diversité des souches prenne un caractère moins polymorphe. C'est le cas en abattoir de porc ou encore sur les sites de réception de lait frais dans les études respectives de Giovannacci *et al.* (1999) et Kerouanton-Le Gall (1999) pour lesquelles 5 et 3 sites examinés aboutissent à l'identification de 17 et 20 génotypes. Les auteurs soulignent la mise en évidence soit d'une lignée clonale prédominante avec un "profil type" rassemblant 65 % des souches (Type a1, Giovannacci *et al.* 1999), soit d'une fréquence singulière d'identification du sérotype 4b représenté par 50 % des souches récoltées dans le cas de la filière lait frais (Kerouanton-Le Gall, 1999). L'ensemble de ces observations suggère d'une part que la diversité des souches dans la filière produits de la pêche n'est pas si importante dans la mesure où ce sont fréquemment les mêmes groupes génétiques ou lignées clonales qui sont identifiés, et d'autre part que l'incidence des sites industriels sur la génération de variants génétiques n'est pas à exclure mais reste à confirmer. D'autres investigations avaient également mis en évidence la présence de souches de même type clonal sur un même lieu de production et précisément dans ce secteur d'activité (Boerlin *et al.* 1997, Johansson *et al.* 1999, Dauphin *et al.* 2001). Dans le cas des ateliers de fumaison, la présence de composés tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) formés lors de la combustion du bois peuvent potentiellement conduire à des conditions environnementales favorisant l'apparition de mutations. Le 3, 4-benzopyrène connu pour ses propriétés cancérigènes, dépasse rarement les 1 µg/kg dans les aliments et se situe autour de seulement 0,1 µg/kg en moyenne dans les saumons fumés suivant une récente étude française (CEVPM, 1998). Cette faible teneur sans incidence pour l'homme peut

toutefois avoir des répercussions significatives à l'échelle d'une bactérie, la plupart des cancérigènes chimiques étant mutagènes chez les bactéries (Devoret 1993). Les essais *in vitro* à partir du SOS spot test confortent cette idée en montrant qu'un extrait de fumée traditionnelle induit une réponse SOS dans le génome bactérien pour des concentrations en phénols habituellement observées dans les poissons fumés. La présence importante de variants génétiques pourrait constituer un aspect spécifique de la filière poisson fumé et ne relèverait donc pas d'un problème de méthodologies.

Une bonne corrélation entre le classement des souches par macrorestriction et par sérotypage a été mise en évidence. En effet, chaque groupe génétique se caractérise par un sérotype dominant et une correspondance particulièrement marquée avec les types flagellaires comme cela a déjà été rapporté au cours d'autres études (Brosch *et al.* 1994, Giovannacci *et al.* 1999, Autio *et al.* 2002). D'autre part, il est intéressant de noter qu'à partir des produits de la pêche, le sérotype 4b/e est représenté à hauteur de 9 % des souches environ. Ce score apparaissant comme non négligeable, lorsqu'il est comparé à celui des autres filières (autour de 4 % excepté celle associée au lait frais, Kerouanton-Le Gall 1999) ne résulte pas ici, d'un biais analytique lié à la stratégie de récolte des isolats. En effet, l'étude Européenne FAIR réalisée sur une période différente (96-99) confirme cette prévalence dans la filière en France, et en concordance avec la présente étude souligne que ce sérovar est détecté en seconde position après les 1/2a (tableau 35, p 129).

L'analyse statistique de la répartition des groupes génétiques fait clairement apparaître que le saumon et le hareng ne sont pas contaminés par les mêmes types de *L. monocytogenes*. De plus, les groupes associés au saumon sont communément retrouvés dans divers secteurs de l'agro-alimentaire alors que ceux associés au hareng sont plus rarement identifiés et présentent alors une certaine spécificité. A notre connaissance, ce constat n'avait jamais été rapporté jusqu'alors au cours d'études similaires sur le poisson, le hareng ayant fait l'objet de très peu d'investigations. Tous les saumons utilisés en matières premières au cours de cette étude proviennent d'élevages en fermes marines dans lesquelles les poissons sont d'abord maintenus en cuves d'alevinage pour être ensuite "parqués" dans des cages flottantes en mer dans des baies abritées. *A contrario*, le hareng représente une espèce pélagique et migratrice, qui parcourt au cours d'une année de grandes distances dans son aire de répartition et est pêché au large des côtes à l'état sauvage. Le décalage apparent des types de *L. monocytogenes* identifiés entre les deux espèces de poisson pourrait donc être lié à la domestication, l'homme

représentant alors le principal vecteur de dissémination spatio-temporelle des clones et de la contamination d'une façon générale. En parallèle, l'idée d'un possible caractère indigène et spécifique des souches isolées du hareng se dessine également au niveau de la virulence des souches. En effet, toutes celles isolées de saumon ne présentent pas de particularité à ce niveau alors que pour le hareng, un des groupes génétiques le plus significativement associé et régulièrement isolé de cette espèce se caractérise par une hypovirulence observée à la fois *in vitro* et *in vivo* (sur souris immunocompétentes). Il est intéressant de noter que parmi les huit souches testées, toutes répertoriées dans ce groupe génétique noté 10, une seule est apparue comme virulente alors que les autres ont affiché dans le test *in vitro* un même profil de réponse se traduisant par l'observation singulière de trous sur le tapis cellulaire au lieu de plages de lyse. Ce trait phénotypique homogène entre ces souches génétiquement très proches en macrorestriction conforte l'idée de leur appartenance à une même lignée clonale. L'identification de souches isolées de poisson présentant une virulence atténuée a été également rapporté lors d'investigations assez récentes. Ce sont en premier lieu, les travaux de Strom (1998) qui attirent l'attention sur une souche de *L. monocytogenes* provenant d'un prélèvement de saumon fumé et initialement identifiée *L. innocua* en raison de son caractère non hémolytique. Cette dernière s'avère avirulente sur tests souris en raison d'une délétion sur la séquence en acides aminés de la listériolysine. Puis, une étude sur des poissons élevés en eau douce (poisson chat) révèle la présence de 2 souches appartenant au séro groupe 4 avirulentes également sur tests souris (Erdenlig *et al.* 2000). Enfin, Norton *et al.* (2001) s'intéressent plus précisément aux souches de la filière poisson fumé et identifient 3 ribogroupes sur les 18 au total comme avirulents dans les tests *in vitro* avec deux lignées cellulaires différentes (humaine et animale). Néanmoins, la détection de souches hypovirulentes reste un événement dispersé et ne semble pas être spécifique du poisson. En effet, à partir de tests sur souris ou d'œufs embryonnés, environ 8 % des panels étudiés affichent une déficience sur ce point (Norrung *et al.* 2000, Roche *et al.* 2001) mais aucune corrélation entre les niveaux de virulence détectés et l'origine des souches n'a véritablement été mis en évidence jusqu'à présent (Brosch *et al.* 1993). En parallèle, les milieux d'isolements ayant une incidence sur le taux de récupération de souches hypovirulentes (Gracieux *et al.* sous presse), il est possible que la situation actuelle ne reflète pas une réalité en raison de biais analytiques.

Sur un autre plan, des profils génétiques de souches cliniques ont été identifiés dans la base de données d'empreintes génétiques "produits de la pêche". Au total, 8,6 % des pulsotypes

(définis par la combinaison *ApaI/AscI*) sont communs (strictement identiques) au panel de souches cliniques. Ces dernières, dans leur ensemble, apparaissent très similaires aux souches "poisson" et se classent dans 10 groupes génétiques pré-définis suggérant là encore que la filière ne se caractérise pas par des types de *L. monocytogenes* spécifiques et/ou rarissimes. En particulier, l'empreinte associée au type clonal dénommé "yellow clone" a été mis en évidence à 3 reprises. Ce clone épidémique, à l'origine d'au moins 4 épisodes majeurs de listériose (Tham *et al.* 2000) et également très proche du clone incriminé en France en 1992 a suscité beaucoup d'intérêt quant à sa caractérisation. Il se distingue en premier lieu par son appartenance au sérotype 4b et au lysotype 2389:2425:3274:2671:47:108:340. En complément, les travaux de Buchrieser *et al.* (1993) montrent qu'en particulier cette combinaison lysotypique est fortement associée à une unique combinaison d'empreintes en macrorestriction (avec 3 enzymes) ce qui n'est pas le cas pour d'autres lysotypes (Jacquet *et al.* 1995). Par ailleurs, une équipe américaine a plus particulièrement cherché à mettre en évidence d'autres marqueurs moléculaires pour distinguer ce clone et a démontré qu'il présentait d'une part un polymorphisme de restriction spécifique dans une région génomique comprenant des gènes essentiels pour la croissance à basse température (Zheng *et al.* 1995), et que d'autre part, les souches associées à cette lignée présentaient de façon singulière un système de restriction modification sur les sites GATC de leurs génomes (Zheng *et al.* 1997). Cette dernière particularité est effectivement retrouvée de façon exclusive dans les groupes génétiques notés 19 et 24 associés au yellow clone et rassemblant 46 % des souches cliniques étudiées dans ce travail et 2,6 % des souches du panel "produits de la pêche". Là encore, l'ensemble de ces caractéristiques (sérotype, pulsotype, méthylation des cytosines sur les sites *Sau3AI*) souligne l'appartenance de ces souches à une même branche clonale. L'identification du yellow clone dans les poissons fumés a été également rapportée dans d'autres travaux (Boerlin *et al.* 1997, Tham *et al.* 2000, Norton *et al.* 2001) et confirme donc avec les présents résultats qu'il existe bien un risque potentiel avec cette catégorie de produits.

En final, les résultats de caractérisation moléculaire nous renseignent sur la structure génétique des populations de *L. monocytogenes*. La hiérarchisation des pulsotypes suivant leur degré de similarité fait apparaître 3 clusters significativement corrélés aux sérotypes des souches et subdivisent l'espèce en deux branches phylogénétiques comme bon nombre de travaux sur la caractérisation moléculaire l'ont déjà mis en évidence (Vines *et al.* 1992, Brosch *et al.* 1994, Aarts *et al.* 1999). En effet, les clusters A et B rassemblent toutes les souches de sérotypes 1/2a, 1/2c et 3a (division I), le cluster C (division II) contient d'une part

les sérotypes 4b et d'autre part les souches 1/2b et 3b (figure 28, p 147). L'ensemble des profils appartenant à la deuxième division apparaissent entre eux plus homogènes que ne le sont ceux de la division I. Ce trait particulier vient d'être confirmé en combinant les empreintes obtenues par RAPD et polymorphisme de restriction au niveau des régions codant pour les ARN ribosomiques (Mereghetti *et al.* 2002). L'auteur suggère qu'en terme d'évolution il est possible que la division II composée de sous-groupes distincts dérive en fait d'un ancêtre commun issu de la première.

L'ensemble de ce travail ne conforte donc pas l'idée que les poissons fumés soient contaminés par un type particulier de souches même si l'espèce hareng semble présenter une certaine spécificité. Cette distribution homogène des souches de *L. monocytogenes* est sans doute à relier au caractère ubiquitaire de ce pathogène et se confirme avec deux autres études récemment publiées aboutissant également à cette même conclusion (Autio *et al.* 2002, Jaradat *et al.* 2002). Néanmoins, une exception mérite d'être soulignée et concerne le groupe génétique 2, régulièrement identifié (commun à 6 sites) et exclusivement retrouvé à partir des produits de la mer. Les travaux de Autio *et al.* (2002) mettent également en évidence 6 pulsotypes retrouvés dans des pays différents et spécifiques du poisson ou de l'environnement aquatique en particulier. L'identification de ces clones singulièrement associés à une niche écologique précise présente un intérêt certain en épidémiologie. Dans le cas présent, cette information permet de relier clairement le "clone résident" du site E2 associé au pulsotype T2 à l'entrée de la matière première dans les locaux. Ainsi l'incidence de cette dernière sur la contamination de la production n'est pas négligeable même si *à priori* l'impact ne se manifeste pas de façon directe.

En conclusion, le décalage apparent entre la prévalence significative des *L. monocytogenes* dans les poissons fumés et la faible incidence générée en terme de listériose ne peut pas s'expliquer par la présence dans les produits de souches différentes de celles isolées dans les autres filières même si les types associés au hareng présentent une certaine spécificité. En conséquence, les travaux s'orientant sur la recherche d'un possible effet matrice modifiant l'expression de la virulence trouvent ici tout leur intérêt pour apporter d'autres éléments de réponse sur "le risque *Listeria*" dans cette filière.

4 - Une possible incidence de la matrice poisson fumé sur l'expression de la virulence

En dépit d'une fréquence relativement importante d'exposition de l'homme à *L. monocytogenes*, notamment en raison du caractère ubiquitaire de la bactérie, la listériose demeure une maladie rare. Ce décalage apparent entre la prévalence du pathogène et sa faible incidence en terme de listériose s'illustre particulièrement bien avec la filière des poissons fumés et a effectivement motivé de façon évidente certains travaux (Boerlin *et al.* 1997, Norton *et al.* 2001a). A partir des réflexions engagées sur l'analyse quantitative du risque présenté par *L. monocytogenes* dans ce type de produits, "prêts à consommer", quelques points forts semblent se dégager sur les facteurs susceptibles de moduler la loi dose-réponse (Rapport FAO 2001). En schématisant, le développement de l'infection va essentiellement dépendre des caractéristiques de la souche, notamment de son potentiel de virulence, de la composition du bol alimentaire durant le transit intestinal et des réactions de défense de l'hôte liées à son état initial de santé, son statut immunologique ou son état de grossesse pour les femmes (Buchanan *et al.* 2000, Rapport FAO 2001). Concernant les propriétés intrinsèques des souches, la plupart des études de caractérisation *in vitro* ou *in vivo* détectent effectivement des différences de la virulence (Brosch *et al.* 1993, Van Longendonck *et al.* 1998, Roche *et al.* 2001). Cette variabilité n'est actuellement reliée ni à une niche écologique particulière, ni à un marqueur moléculaire permettant de faire la distinction entre les types virulents et hypovirulents (Brosch *et al.* 1993, Wiedman *et al.* 1997, Norrung *et al.* 2000) et n'est pas nécessairement transposable à la pathologie humaine. En parallèle, l'aliment a été habituellement considéré comme un véhicule neutre, sans véritable impact sur l'expression de la virulence et de ce fait très peu de données existent sur l'appréciation d'un possible effet de la matrice sur le pouvoir pathogène des souches (Buchanan *et al.* 2000, Rapport FAO 2001). Toutefois, Brackett *et al.* (1990) s'étonnant de la faible incidence des produits de la mer sur les cas de listériose, s'étaient intéressés à la question en contaminant artificiellement de la chair de crabe et en recherchant une possible modification de la virulence après différents temps de stockage du produit à + 5°C et + 10°C mais aucun effet mesurable de la matrice ou des conditions d'incubation n'avait été mis en évidence. En revanche, lors d'une investigation sur des cas groupés de listériose incriminant vraisemblablement des crevettes, Riedo *et al.* (1994) remarquent une association significative entre la consommation d'alcool au cours du repas et une diminution du risque de développer la maladie. Cette observation pour le moins surprenante conforte l'idée que l'incidence du bol alimentaire n'est pas neutre dans la loi dose-réponse.

Face à la faible incidence apparente des poissons fumés sur les cas de listériose, l'hypothèse d'une possible influence de la matrice sur l'expression de la virulence apparaît plausible au regard des caractéristiques physico-chimiques de ce type de produit. Le salage, le séchage, et le fumage constituent les trois traitements essentiels de la matière première qui confèrent au produit sa couleur, ses propriétés organoleptiques et ses qualités de conservation (associées à l'emballage sous vide et à la chaîne du froid). L'action combinée de la distillation et de la combustion de bois dur, essentiellement du hêtre en France, produit un mélange complexe d'au moins 300 composés chimiques contenus dans la fumée. Parmi ces derniers, figurent essentiellement des dérivés phénoliques, des composés carbonyles, des alcools, des acides et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Malle, 1980). L'action antiseptique de la fumée a été démontrée expérimentalement (Malle *et al.* 1981a) L'intensité du fumage est habituellement appréciée par le taux de phénols, en moyenne 4 fois plus important pour le hareng fumé que pour le saumon fumé (CEVPM, 1998), qui serait essentiellement à l'origine des propriétés bactériostatiques du procédé (Sunen *et al.* 1998). Les travaux de Faith *et al.* (1992) montrent que parmi les composés de la fraction phénolique, l'isoeugénol est potentiellement listéricide surtout en présence d'acide acétique ou citrique. Toutefois, le pathogène n'est pas complètement inhibé avec les conditions de fumage classiquement appliquées et de surcroît, une réduction de l'activité bactériostatique de la fumée s'opère en présence de fonction amines libres, au fur et à mesure du processus d'altération du tissu musculaire (Malle *et al.* 1981b). Nos résultats montrent cependant une différence significative entre la croissance sur saumon cru et fumé à + 8°C et pour de très faibles niveaux de contamination, proches des conditions de "terrain". Les trois souches de *L. monocytogenes* testées se comportent de façon similaire et se développent globalement 2 fois plus vite en matrice crue qu'en matrice fumée. Ce constat rejoint également l'hypothèse formulée précédemment selon laquelle les différents types de *L. monocytogenes* (pulsotypes, sérotypes) ne présenteraient pas de variabilité au niveau de la sensibilité vis à vis du fumage. Sur un autre plan, en utilisant le test de mutation réverse avec *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium, mis au point par Ames, les composés de la fumée se caractérisent par des propriétés mutagènes plus ou moins importantes suivant les conditions de pyrolyse appliquées (notamment la température) et l'essence de bois utilisée (Asita *et al.* 1991). La fraction contenant les hydrocarbures aromatiques polycycliques est majoritairement à l'origine de cet effet mutagène alors que la fraction phénolique semble complètement neutre à ce niveau (Pool *et al.* 1982). Nos résultats montrent, en utilisant le SOS chromotest dans sa version qualitative, que de l'extrait de fumée de bois de hêtre peut potentiellement induire le système

SOS bactérien. Ce mécanisme de réparation de l'ADN, orchestré par une hiérarchie de régulation, met en œuvre des processus de réparation, de recombinaison et aboutit en ultime recours à une mutagenèse. Par conséquent, l'ensemble de ces données associées à nos résultats, montre que la matrice poisson fumé n'est pas un véhicule neutre pour *L. monocytogenes* et influence de façon sensible le phénotype soit par un effet toxique, soit en perturbant les systèmes de régulation.

Afin de vérifier si cette matrice poisson fumé pouvait être également à l'origine d'une virulence atténuée des souches, la démarche choisie a été d'utiliser comme outil d'appréciation, des tests en culture cellulaire. Ces derniers offrent l'avantage de pouvoir quantifier la capacité des souches à former des plages de lyse sur un tapis cellulaire confluent. Chronologiquement, les premières expérimentations ont été réalisées à partir de souches préalablement cultivées pendant 8-14 jours en poisson cru et fumé. D'autres matrices alimentaires ayant été impliquées dans des épisodes épidémiques comme le lait et les rillettes ont été contaminées en parallèle afin de pouvoir procéder à des comparaisons. Cependant, plusieurs problèmes de méthodologie perturbant la lecture et l'interprétation des résultats sont alors apparus. En premier lieu, le choix des souches a constitué un point critique d'importance. La souche "terrain", isolée en atelier de fumaison lors des suivis de fabrication sur le site E2 ne semblait pas à posteriori représentative de la filière. En effet, suite à l'analyse des profils génétiques et des comparaisons inter-filières, le pulsotype T1 est apparu nettement détaché du reste de la collection de souches isolées des produits de la pêche (figure 28, p 147) et a été identifié dans 2 autres secteurs de l'agroalimentaire (tableau 40, p 139). En parallèle, la souche CIP103322, dérivant de la lignée du "yellow clone" a été isolée depuis plus de 10 ans. Il est possible que les multiples repiquages *in vitro* puissent avoir une incidence sur le phénotype notamment au niveau du potentiel d'adaptation aux conditions environnementales. Cette dernière hypothèse pourrait également expliquer le faible niveau de virulence relevé *in vitro* de la souche DHN12, isolée en 1980 lors de l'épisode épidémique au Canada (tableau 36, p 131). Il est donc important de travailler avec des souches fraîchement isolées, dont les conditions de conservation garantissent un nombre limité de sub-cultures, ces dernières pouvant de toute évidence être à l'origine d'une modification du pulsotype (Brosch *et al.* 1996) et/ou du phénotype comme cela a déjà été décrit avec la souche EGD (Brehm *et al.* 1999). Au fil des expérimentations, les résultats ont suggéré que le saumon broyé en suspension au 1/10 induisait une variabilité certaine, notamment au niveau des écarts relevés entre les niveaux de virulence des séries en saumon cru et fumé. La présence de fibres

musculaires sur le tapis cellulaire lors de l'étape d'infection a vraisemblablement induit un biais analytique en réduisant plus ou moins les surfaces de contact entre les cellules HT-29 et les bactéries. Pour contourner ce problème, le protocole optimisé utilise des filtrats de matrices broyées après addition d'eau peptonée tamponnée. Enfin, la démarche initiale visait à mettre en évidence une possible atténuation du niveau de virulence par les composés de la fumée en incubant en parallèle les bactéries dans le même poisson avant et après transformation. Dans ce schéma, la matrice crue servait en quelque sorte de témoin négatif puisque *a priori* nous ne la pensions pas susceptible de modifier le niveau de virulence détecté *in vitro*. En fait, les expérimentations montrent que des composés dans le saumon cru affectent les résultats en agissant aussi bien au niveau du tapis cellulaire que des bactéries (figure 37, p 169). L'origine de ce phénomène n'est pas élucidé mais il semblerait que le fumage annule cet effet sur les cellules.

En revanche, les résultats montrent que les composés de la fumée n'agissent que sur les bactéries et modifient le niveau de virulence détecté *in vitro* en l'abaissant significativement. En premier lieu, cet effet se caractérise par son aspect rapidement réversible. En effet, dès que les bactéries ne sont plus en contact direct avec la matrice ou que cette dernière est trop diluée le potentiel de virulence est totalement exprimé ou tout au moins n'est pas altéré de façon remarquable. L'hypothèse selon laquelle la multiplication des bactéries en matrice alimentaire ou sur support inerte dans l'environnement serait à l'origine d'une atténuation durable du pouvoir pathogène a été cependant récemment suggéré (Norrung *et al.* 2000, Norton *et al.* 2001). Ce phénomène pourrait expliquer selon les auteurs, le décalage apparent entre la fréquence d'isolement de certains types génétiques (ribotypes ou types électrophorétiques) communément retrouvés dans la filière alimentaire, au niveau de l'environnement ou des produits finis et le fait qu'ils ne soient pas identifiés ou peu représentés parmi les souches cliniques d'origine humaine ou animale. Par ailleurs, l'accroissement du pouvoir pathogène suite à une multiplication de *L. monocytogenes* dans un être vivant apparaît plausible en se référant aux travaux de Vahidy *et al.* sur le lapin (1996). Dans cette série d'expérimentations, des variants d'une souche de sérotype 1/2a ont été générés après plusieurs cycles d'infection chez les animaux. Le niveau de virulence pour le lapin, apprécié par dénombrement du pathogène dans les organes infectés (foie, rate, cerveau), a augmenté progressivement et significativement au cours des 6 passages successifs sur les animaux. La colonisation de plus en plus rapide des organes aboutissant à une infection de plus en plus sévère n'a pas pu être corrélée avec un phénotype particulier en caractérisant *in vitro* les variants (activité de la

lécithinase, de la listériolysine, niveau de synthèse de protéines extracellulaires). Nos résultats ne confortent pas l'idée d'une atténuation de la virulence par une incubation prolongée dans la matrice saumon fumé. Néanmoins, en raisonnant sur un nombre de générations comparable à celui obtenu par passage dans l'animal en 48 h, 8 à 15 jours de stockage à +8°C dans le produit ne permettent pas vraiment de tirer de conclusions.

La matrice poisson fumé semble avoir une incidence effective sur l'expression de la virulence *in vitro* lorsque les bactéries sont directement en contact durant la phase d'infection avec les composés extraits. L'effet observé est même accentué lorsque le filtrat de saumon fumé est davantage concentré (figure 37, p 169). Ces résultats suggèrent la présence de molécules vraisemblablement amenées par la fumée qui pourraient être à l'origine de cette modification du phénotype. Les modes d'action pouvant alors être envisagés ciblent la phase d'entrée dans les cellules puisque à l'issue de cette étape, les bactéries échappent à toute incidence de la matrice. En premier lieu, on peut se demander si les composés de la fumée qui sont de nature très complexe peuvent être à l'origine d'une altération de l'enveloppe bactérienne. Outre son rôle de barrière avec le milieu extérieur, de multiples fonctions lui sont associées dont la plupart sont essentielles à la viabilité de la bactérie. D'autre part, l'enveloppe constitue également un site d'attachement des protéines de surface interagissant avec l'environnement. Une diminution du pouvoir invasif pourrait alors être consécutive à une modification globale avec un effet soit sur les gènes, soit directement sur les enzymes entraînant par exemple une mauvaise présentation des molécules à la périphérie du pathogène. Cependant, cette première hypothèse n'est pas entièrement compatible avec le fait que le phénomène soit complètement réversible et de façon très rapide. Il est alors davantage probable que les molécules agissent plus spécifiquement sur les systèmes de régulation des gènes impliqués dans la virulence. Plusieurs éléments rapportés dans la littérature semblent conforter cette idée. En premier lieu, des molécules comme le cellobiose, l'arbutine et la salicine, spécifiques du règne végétal et abondantes dans le milieu extérieur, sont à l'origine de la répression des facteurs de virulence (Park *et al.* 1993, Park 1994, Brehm *et al.* 1999). Le signal environnemental serait perçu au niveau de la bactérie par un système de transduction à deux composants dont la fonction "capteur" serait assurée par le produit d'un gène sur le locus *bvr* (Brehm *et al.* 1999). Le cellobiose dérive de la dégradation de la cellulose, un des trois constituants essentiels du bois (avec l'hémicellulose et la lignine); et l'arbutine est un β -glucoside phénolique, non volatil, présent dans les feuilles de bon nombre de plantes (notamment celles du tabac) et retrouvé entre autres dans la fumée de cigarette (Deisinger *et al.* 1996). Les constituants de la fumée proviennent de la décomposition thermique des composés du bois précédemment cités, suivis

d'une oxydation des produits résultant de cette décomposition. Ces derniers se répartissent alors entre les deux phases de l'aérosol à savoir la phase "particules" dispersée et la phase gazeuse dispersante formée par la vapeur (Malle, 1980). Dans ces conditions, il n'est pas exclu qu'effectivement certaines molécules apportées par le procédé du fumage présentent une certaine similitude avec celles issues de la dégradation des végétaux et soient captées par un système de transduction à l'origine de la répression des gènes de virulence. D'autres molécules pourraient également jouer un rôle dans l'atténuation du pouvoir pathogène détecté dans le test de plages de lyse. Une étude récente montre que les constituants des huiles essentielles ont un impact significatif *in vitro* sur la synthèse de la lystériolysine ou sur l'activité de la lécithinase (Smith-Palmer *et al.* 2002). L'extrait de clous de girofle inhibe à la fois la production de ces deux enzymes ce qui suggère une possible action au niveau du système de régulation. Les huiles essentielles sont extraites des végétaux par entraînement à la vapeur et sont constituées d'un mélange complexe de composés chimiques tels que des terpènes, des esters, des aldéhydes, des cétones, des alcools et des phénols. Parmi ces derniers, certains sont communs avec les composés présents dans la fumée de bois tels que l'eugénol, déjà caractérisé par ses propriétés potentiellement listéricides (Faith *et al.* 1992, Blaszyk *et al.* 1998).

L'objectif de ce travail était de vérifier si la matrice poisson fumé avait ou non une possible incidence sur l'expression de la virulence de *L. monocytogenes*. La difficulté première était de définir les moyens et un protocole pour mettre en évidence une possible atténuation du pouvoir pathogène par le produit. Le test de plages de lyse offre l'avantage de pouvoir apprécier un niveau de virulence et constitue un bon outil pour ce type d'investigation sous réserve d'utiliser la matrice sous une forme ne perturbant pas physiquement le contact des cellules avec les bactéries. L'utilisation de filtrats semble constituer une bonne solution pour remédier à ce problème technique. Les résultats suggèrent qu'effectivement les composés de la fumée peuvent potentiellement altérer la phase d'entrée des bactéries dans les cellules, ce qui conforte l'idée que le poisson fumé n'est pas un véhicule neutre dans l'expression de la virulence. La matrice alimentaire semble assurément jouer un rôle dans la loi dose réponse et l'ensemble de ce travail représente une base qui justifie la mise en œuvre d'autres investigations, particulièrement dans le secteur des poissons fumés. Il serait intéressant d'identifier plus précisément les molécules à l'origine de cette atténuation apparente du niveau de virulence et d'évaluer dans quelle mesure ce phénomène est transposable lors de l'ingestion des aliments.

5- Perspectives

Les données recueillies au cours de ces travaux de recherche, et notamment durant la phase de récolte des isolats de *L. monocytogenes*, soulignent en premier lieu la présence significative du pathogène dans la filière que ce soit au niveau des produits finis ou de l'environnement des ateliers de production. L'étude fait ressortir pour ce secteur d'activité le problème majeur que représente l'établissement et la persistance de certains clones sur les lignes de fabrication. L'état des lieux des génotypes indique sur ce point une diversité génétique peu importante parmi les souches isolées des produits de la pêche et suggère que ce sont fréquemment les mêmes types qui sont à l'origine des contaminations. Par exemple les pulsotypes associés au groupe génétique 6 ont été identifiés sur 50 % des sites examinés et apparaissent également majoritaires dans la filière porc. D'autres en revanche, comme le groupe génétique 2 régulièrement détectés dans les produits transformés semblent spécifiques d'une origine marine. La caractérisation de ces différentes lignées clonales au niveau des propriétés d'adhérence, de leur aptitude à former des biofilms ou vis-à-vis de leur sensibilité aux ammoniums quaternaires serait susceptible d'apporter de nouveaux éléments pour développer des moyens de lutte plus efficaces et mieux maîtriser ce phénomène de colonisation des sites. Par ailleurs, l'entrée du pathogène dans les locaux *via* la matière première doit être mieux contrôlée car l'impact sur la contamination des produits finis est important même s'il n'est pas perçu de façon directe (contaminations par des clones résidents véhiculés à l'origine par les matières premières). Sur ce point, le manque de méthodologies et d'outils performants pour l'appréciation de la qualité des matières premières est flagrant. De plus, le saumon et le hareng sont des espèces importées de pays nordiques et une harmonisation des méthodes au moins au niveau européen permettrait sans doute de faire progresser toute la filière dans ce domaine.

La construction de la base de données de profils génétiques, collectés à partir des *L. monocytogenes* isolés dans les produits de la pêche est évolutive et doit se poursuivre pour la filière. Elle représente en effet une source d'informations susceptible de pouvoir être utilisée dans l'avenir pour la caractérisation du risque notamment en reliant les génotypes à des phénotypes (virulence, adhésion, dynamique de croissance...). Les empreintes génétiques en macrorestriction ne sont pas des marqueurs moléculaires de pathogénicité, toutefois, le fait d'identifier des profils identiques à ceux de clones incriminés dans des cas cliniques et notamment épidémiques, suggère qu'il existe bien un risque potentiel. Les données pourraient

être exploitées à des fins d'épidémiologie-surveillance par de l'analyse en réseau de façon comparable au modèle américain PulseNet. En Europe, un programme de ce type nommé Lister-net débute cette année 2002 et est coordonné en France par l'InVS et le CNR de l'Institut Pasteur.

Les résultats sur l'étude d'un possible effet matrice sur l'expression de la virulence de *L. monocytogenes* ouvrent sans doute des perspectives plus novatrices. Les premières données indiquent qu'une atténuation du pouvoir pathogène semble s'opérer vraisemblablement sous l'action des composés de la fumée. Cette observation mérite d'être approfondie et complétée notamment sur l'axe de la variabilité des réponses en fonction des souches. En effet, nous avons choisi de tester un sérotype 4b, présentant un profil en macrorestriction strictement identique à celui du yellow clone et isolé récemment d'un poisson fumé mais il est nécessaire de vérifier si le phénotype induit reflète un phénomène indépendant ou non des caractéristiques de la souche. L'impact d'une incubation prolongée en matrice poisson fumé reste également à déterminer de façon plus précise. Les expérimentations pourraient être mises en œuvre avec au départ, une même souche de *L. monocytogenes* cultivée en parallèle sur matrice alimentaire et sur cellules d'origine humaine *in vitro*. Les comparaisons pourraient alors être réalisées sur la base d'un nombre de génération similaire pour apprécier si la croissance en milieu inerte sur du long terme diminue ou pas le potentiel de virulence.

Enfin, l'optimisation du protocole d'essai (utilisation de filtrats) pour apprécier l'incidence de la matrice sur le pouvoir pathogène *in vitro* offre maintenant la possibilité d'étendre le champs d'investigation. En effet, il serait intéressant de comparer l'effet induit avec des fumées produites à partir de différentes essences de bois. Actuellement, une tendance à la diversification semble se développer à ce niveau et des poissons fumés au bois de vigne ou de chêne font leur apparition de façon plus courante dans les linéaires de la grande distribution. Originellement utilisé pour la conservation, le procédé de fumage est actuellement surtout appliqué à des fins organoleptiques et est associé à des traitements de plus en plus allégés avec des taux de sel entre 2,5 et 3,5 % et en phénols inférieurs à 1 mg/100g (Leroi, 2000). L'ensemble de nos résultats repositionne le fumage à froid dans son intérêt premier et souligne qu'il constitue réellement une étape essentielle dans la maîtrise de la qualité des produits fumés. De surcroît, le procédé semble jouer un rôle fondamental de préservation pour la filière vis-à-vis du risque présenté par *L. monocytogenes*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹Aarts HJM, Hakemulder LE, Van Hoef AMA. (1999) Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 49 : 95-102.
- ²Aase B., Sundheim G., Langsrud S., Rorvik L.M. (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 62 : 57-63.
- ³Allerberger F, Dierich MD, Grundmann H, Hartung D, Bannerman E. Bille J. (1997) Typing of Austrian *Listeria monocytogenes* isolates by automated laser fluorescence analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Zbl. Bakt.* 286 : 33-40.
- ⁴Asita AO, Matsui M, Nohmi T, Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr, Sofuni T, Koyano M, Matsushita H. (1991) Mutagenicity of wood smoke condensates in the Salmonella/microsome assay. *Mutat. Res.* 264(1) : 7-14
- ⁵Audurier A., Berche P. (1989a) *Listeria*. Chap 41 in *Bactériologie médicale*. Le Minor L. et Véron Eds Flammarion. pp 844-859.
- ⁶Audurier A., Martin C. (1989b) Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 8 : 251-257.
- ⁷Aureli P., Fiorucci G.C., Caroli D., Marchiaro G., Novara O., Leone L., Salmaso S. (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342 : 1236-1241.
- ⁸Autio T., Hielm S., Miettinen M., Sjöberg A-M., Aarnisalo K., Björkroth J., Mattlila-Sandholm T., and H. Korkeala (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1):150-155.
- ⁹Autio T., Lunden J. Fredriksson-Ahomaa M., Björkroth J. Sjöberg A.M., Korkeala H. (2002) Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *Int. J. Food Microbiol.* 77 : 83-90.
- ¹⁰Avery S M, Bunic S, (1997) Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37°C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 34 : 319-327.
- ¹¹Bansal NS, McDonell FHL, Smith A, Arnold G, Ibrahim GF (1996) Multiplex assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 293-300.
- ¹²Balimandawa M, De Zutter L, Rollier I, Wauters G. (1994) Influence of the inoculum concentration on the recovery of *Listeria* From meat by L-Palcamy enrichment. *Int. J. Food Microbiol.* 23 : 227-230.
- ¹³**Bergey's manual of determinative bacteriology.** (1994) 9th edition. Holt J.G., Krieg N., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (eds). Williams and Wilkins, Baltimore, MD. Group 19, Regular, nonsporing Gram-positive rods. pp 565-567.

- ¹⁴**Beumer R.R., Te Giffel M.C., Spoorenberg E., Rombouts F.M.** (1996) *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiol. Infect.* 117: 437-442.
- ¹⁵**Bille J.** (1990) Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. *Foodborne Listeriosis*. Miller A.J., Smith J.L. and G.A. Somkuti (ed). Society for industrial Microbiology, Elsevier, NY : 71-74.
- ¹⁶**Blaszyk M, Holley RA.** (1998) Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 39(3) : 175-183.
- ¹⁷**Boerlin P., Boerlin-Petzold F., Bannerman E., Bille J., Jemmi T.** (1997) Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4) : 1338-1343.
- ¹⁸**Brackett R.E, Beuchat L.R.** (1990) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* grown on crabmeat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (5) : 1216-1220.
- ¹⁹**Braun L, Dramsi S, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G, Cossart P.** (1997) InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* 25(2):285-294
- ²⁰**Brehm K, Ripio MT, Kreft J, Vazquez-Boland JA.** (1999) The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J Bacteriol.* (16):5024-5032
- ²¹**Bremer P.J., Osborne C.M., Kemp R.A. and Smith J.J.** (1998) Survival of *Listeria monocytogenes* in sea water and effect of exposure on thermal resistance. *J. Appl. Microbiol.* 85: 545-553.
- ²²**Brett MS, Short P, McLauchlin J.** (1998) A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43(3) : 223-9
- ²³**Brissonnet F., Bouix M., Loiseau G., Russel A., Leveau J.Y.** (1994) Le stress bactérien et ses conséquences en génie de l'Hygiène. *Cahier Scientifique*. Vol n°111, IAA Mars, 106-114.
- ²⁴**Brosch R, Buchrieser C, Rocourt J.** (1991) Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.* 142(6) : 667-75
- ²⁵**Brosch R., Catimel B., Milon G., Buchrieser C., Vindel E. and Rocourt J.** (1993) Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J. Food Protection* : 56 :296-301.
- ²⁶**Brosch R, Chen J, Luchansky JB.** (1994) Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* (7):2584-92
- ²⁷**Brosch R. Brett M. Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyi B, Rocourt J.** (1996) Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. Food Microbiol.* 32 : 343-355.

- ²⁸**Bubert A., Sokolovic Z., Chun SK., Papatheodorou L., Simm A., Goebel W. (1999)** Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol. Gen. Genet.* 261 : 323-336.
- ²⁹**Buchanan R.L, Smith J.L., Long W. (2000)** Microbial risk assessment: dose-reponse relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 58 : 159-172.
- ³⁰**Buchrieser C, Brosch R, Rocourt J. (1991)** Use of pulsed field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragments of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroups 1/2 and 3. *Int. J Food Microbiol.* 14(3-4) : 297-304
- ³¹**Buchrieser C., Brosch R., Catimel B., Rocourt J. (1993)** Pulsed-field electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* 39 : 395-401.
- ³²**Burr M, Pepper IL. (1997)** Variability in presence-absence scoring of AP PCR fingerprints affects computer matching of bacterial isolates. *J. Microbiol. Methods* 29 : 63-68.
- ³³**Busch S, Donnelly CW. (1992)** Development of a repair-enrichment broth for the resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *listeria innocua*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1): 14-20.
- ³⁴**Capita R., Alonso-Calleja C., Mereghetti L., Moreno B., del Camino Garcia-Fernandez M. (2002)** Evaluation of the international phage typing set and some experimental phages for typing of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92 : 90-96.
- ³⁵**Carbonnelle B., Cottin J., Parvery F., Chambreuil G., Kouyoumd-Jian S., Le Lirzin M., Cordier G., Vincent F. (1978)** épidémie de listériose dans l'Ouest de la France (1975-1976). *Rev. Epidém. et Santé Publ.* 26 : 451-467.
- ³⁶**Catteau M. (1993).** Méthodes rapides en microbiologie alimentaire. 8^{ième} Colloque de la SFM des Aliments : Flashs sur les microorganismes pathogènes dans les aliments, 28-29 avril 1993. Institut Pasteur de Paris. Editions : SFM.
- ³⁷**Catteau M. (1998).** Cours de microbiologie, hygiène et sécurité des aliments. Le point sur les méthodes normalisées et les méthodes validées en microbiologie des aliments. 23-27 novembre 1998, Institut Pasteur Lille.
- ³⁸**Catteau M. (1999).** *Listeria monocytogenes* : un problème de méthode d'analyse ? *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*,14, (2), 99-101.
- ³⁹**Caugant D.A., Ashton F.E., Bibbs W.F., Boerlin P., Donachie W., Low C., Gilmour A., Harvey J., Norrung B. (1996)** Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates : results of an international comparative study. *Int. J. Food Microbiol.* 32 : 301-311.
- ⁴⁰**CEVPM. (1998)** Etude interne physico-chimiques des poissons fumés fabriqués en France. Boulogne sur mer.
- ⁴¹**Chakraborty T., Hain T., Domann E. (2000)** Genome organisation and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int. Med. Microbiol.* 290 : 167-174.

- ⁴²**Chasseignaux E.** (1999) Ecologie de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de transformation de viandes de volailles et de porc. Thèse Université Claude Bernard-Lyon I.
- ⁴³**Chasseignaux E, Toquin MT, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G.** (2001) Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J. Appl. Microbiol.*(5) : 888-899
- ⁴⁴**Coffey A., Rombouts F.M., Abee T.** (1996) Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4) : 1252-1256.
- ⁴⁵**Comi G, Cocolin L, Cantoni C, Manzano M.** (1997) A RE-PCR method to distinguish *Listeria monocytogenes* serovars. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18 : 99-104.
- ⁴⁶**Conte M.P., Longhi C., Petrone G., Poldoro M., Valenti P., Seganti L.** (1994) *Listeria monocytogenes* infection of Caco-2 cells : rôle of growth temperature. *Res Microbiol.* 145 : 677-682.
- ⁴⁷**Cortesi ML, Sarli T, Santoro A, Murru N, Pepe T.** (1997) Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 37 (2-3) : 209-14
- ⁴⁸**Cossart P, Lecuit M.** (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 15;17(14) : 3797-3806
- ⁴⁹**Cowart RE, Foster BG.** (1985) Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes* : minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect. Dis.* 151(4) : 721-730
- ⁵⁰**Curiale Ms., Lewus C.** (1994) Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Protection.* 57 : 1048-1051.
- ⁵¹**Dallas HL., Thomas DP, Hitchins A.** (1995) Virulence of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, and *Listeria innocua* assayed with in vitro Murine Macrophagocytosis. *J. Food Protect.* 59 : 24-27.
- ⁵²**Dallmier A.W., Martin S.E.** (1990) Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2807-2810.
- ⁵³**Dalton C.B., Austin C.C., Sobel J., Hayes P.S., Bibb W.F., Graves L.M., Swaminathan B., Proctor M.E., Griffin P.M.** (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *Engl. J. Med.* 336 : 100-105.
- ⁵⁴**Dauphin G, Ragimbeau C, Malle P.** (2001) Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* 64(1-2):51-61
- ⁵⁵**Dauphin G.** (1999). Voies de contamination du saumon fumé par *Listeria monocytogenes* en atelier de fumaison. DEA Ecologie Microbienne.

- ⁵⁶**Deisinger PJ, Hill TS, English JC** (1996) Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J. Toxicol. Environ. Health* 47(1) : 31-46
- ⁵⁷**De Valk H., Rocourt J., Lequerrec F., Jacquet Ch., Vaillant V., Portal H., Pierre O., Pierre V. Stainer F. Salvat G., Goulet V.** (2000a) Bouffée épidémique de listériose liée à la consommation de rillettes. France octobre-décembre 1999. Synthèse des données disponibles au 12/01/2000. *B.E.H.* 4/2000
- ⁵⁸**De Valk H., Goulet V.** (2000b) Cas groupés de Listériose liés à la consommation de langue de porc en gelée. France. Novembre 1999 – février 2000. Rapport InVS.
- ⁵⁹**De Valk H., Vaillant V., Jacquet Ch., Rocourt J., Le Querrec F., Stainer F., Quelquejeu N., Pierre O., Pierre V., Desenclos J-C., Goulet V.** (2001) Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, october 1999-february 2000. *Am. J. Epidemiol.* 154 (10) : 944-950.
- ⁶⁰**Devoret R.** (1993) Mécanisme de la mutagenèse SOS chez les bactéries. *Société Française de Génétique.* N°3, vol 9 : 1-7.
- ⁶¹**Dijkshoorn L., Ursing B.M., Ursing J.B.** (2000) Strain, clone and species : comments on three basic concepts of bacteriology. *J. Med. Microbiol.* 49 : 397-401.
- ⁶²**Djordjevic D., Wiedman M., McLandsborough L.A.** (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (6) : 2950-2958.
- ⁶³**Donnelly C.W.** (2001) *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutrition Reviews*, 59 (6) : 183-194.
- ⁶⁴**Eklund M.W., Poysky F.T., Paranjpye R.N., Lashbrook L.C., Peterson M.E., and G.A. Pelroy** (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J. Food Protection* 58:502-508.
- ⁶⁵**Embarek P.K.B.** (1994) Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 17-34.
- ⁶⁶**Embarek B.P.K., Hansen L. T., and H.H. Huss** (1997). Occurrence of *Listeria* spp in farmed salmon and during subsequent slaughter: comparison of Listertest Lift and the USDA method. *Food Microbiol.* 14:39-46.
- ⁶⁷**Erdenlig S., Ainsworth AJ., Austin FW.** (2000) Pathogenicity and production of virulence factors by *Listeria monocytogenes* isolates from channel catfish. *J. Food Protect.* 63 : 613-619.
- ⁶⁸**Ericsson H, Stalhandske P, Danielsson-Tham ML, Bannerman E, Bille J, Jacquet C, Rocourt J, Tham W.** (1995) Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (11) : 3872-3874.
- ⁶⁹**Ericsson H., Eklow A., Danielsson-Tham M.L., Loncaveric S., Mentzing L.O., Persson I., Unnerstad H., Tham W.** (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 35 (11) : 2904-2907.

- ⁷⁰**Ericsson H, Unnerstad H, Mattsson JG, Danielsson-Tham ML, Tham W.** (2000) Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of *inlB* gene. J. Med Microbiol. 49 : 73-80.
- ⁷¹**Estela L. A., Sofos J.N., Flores B.B.** (1992) Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes* cultures isolated from seafoods. J. Food Protect. 55 (1) : 13-17.
- ⁷²**Estela L. A., Sofos J.N.** (1993) Comparison of conventional and reversed phage typing procedures for identification of *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol. 59 (2) : 617-619.
- ⁷³**Euzéby J.P.** (2000) *Listeria*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/listeria.html>
- ⁷⁴**Faith N.G., Yousef A.E., Luschansky J.B.** (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. J. Food Safety 12: 303-314.
- ⁷⁵**Farber J.M., Peterkin P.I.** (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55 (3) : 476-511.
- ⁷⁶**Farber JM, Addison CJ.** (1994) RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. 77(3) : 242-50.
- ⁷⁷**Farber J.M., Daley E.M., Mackie M.T., Limerick B.** (2000) A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. Lett. Appl. Microbiol. 31 : 100-104.
- ⁷⁸**Finlay B.B.,** Cracking *Listeria*'s password. (2001) Science 292 : 1665-1667.
- ⁷⁹**Fisher C.W., Martin S.E.** (1999) Effects of iron and selenium on the production of catalase, superoxide dismutase, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 62 (10) : 1206-1209.
- ⁸⁰**Flanders KJ, Pritchard TJ, Donnelly CW.** (1995) Enhanced recovery of *Listeria* from dairy-plant processing environments through combined use of repair enrichment and selective enrichment/detection procedures. J. Food Protect. 58: 404-409.
- ⁸¹**Fleming D.W., Cochi S.L., MacDonald K.L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B.D., Holmes M.D., Audurier A., Broome C.V., Reingold A.L.** (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med. 3120 : 404-407.
- ⁸²**Flint S.H., Kells N.J.** (1996) The sub-typing of *Listeria monocytogenes* isolates from food, environments surrounding food manufacturing sites, and clinical samples in New Zealand using multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 31: 349-355.
- ⁸³**Fonnesbech Vogel B., Huss H.H., Ojeniyi B., Ahrens P. Gram L.** (2001) Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. Appl. Environ. Microbiol. 67(6): 2586-2595.
- ⁸⁴**Fraser J, Sperger W.** (1988). Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. J. Food Protection. 51 (10) : 762-765.
- ⁸⁵**Galdiero E., D'Isanto M., Aliberti F.** (1997) Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. Res. Microbiol. 148 : 305-313.

- ⁸⁶**Garcia J.A., Dominguez L., Briones V., Blanco M., Fernandez-Garayzabal J.F., Suarez G.** (1990) Revision of the antigenic structure of genus *Listeria*. FEMS Microbiol. Lett. 67 : 113-120.
- ⁸⁷**Gay M.** (1998). Incidence of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked fish and in smoking plant in France. ISOPOL XII. Juin 1998. Halifax, Canada.
- ⁸⁸**Gay M.** (1999). Contamination ways of cold-smoked fish with *Listeria monocytogenes*. IAMFES. 1-4 Août 1999. Detroit, USA.
- ⁸⁹**Gendel S.M., Ulaszek J.** (2000) Ribotype analysis of strain distribution in *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 63(2): 179-185.
- ⁹⁰**Gerner-Smidt P., Bruun B., Fussing V., Engberg J., Petersen A.M., Schiellerup J.** (2001) Listeriosis in Denmark 1998-2000, clinical and epidemiological aspects. . Proceeding ISOPOL XIV Mannheim, Germany : p161.
- ⁹¹**Giovannacci I., Ragimbeau C., Queguiner S., Salvat G., Vendevre JL., Carlier V., and G. Ermel.** (1999) *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. Int. J. Food Microbiol. 53 : 127-140.
- ⁹²**Glaser P. Frangeul L., Buchrieser C., Rusniok C., Amend A., Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T. et al.** (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. Science. 294 : 849-852.
- ⁹³**Goulet V., Jacquet Ch., Laurent E., Rocourt J., Vaillant V., de Valk H.** (2001) La surveillance de la Listériose humaine en France en 1999. B. E. H. n°34/2001 : 161-165.
- ⁹⁴**Goulet V, Jacquet C, Vaillant V, Rebiere I, Mouret E, Lorente C, Maillot E, Stainer F, Rocourt J.** (1995) Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. Lancet 17;345(8964) : 581-582.
- ⁹⁵**Goulet V., Rocourt J., Rebiere I, Jacquet Ch., Moyse C., Dehaumont P., Salvat G., Veit P.** (1998) Listeriosis outbreak associated with consumption of rillettes in France in 1993. J. Infect. Dis. 177 : 155-160.
- ⁹⁶**Gracieux P., Roche S.M., Pardon P. Velge P.** (sous presse) Hypovirulent *Listeria monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid L. mono media. Int. Food Microbiol.
- ⁹⁷**Graves L.M., Swaminathan B.** (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J Food Microbiol. 65: 55-62.
- ⁹⁸**Gutekunst KA.** (1992) DNA sequence heterogeneity in the gene encoding a 60-kilodalton extracellular protein of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. Can. J. Microbiol. 38 : 865-870.
- ⁹⁹**Guyer S, Jemmi T.** (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. Appl. Environ. Microbiol. 57(5):1523-7

- ¹⁰⁰**Heinitz M., Johnson J.** (1998) The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *J. Food Protect.* 61(3) : 318-323.
- ¹⁰¹**Herd M., Kocks C.** (2001) Gene fragments distinguishing an epidemic-associated strain from a virulent prototype strain of *Listeria monocytogenes* belong to a distinct functional subset of genes and partially cross-hybridize with other *Listeria* species. *Infect. Immun.* 69 (6) : 3972-3979.
- ¹⁰²**Herman LMF, De Ridder HFM, Geertrui M, Vlaemynck M.** (1995) A multiplex PCR method for the identification of *Listeria monocytogenes* in dairy samples. *J. Food Protect.* 58: 867-872.
- ¹⁰³**Hillier A.J., Davidson B.E.** (1995) Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Methods in molecular biology*, vol 46 : Diagnostic bacteriology protocols. Howard J., Whitcombe D.M. (Eds). Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp 149-163.
- ¹⁰⁴**Hof H.** (2001) *Listeria monocytogenes* : a causative agent of gastroenteritis? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20(6) : 369-73.
- ¹⁰⁵**Holah J.T., Taylor J.H., Dawson D.J., Hall K.E.** (2002) Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement.* 92 : 111S-120S.
- ¹⁰⁶**Ireton K, Cossart P.** (1997) Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu. Rev. Genet.* 31 : 113-138.
- ¹⁰⁷**Jacquet Ch. Catimel B., Brosch R., Buchrieser C., Dehaumont P., Goulet V., Lepoutre A., Veit P., Rocourt J.** (1995) Investigations related to the epidemic strain involved in the French Listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6) : 2242-2246.
- ¹⁰⁸**Jaradat Z.W., Schutze G.E., Bhunia A.K.** (2002) Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.* 76 : 1-10.
- ¹⁰⁹**Jemmi T.** (1993) *Listeria monocytogenes* in smoked fish: an overview. *Archiv. Fur Lebensmittelhygiene* 44 : 1-24.
- ¹¹⁰**Jinneman K.C., Hill W.E.** (2001) *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of listeriolysin gene. *Current Microbiol.* 43 : 129-133.
- ¹¹¹**Johansson T.** (1998) Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and Food-processing environments. *Int. J. Food Microbiol.* 40 : 77-85.
- ¹¹²**Johansson T., Rantala L., Palmu L. Honkanen-Buzalki T.** (1999) Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. *Int. J. of Food Microbiol.* 47. 111-119.
- ¹¹³**Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.-D., Sanders G., Banerjee S., Farber J.M.** (2001) Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *J. Appl. Microbiol.* 91 : 725-734.

- ¹¹⁴**Kerouanton-Le-Gall A.** (1999) Etude de la variabilité génétique des souches de *Listeria monocytogenes* en fonction de leur origine dans différentes filières de l'industrie agroalimentaire. Thèse Université de Bretagne Occidentale.
- ¹¹⁵**Kolstad J., Caugant D.A., Rorvik L.M.** (1992) Differentiation of *Listeria monocytogenes* isolates by using plasmid profiling and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 16 : 247-260.
- ¹¹⁶**Koplan JP** (1999) Statement of Jeffrey P. Koplan, MD, MPH, Director centers disease control and prevention, departement of health and human services before the committee on appropriations subcommittee on agriculture, rural development and related agencies.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/koplan-fin.htm>
- ¹¹⁷**Kreft J. Vazquez-Boland J.A.** (2001) Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. Med. Microbiol.* 291 : 145-157.
- ¹¹⁸**Larpent** (2000) : *Les Listeria*. Paris. Seconde édition. Lavoisier.
- ¹¹⁹**Lebrun M., Audurier A., Cossart P.** (1994) Plasmid-borne Cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917. *J. Bact.* 176(10) : 3049-3061.
- ¹²⁰**Leclerc H.** (1995) Les grands groupes de bactéries. Chap. VIII. Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Leclerc H., Gaillard J.L., Simonet M. (eds). Doin éditeurs-paris. 405-454.
- ¹²¹**Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P.** (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292(5522) : 1722-1725.
- ¹²²**Lei X.H., Fiedler F., Lan Z., Kathariou S.** (2001) A novel serotype-specific gene cassette (*gltA-gltB*) is required for expression of teichoic acid-associated surface antigens in *Listeria monocytogenes* of serotype 4b. *J. Bact.* 183 (4) : 1133-1139.
- ¹²³**Leimeister-Wachter M., Haffner C., Domann E., Goebel W.** (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 8336-8340.
- ¹²⁴**Leimeister-Wachter M., Domann E., Chakraborty T.** (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* 174 (3) : 947-952.
- ¹²⁵**Leroi F., Joffraud J.J.** (2000) Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. *J. Food Protect.* 63 (9) : 1222-1227.
- ¹²⁶**Lewis S. J. and Janet E.L. Corry.** (1991) Comparison of a cold enrichment and the FDA method for isolating *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from ready-to-eat food on retail sale in the U.K. *Int. J. Food Microbiol.* 12 : 281-286.

- ¹²⁷**Lingnau A., Domann E., Hudel M., Bock M., Nichterlein T., Wehland J., Chakraborty T.** (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun.* 63 (10) : 3896-3903.
- ¹²⁸**Linnan M.J., Mascola L., Lou X. D., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.W., Yonekura M.L., Hayes P., Weaver R., et al.** (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.* 319 : 823-828.
- ¹²⁹**Loncarevic S., Tham W. and Danielsson-Tham M.L.** (1996) The clones of *Listeria monocytogenes* detected depend on the method used. *Lett. Appl. Microbiol.* 22 : 381-384.
- ¹³⁰**Loncaveric S., Danielsson-Tham M.L., Gerner-Smidt P., Sahldröm L and W. Tham** (1998) Potential sources of human listeriosis in Sweden. *Food Microbiol.* 15 : 65-69.
- ¹³¹**Lyytikäinen O., Autio T., Majala R., Ruutu P., Honkanen-Buzalski T. Miettinen M., Hatakka M., Mikkola J., Anttila VJ., Johansson T., Rantala L., Aalto T., Korkeala H., Siitonen A.** (2000) An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J. Infect. Dis.* 181 (5) : 1838-1841.
- ¹³²**Malle P.** (1980) Le fumage a froid du saumon. Aspects microbiologiques. Thèse d'université des sciences et techniques de Lille.
- ¹³³**Malle P., EB P., Taillez R.** (1981a) Etude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur *Escherichia coli*. *Rev. Ind. Aliment. Agric.* 98 : 175-180.
- ¹³⁴**Malle P., EB P., Taillez R.** (1981b) Le fumage du saumon : influence de la qualité de la matière première sur l'action antiseptique de la fumée. *RTVA* 172 : 25-31.
- ¹³⁵**Marquet-van der mee N., Audurier A.** (1995) Proposals for optimization of the international phage typing system for *Listeria monocytogenes*: combined analysis of phage lytic spectrum and variability of typing results. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1) : 303-309.
- ¹³⁶**Maslow J.N., Slutsky A.M., Arbeit R.D.** (1993) Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications.* Perching, D.H. et al. (Eds) American Society for Microbiology, Washington, DC. pp 563-572.
- ¹³⁷**Mazurier SI, Audurier A, Marquet-Van der Mee N, Notermans S, Wernars K.** (1992) A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. *Res. Microbiol.* 143(5) : 507-12
- ¹³⁸**McCarthy S.** (1991) Pathogenicity of nonstressed, heat-stressed, and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells. *Appl. Environ.* 57(8) : 2389-2391.
- ¹³⁹**McLauchlin J., Crofts N., Campbell D.M.** (1989) A possible outbreak of listeriosis caused by an usual strain of *Listeria monocytogenes*. *J. Infect.* 18 : 179-187.
- ¹⁴⁰**McLauchlin J, Hall SM, Velani SK, Gilbert RJ.** (1991) Human listeriosis and pate: a possible association. *BMJ* 303(6805):773-5

- ¹⁴¹**McLauchlin J., Audurier A., Frommelt A., Gerner-Smidt P., Jacquet Ch., Loessner M.J., van der Mee-Marquet N., Rocourt J., Shah S., Wilhelms D.** (1996) WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. *Int. J. Food Microbiol.* 32 : 289-299.
- ¹⁴²**McLauchlin J., Hampton M.D., Shah S., Threlfall E.J., Wieneke A.A., Curtis G.D.W.** (1997) Subtyping of *Listeria monocytogenes* on the basis of plasmid profiles and arsenic and cadmium susceptibility. *J. Appl. Microbiol.* 83 : 381-388.
- ¹⁴³**Mereghetti L., Quentin R., Marquet-Van-Der Mee N., Audurier A.** (2000) Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (11) : 5083-5086.
- ¹⁴⁴**Mereghetti L., Lanotte P., Savoye-Marczuk V., Marquet-Van-Der Mee N., Audurier A., Quentin R.** (2002) Combined ribotyping and random multiprimer DNA analysis to probe the population structure of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (6) : 2849-2857.
- ¹⁴⁵**Miettinen M.K., Sittonen A., Heiskanen P., Haajanen H., Björkroth K., Korkeala J.** (1999) Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* 37(7) : 2358-2360.
- ¹⁴⁶**Michel E., Cossart P.** (1992) Physical map of the *Listeria monocytogenes* chromosome. *J. Bacteriol.* 174 (22) : 7098-103.
- ¹⁴⁷**Milohanic E., Pron B., Berche P., Gaillard JL.** (2000) Identification of new loci involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells. *European Listeria Genome Consortium. Microbiology* 146 (Pt 3):731-739.
- ¹⁴⁸**Nocera D., Bannerman E., Rocourt J., Jatou-Ogay K., Bille J.** (1990) Characterization by DNA restriction endonuclease analysis of *Listeria monocytogenes* strains related to the Swiss epidemic of listeriosis. *J. Clin. Microbiol.* 28 (10) : 2259-2263.
- ¹⁴⁹**Nørrung B., Skovgaard N.** (1993) Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (9) : 2817-2822.
- ¹⁵⁰**Nørrung B., Andersen J. K.** (2000) Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30 : 228-232
- ¹⁵¹**Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K., Wiedman M.** (2001a) Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from smoked fish industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2) : 646-653.
- ¹⁵²**Norton D.M., McCamey M.A., Gall K.L., Scarlett J.M., Boor K.J., Wiedmann M.** (2001b) Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 198-205.
- ¹⁵³**Norwood D.E., Gilmour A.** (2001) The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* 33 : 320-324.

- ¹⁵⁴**Park S.F., Kroll R.G.** (1993) Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 8 (4) : 653-661.
- ¹⁵⁵**Park S.F** (1994) The repression of listeriolysin O expression in *Listeria monocytogenes* by the phenolic beta-D-glucoside, arbutin. *Lett. Appl. Microbiol.* 19(4) : 258-60
- ¹⁵⁶**Paziak-Domanska B, Bogustawska E, Wieckowska-Szakiel M, Kotlowski R, Rozalska B, Chmiela M, Kur J, Dabrowski W, Rudnicka W.** (1999) Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiol.Lett.* 171: 209-214.
- ¹⁵⁷**Petran RL., Swanson K MJ,** (1993) Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Protection.* 56 (7) : 616-618.
- ¹⁵⁸**Picard B., Denamur E.** (1998) Diversité génomique des bactéries : intérêt phylogénétique et épidémiologique. *AAEIP 40^{ème} année N°157* : 121-123.
- ¹⁵⁹**Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschbacher M., Bille J., Bannerman E., Musser J. M., Selander R.K., Rocourt J.** (1989) Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3818-3822.
- ¹⁶⁰**Pool BL, Lin PZ.** (1982) Mutagenicity testing in the Salmonella typhimurium assay of phenolic compounds and phenolic fractions obtained from smokehouse smoke condensates. *Food Chem. Toxicol.* 20(4) : 383-391.
- ¹⁶¹**Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P.** (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60(4) : 263-267.
- ¹⁶²**Poyart C, Trieu-Cuot P, Berche P.** (1996) The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 142 (Pt 1) : 73-80
- ¹⁶³**Pritchard TJ, Donnelly CW.** (1999) Combined secondary enrichment of primary enrichment broths increases *Listeria* detection. *J. Food Protect.* 62 : 532-535.
- ¹⁶⁴**Promadej N., Fiedler F., Cossart P., Dramsi S., Kathariou S.** (1999) Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires *gtcA*, a novel, serogroup-specific gene. *J. Bacteriol.* 181 (2) : 418-425.
- ¹⁶⁵**Quillardet P, Hofnung M.** (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* 147(3) : 65-78
- ¹⁶⁶**Rasmussen O.F., Skouboe P., Dons L., Rossen L, Olsen J.E.** (1995) *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines : evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology.* 141 : 2053-2061.
- ¹⁶⁷**Rawles DD, Flick G, Diallo A., Croonenberghs R.** (1995) Growth of mixed cultures of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *J. Food Protection* 58 (11) 1268-1270.
- ¹⁶⁸**Rebière I, Goulet V.** (1993) La listériose : revue générale et référence à l'épidémie française de 1992. *La Lettre de l'infectiologie – Tome VIII, n°4* : 130-135.

- ¹⁶⁹**Renzone A., Klarsfeld A., Dramsi S., Cossart P.** (1997) Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* 65 (4) : 1515-1518.
- ¹⁷⁰**Renzone A., Cossart P., Dramsi S.** (1999) PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and eucaryotic cell extracts. *Mol. Microbiol.* 34 (3) : 552-561.
- ¹⁷¹**Riedo FX, Pinner RW, Tosca ML, Cartter ML, Graves LM, Reeves MW, Weaver RE, Plikaytis BD, Broome CV.** (1994) A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J. Infect. Dis.* 170(3) : 693-696.
- ¹⁷²**Ripabelli G. McLauchlin J., Threlfall EJ.** (2000) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *System. Appl. Microbiol.* 23 : 132-136.
- ¹⁷³**Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Suarez M., Brehm K., Berche P., Vazquez-Boland J.A.** (1996) Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the medium composition. *Res. Microbiol.* 147 : 371-384.
- ¹⁷⁴**Robbins JR, Barth AI, Marquis H, de Hostos EL, Nelson WJ, Theriot JA.** (1999) *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* 20;146(6) : 1333-1350.
- ¹⁷⁵**Roche SM, Velge P, Bottreau E, Durier C, Marquet-van der Mee N, Pardon P.** (2001) Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int J Food Microbiol* 2001 68(1-2) : 33-44
- ¹⁷⁶**Rocourt J., Audurier A., Courtieu A.L., Durst J., Ortel S., Schrettenbrunner A., Taylor A.G.** (1985) A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 259 : 489-497.
- ¹⁷⁷**Rocourt J.** (1996) Taxonomie du genre *Listeria* et typage de *L. monocytogenes*. *Path. Biol.* 44 (9) : 749-756.
- ¹⁷⁸**Rocourt J., Jacquet Ch.** (1999) La listériose humaine en France en 1997. Bulletin épidémiologique annuel. *Epidémiologie des maladies infectieuses en France. Situation en 1997 et tendances évolutives récentes.* Réseau National de Santé Publique, Saint Maurice, France : 85-86.
- ¹⁷⁹**Rocourt J., Jacquet Ch.** (2000) *Listeria* et listériose. Précis de bactériologie clinique. Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. (eds). Edition Eska 2000, pp. 943-956.
- ¹⁸⁰**Rorvik LM, Yndestad M, Skjerve E.** (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 14(2) : 111-7
- ¹⁸¹**Rorvik L. M., Caugant DA., and Yndestad M.** (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int. J. of Food Microbiol.* 25:19-27.

- ¹⁸²**Rorvik L.M.** (2000a) *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int. J. Food Microbiol.* 62 : 183-190.
- ¹⁸³**Rorvik L.M., Aase B., Alvestad T., Caugant D.** (2000b) Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (11): 4779-4784.
- ¹⁸⁴**Rosso L., Bajard S., Flandrois J.P., Lahellec C., Fournaud J., Veit P.** (1996) Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J. Food Protect.* 59 (9) : 944-949.
- ¹⁸⁵**Ryser E.T., Arimi S.M., Bunduki M.M-C, Donnelly C.W.** (1996) Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5): 1781-1787.
- ¹⁸⁶**Sabanadesan S., Lammerding A.M., Griffiths M.W.** (2000) Survival of *Listeria innocua* in salmon following cold-smoke application. *J. Food Protect.* 63(6): 715-720.
- ¹⁸⁷**Saito A, Sawada T, Ueda F, Hondo R.** (1997) Classification of *Listeria monocytogenes* by PCR-restriction enzyme analysis in the two genes of *hlyA* and *iap*. *Microbiologica.* 21 :87-92.
- ¹⁸⁸**Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Maldini M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt J., Binkin N., Salmaso S.** (1996) A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.* 117 : 429-436.
- ¹⁸⁹**Sambrook J., Fritsch E. Maniatis T** (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ¹⁹⁰**Samuelsson S, Rothgardt NP, Carvajal A, Frederiksen W.** (1990) Human listeriosis in Denmark 1981-1987 including an outbreak November 1985-March 1987. *J. Infect.* 20(3):251-259
- ¹⁹¹**Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S.H., Nicholls E.S., Broome C.V.** (1983) Epidemic listeriosis-Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* 308 : 203-206.
- ¹⁹²**Schlech W.F.** (2000) Foodborne listeriosis. *Clin Infect. Dis.* 31 : 770-775.
- ¹⁹³**Seeliger H.P.R., Jones D.** (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Sneath, P.H.A. and Holt J.G. Eds, pp 1235-1245. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- ¹⁹⁴**Selander R.K., Caugant D., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S.** (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (5) : 873-884.
- ¹⁹⁵**Sheehan B., Klarsfeld A., Msadek T., Cossart P.** (1995) Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J. Bacteriol.* 177 (22) : 6469-6476.
- ¹⁹⁶**Sheikh-Zeinoddin M., Pehinec T.M., Hill S.E., Rees C.E.D.** (2000) Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 61 : 41-49.

- ¹⁹⁷**Slutsker L., Schuchat A.** (1999) Listeriosis in humans in: Ryser E.T. and Marth E.H., eds. *Listeria, Listeriosis, and food Safety*, second edition. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. Little, Brown and Company : 75-95.
- ¹⁹⁸**Smith-Palmer A, Stewartt J, Fyfe L.** (2002) Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine-specific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *J Med. Microbiol.* 51(7) : 567-74.
- ¹⁹⁹**Sokolovic Z., Riedel J., Wuenscher M., Goebel W.** (1993) Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol. Microbiol.* 8(2) : 219-227.
- ²⁰⁰**Stelma GN Jr, Reyes AL, Peeler JT, Francis DW, Hunt JM, Spaulding PL, Johnson CH, Lovett J** (1987) Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 2085-2089
- ²⁰¹**Stephens J.C., Roberts I.S., Jones D., Andrew P.W.** (1991) Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse : evidence for a dose dependence. *J. Appl. Bacteriol.* 70 : 239-244.
- ²⁰²**Strom M.S.** (1998) Phenotypic and genetic characterization of a non-hemolytic variant of *Listeria monocytogenes* from cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 15 : 329-337.
- ²⁰³**Struelens MJ et Members of the European study group on epidemiological markers (ESGEM)** 1996 Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2 :2-11.
- ²⁰⁴**Struelens M.J., De Gheldre Y., Deplano A.** (1998) Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 19: 565-569.
- ²⁰⁵**Sunen E.** (1998) Minimum inhibitory concentration of smoke wood extract against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 45-48.
- ²⁰⁶**Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B., Tauxe R.V. and the CDC PulseNet Task Force.** (2001) PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (3): 382-389.
- ²⁰⁷**Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin. Microbiol.* 33(9) : 2233-9
- ²⁰⁸**Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV.** (1997) How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections : a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control and Hospital Epidemiol.* 18 : 426-439.
- ²⁰⁹**Tham W., Bannerman E., Bille J., Ericsson H., Helmersson S., Henriques B., Jacquet Ch., Loncaveric S., Rocourt J., Tjernberg I., Unnestad H., Danielsson-Tham M.L.** (2001) Changes in serogroup distribution of human *Listeria monocytogenes* strains in Sweden. *Proceeding ISOPOL XIV Mannheim, Germany* : p148.

- ²¹⁰**Tham W., Ericsson H., Loncarevic S., Unnerstad H., Danniellsson-Tham M.-L.** (2000) Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int. J. Food Microbiol.* 62 : 173-175.
- ²¹¹**Uchikawa K., Sekikawa I., Azuma I.** (1986) Structural studies on teichoic acids in cell walls of several serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Biochem.* 99 : 315-327.
- ²¹²**Vahidy R., Waseem M., Khalid SM.** (1996) A comparative study of unpassaged and animal passaged cultures of *Listeria monocytogenes* in rabbits. *Ann. Acad. Med. Singapore* 25(1) : 139-42
- ²¹³**Van Langendonck N., Bottreau E., Bailly S., Tabouret M., Marly J., Pardon P., Velge P.** (1998) Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J. Appl. Microbiol.* 85 : 337-346.
- ²¹⁴**Vazquez-Boland J.A., Dominguez-Bernal G., Gonzalez-Zorn B., Kreft J., Goebel W.** (2001) Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microb. Infect.* 3 : 571-584.
- ²¹⁵**Vega Y., Dickneite C., Ripio M.T., Bockmann R., Gonzalez-Zorn B., Novella S., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Vazquez-Boland J.A.** (1998) Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and Cyclic AMP receptor protein: the PrfA*(Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J. Bacteriol.* 180 (24) : 6655-6660.
- ²¹⁶**Vines A., Reeves MW, Hunter S, Swaminathan B.** (1992) Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* 143 : 281-294.
- ²¹⁷**Von Both U., Otten S., Darbouche A., Domann E., Chakraborty T.** (1999) Physical and genetic map of the *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2a chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 175 : 281-289.
- ²¹⁸**Wiedman M., Bruce J., Keating C., Johnson A.E., McDonough P.L., Batt C.A.** (1997) Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* 65 (7) : 2707-2716.
- ²¹⁹**Williams R.A.D., Shah H.N.** (1980) Enzyme patterns in bacterial classifications and identification. M. Goodfellow and R.G. Board (ed). *Microbiological classification and identification*. Academic Press, Inc (London), Ltd., London. pp 299-318.
- ²²⁰**Williams J.R., Thayyullathil C., Freitag N.** (2000) Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 182 (3) : 837-841.
- ²²¹**Wuensher M.D., Kohler S., Bubert A., Gerike U., Goebel W.** (1993) The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability and its gene product has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* 175 (11) : 3491-3501.
- ²²²**Zheng W., Kathariou S.** (1995) Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4°C). *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 4310-4314.

²²³**Zheng W., Kathariou S.** (1997) Host-mediated modification of *Sau3AI* restriction in *Listeria monocytogenes*: prevalence in epidemic-associated strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (8) 3085-3089.

PUBLICATIONS DE DIVERSES INSTANCES

²²⁴**Anonyme** (1998a) Le plan de surveillance 1993-1996 de la contamination des aliments par *Listeria monocytogenes*. Le point sur...n°9 DGCCRF, Ministère de l'économie, des Finances et de l'Industrie.

²²⁵**Anonyme** (1998b) Opération Alimentation "fêtes de fin d'année" 1997. Note de service DGAL/SDHA/N.98/N°8069.

²²⁶**Anonyme** (1998c) Gestion des non-conformités des denrées alimentaires. Note de service DGAL/SDHA/N.98/N°8088.

²²⁷**Anonyme** (2001a) Oubreak of Listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese-North Carolina, october 2000-january 2001. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.*, 50 (26) : 560-562

²²⁸**Anonyme** (2001b) Report of the twenty-fourth session of the codex commitee on fish and fishery products. Bergen, Norway, 5-9 June 2000. ALINORM 01/18. Codex Alimentarius Commission.

²²⁹**Anonyme** (2002) Avis de l'Agence relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*. <http://www.afssa.fr>

²³⁰**BEH 23/1995** (1995) Prévention de la listériose chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées.

²³¹**BEH 45/1996** (1996) Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. Résultats des plans 1993-1994.

²³²**BEH 34/2001** (2001) V. Goulet, Ch. Jacquet, E. Laurent, J. Rocourt, V. Vaillant, J de Valk. La surveillance de la listériose humaine en France en 1999.

²³³**Directive 93/43/CEE** du conseil, du 14 juin 1993, relative à l'hygiène des denrées alimentaires. JO n°L175 du 19/07/1993, p 1-11.

²³⁴**FAO Fisheries report No 604** (1999) Report of the FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria monocytogenes* in fish products. Amherst, MA, United States. 17-20 May 1999.

²³⁵**FAO Preliminary report MRA 00/01.** Buchanan R., Lindqvist R. (2001) Hazard identification and hazard characterization of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbial hazards in foods, FAO headquarters, Rome, Italy, 17-21 July 2000.

²³⁶**InVS** (2002) Cas groupés de listériose, données actualisées au 25 janvier 2002. <http://www.invs.sante.fr>

²³⁷**Norme NF V08-055** (1997) Microbiologie des aliments. Recherche de *Listeria monocytogenes*. Méthode de routine.

²³⁸ **Norme NF EN ISO 11290-1** (1997) Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 : Méthode de recherche.

²³⁹ **Rapport** Intermédiaire de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes* de L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Avril 2000.

²⁴⁰ **Rapports Ofimer 1998-1999** http://www.ofimer.fr/Pages/marche/Marche_Accueil.html

SOURCES ELECTRONIQUES

Par ordre de leur apparition dans le texte

²⁴¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser> (figure 1 p 4)

²⁴² <http://www.sciencemag.org/cgi/data/294/5543/849/DC1/1> (tableau 1 p 5 et figure 5 p8)

²⁴³ <http://www.invs.sante.fr/publications/journees/2/goulet/index.html> (paragraphe 1-4 p 34)

