

## Virulence de *Listeria monocytogenes* en biofilm : conséquences en élevage laitier

E. ZUNDEL (1), Y. GALLOIS (1), E. CONSTANTY (1), P. PARDON (1, 2), N. MARQUET-VAN DER MEE (3), J.-L. MÉNARD (4)

(1) INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly - E-mail <zundel@tours.inra.fr>

(2) Adresse actuelle : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général De Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex

(3) Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière, Hôpital Trousseau, 37044 Tours cedex 01

(4) Institut de l'Élevage, 9 rue André Brouard, 49105 Angers cedex 02

**RÉSUMÉ** - Un biofilm est une communauté microbienne adhérente à un support. Les objectifs de ce travail étaient 1- d'évaluer la virulence d'un biofilm de *Listeria monocytogenes* en présence ou non de *Pseudomonas paucimobilis* par rapport à une suspension planctonique ; 2- d'identifier un problème lié à un biofilm à *Listeria* en élevage laitier.

Le biofilm, produit directement en seringue, se stabilise à  $10^4$ ,  $10^6$  ou  $10^8$  *Listeria* selon les conditions de production. La présence de *P. paucimobilis* ne modifie pas le nombre de *Listeria* dans le biofilm. Les niveaux d'infection après inoculation par voie sous-cutanée plantaire à des souris OF1 permettent de confirmer la hiérarchie des souches de *Listeria* selon leur virulence, qui est donc conservée en biofilm.

Une enquête cas-témoin a permis d'identifier un élevage caprin laitier livrant un lait régulièrement contaminé par *L. monocytogenes* mais aucune chèvre excrétrice dans le lait n'a pu être mise en évidence. Les 246 prélèvements effectués pendant 5 mois ont montré que l'installation de traite était contaminée par une seule souche de *L. monocytogenes* (même sérotype, même lysotype, même profil RAPD). La persistance de cette souche résidente malgré le nettoyage et la possibilité de la prélever régulièrement par frottis en différents endroits de l'installation de traite correspondent à la définition d'un biofilm.

La capacité de survie et la conservation de la virulence de *L. monocytogenes* en biofilm, et la capacité d'un biofilm à contaminer par simple contact, justifient les mesures d'hygiène appliquées en élevage pour prévenir le risque "*Listeria*" en amont des filières agro-alimentaires.

## Virulence of *Listeria monocytogenes* as a biofilm: consequences for dairy farming

E. ZUNDEL (1), Y. GALLOIS, E. CONSTANTY, P. PARDON, N. MARQUET-VAN DER MEE, J.-L. MÉNARD

(1) INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly - E-mail <zundel@tours.inra.fr>

**SUMMARY** - A biofilm consists in a microbial community which adheres to an underlying surface structure. The aims of this study were 1- to assess the virulence of *Listeria monocytogenes* biofilms with or without *Pseudomonas paucimobilis* compared with planktonic suspensions ; 2- to identify a potential problem linked to a *Listeria* biofilm in dairy farming.

A biofilm growing inside a syringe reached a number of  $10^4$ ,  $10^6$  or  $10^8$  *Listeria* according to growth conditions. *P. paucimobilis* did not change the number of *Listeria* cells in the biofilm when they were cocultured. In a mouse model, virulence of *L. monocytogenes* as a biofilm was maintained.

A case-control study identified a goat dairy farm whose bulk milk was regularly contaminated with *L. monocytogenes*. No goat excreting *Listeria* in milk was identified. The 246 samples collected over 5 months showed that the milking machine was contaminated with only one *L. monocytogenes* strain (same serotype, same lysotype, same RAPD pattern). That strain persisted in spite of cleaning, and was regularly isolated from swabs taken from several places of the milking machine ; these results as a whole corresponded to the definition of a biofilm.

*L. monocytogenes* ability to survive and to maintain its virulence in biofilms, and the ability of bacteria to detach from the biofilm, justify hygiene practices in order to control the "*Listeria*" risk in dairy farms.

## INTRODUCTION

Bactérie ubiquiste, *Listeria monocytogenes* est un pathogène opportuniste responsable de la listériose, maladie rare (moins de 4 cas par million d'habitants en France) mais grave (20 à 30% de létalité). La consommation d'aliments contaminés est à l'origine de 99% des cas de listériose humaine (Mead *et al.*, 1999). Les capacités de survie voire de développement de *L. monocytogenes* dans l'environnement, l'excrétion fréquente de cette bactérie par voie fécale chez les animaux de rente font de l'élevage un point sensible pour le risque "Listeria" dans la filière agro-alimentaire. *L. monocytogenes* est aussi capable de former des biofilms, seule ou avec d'autres micro-organismes (Roberts et Wiedmann, 2003).

Lorsque les micro-organismes adhèrent à une surface, ils peuvent sécréter des molécules douées de propriétés adhésives (protéines, polysides) et se trouver inclus dans une couche de mucus. On peut alors définir un biofilm comme une communauté microbienne éventuellement enfouie dans une matrice fibreuse extra-cellulaire, et immobilisée sur une surface (Wimpenny, 1995).

Les objectifs de la présente étude étaient de 1- évaluer la virulence d'un biofilm monomicrobien avec *L. monocytogenes* et d'un biofilm bimicrobien avec *L. monocytogenes* et *Pseudomonas paucimobilis* par rapport à une suspension planctonique ; 2- identifier un problème lié aux biofilms à *Listeria* en élevage.

## 1. VIRULENCE DE *L. MONOCYTOGENES* EN BIOFILMS

### 1.1. MATERIELS ET METHODES

Six souches de virulence connue (en suspension planctonique) ont été choisies pour cette étude : *L. innocua* ATCC 33090 est le témoin non-virulent ; *L. monocytogenes* CNL 895795 et CNL 895807 ont une virulence atténuée (Van Langendonck *et al.*, 1998), et *L. monocytogenes* LO28 et LCCN 95962 sont virulentes ; la souche *Pseudomonas paucimobilis* 98070 (aimablement fournie par B. Carpentier, AFSSA, Maisons-Alfort) n'est pas virulente chez la souris dans nos conditions, et a permis de former, en coculture avec *L. monocytogenes* LO28, un biofilm bimicrobien.

Les inoculums en suspension planctonique sont produits par mise en suspension du tapis de culture en phase exponentielle obtenu sur pente de gélose BHIA et ajustement de la densité optique. Pour les inoculums en biofilm, le protocole (Meylheuc *et al.*, 1998) a été adapté afin d'obtenir les doses requises. Une culture de 17 h en bouillon BHI est centrifugée et le culot repris de manière à ajuster sa concentration en bactéries. Dans chaque seringue (type seringue à tuberculine) sont aspirés 300 µl de la suspension en BHI au 1/30 ou au 1/3000 pour un biofilm dosé à 10<sup>8</sup> ou 10<sup>4</sup> bactéries respectivement. Pour un biofilm bimicrobien, la suspension de *P. paucimobilis* est mise à incuber 3 h, puis la seringue est lavée avant d'aspirer la suspension de *L. monocytogenes*. L'incubation des seringues est de 96 h à 25 ou 37°C. Un témoin "biofilm non infectieux" est obtenu par inactivation après 7 jours d'irradiation par une source de césium 137. Après lavage, les biofilms sont repris en eau physiologique pour numération ou injection à la souris.

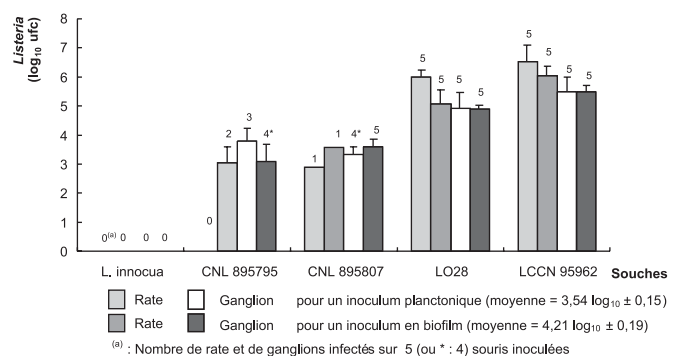
La virulence des souches de *Listeria* a été évaluée dans un modèle murin (Audurier *et al.*, 1981). Des souris OF1 âgées de 7 semaines sont réparties par lots de 5 animaux. Les bactéries sont inoculées par voie intraveineuse (IV), sous-cutanée plantaire (SCP) ou orale (VO) avec des doses de 10<sup>4</sup>,

10<sup>4</sup> et 10<sup>8</sup> unités formant colonie (ufc) sous un volume de 200, 50 et 100 µl respectivement. Les souris sont euthanasiées par élévation cervicale 48 h post inoculation (pi) (IV) ou 72 h pi (SCP, VO). La rate est prélevée dans tous les cas, avec le cas échéant le ganglion poplité (SCP). Après pesée et reprise de l'organe en eau physiologique stérile, des dilutions sérielles sont étalées sur des géloses TSA. Les colonies sont dénombrées après 48 h d'incubation à 37°C.

## 1.2. RESULTATS

Dans nos conditions, le nombre de bactéries par biofilm dépend principalement de la concentration de la suspension bactérienne aspirée dans la seringue, de la concentration du milieu nutritif utilisé, et de la température d'incubation : par exemple un biofilm de 10<sup>8</sup> *Listeria* est obtenu après incubation à 25°C d'une suspension de 10<sup>9</sup> à 10<sup>10</sup> ufc/ml en BHI au 1/30. Les biofilms sont reproductibles pour une dose donnée.

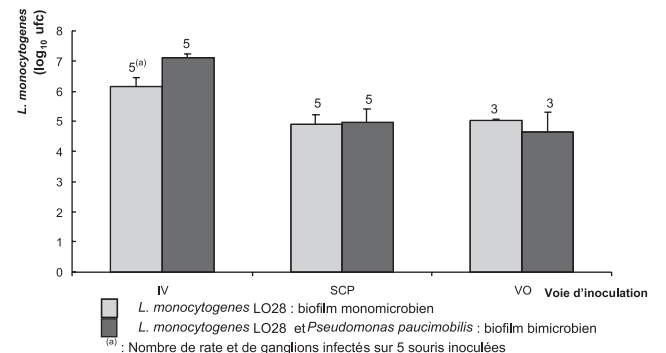
**Figure 1** : Virulence de *Listeria* : infection des rates et ganglions poplités chez la souris (voie SCP)



En biofilm bimicrobien, la coculture de *P. paucimobilis* avec *L. monocytogenes* ne modifie pas le nombre de *Listeria* obtenues par rapport à un biofilm monomicrobien avec *Listeria* seule.

Chez la souris, le biofilm irradié c'est à dire non infectieux n'induit ni symptômes ni lésions. La virulence des cinq souches de *Listeria* testées n'est pas modifiée par le type d'inoculum (planctonique ou biofilm), et on obtient un classement identique des souches (figure 1). Le biofilm bimicrobien *L. monocytogenes* LO28 + *P. paucimobilis* est aussi virulent que le biofilm monomicrobien à *L. monocytogenes* LO28 quelle que soit la voie d'inoculation (figure 2).

**Figure 2** : Virulence de *L. monocytogenes* LO28 en biofilm : infection splénique chez la souris



Le biofilm, forme de résistance et de survie des communautés bactériennes, permet donc également le maintien de la virulence des *Listeria*, par rapport aux cultures en phase exponentielle

## 2. BIOFILMS DE *L. MONOCYTOGENES* EN ELEVAGE LAITIER

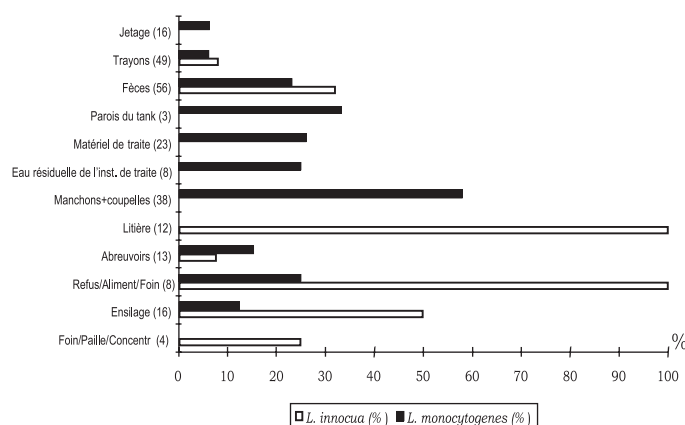
### 2.1. MATERIELS ET METHODES

Au cours d'un programme d'étude de la fréquence, des origines et des moyens de maîtrise de la contamination du lait de chèvre par *L. monocytogenes* (Ménard *et al.*, 1998 ; Zundel *et al.*, 1998), une enquête cas-témoin a permis de rechercher dans un élevage livrant depuis longtemps du lait régulièrement contaminé, l'origine des contaminations. Lors de visites régulières pendant 6 mois, des prélèvements ont été effectués dans l'environnement d'élevage et chez les animaux (tableau 1). Les prélèvements sur l'installation de traite ont été réalisés par frottis ou écouvillonnage, à l'exception des eaux résiduelles. Expédiés sous froid au laboratoire INRA-Pii, ils ont été traités dès réception selon la méthode AFNOR V08-055 (AFNOR, 1993) légèrement modifiée. A raison d'une colonie par prélèvement positif, les isolats de *L. monocytogenes*, et quelques *L. innocua* et *L. seeligeri* pour confirmation, ont été transmis au CHU de Tours pour typage par le Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière (Pr Audurier). Le typage permet de confirmer des liens épidémiologiques entre les souches de *Listeria* (Wiedmann, 2002). Tous les isolats de *L. monocytogenes* ont été sérotypés (sérum anti-1 ou 4) et lysotypés (Audurier *et al.*, 1977 ; Marquet-Van der Mee et Audurier, 1995a). Certaines souches ont été analysées par amplification aléatoire de fragments polymorphiques d'ADN (RAPD) (Mazurier et Wernars, 1992a).

### 2.2. RESULTATS

Dans cet élevage n° 2635, 246 prélèvements ont été réalisés entre janvier et juin 1996. Aucune chèvre excrétrice dans le lait n'a pu être mise en évidence malgré la mise en œuvre, à plusieurs reprises, des dispositions prévues dans le cadre du programme précité.

**Figure 3** Répartition des isollements de *Listeria* sp. (%) issus de l'élevage n° 2635



Les isollements de *Listeria* ont été fréquents, particulièrement en février, mars et avril, et se sont rarifiés en juin. Le pourcentage de prélèvements ayant permis d'isoler des *Listeria* est équivalent pour *L. monocytogenes* (22,0 %) et pour *L. innocua* (21,5 %). Cependant, *L. monocytogenes* contamine seule l'installation de traite, alors que seule *L. innocua* est retrouvée dans la litière. Les deux espèces sont isolées des fèces, trayons, abreuvoirs, refus et ensilage, avec une prédominance de *L. innocua* dans ces deux derniers prélèvements (figure 3). Dans cet élevage, les

souches isolées du lait de troupeau et de l'installation de traite sont de lysotypes non retrouvés dans l'environnement d'élevage, à l'exception des frottis de trayons et d'un écouvillonnage des naseaux (tableau 1).

### 3. DISCUSSION

L'originalité de l'élevage n° 2635 tient au fait que le lait livré a été très régulièrement contaminé par *L. monocytogenes* pendant 32 mois sans qu'aucune chèvre excrétrice soit mise en évidence, alors que les contaminations d'origine environnementale sont généralement intermittentes et de faible niveau (Sanaa, 1993). Le typage des souches de *L. monocytogenes* a mis en évidence 2 sérogroupes (1 et 4) et une quinzaine de lysotypes (tableau 1) comme c'est généralement le cas dans les élevages (Sanaa, 1993 ; Low *et al.*, 1995). Cependant, l'installation de traite était contaminée par une seule souche de *L. monocytogenes* (sérotypage 4, lysotype 1, profil RAPD 363). Son origine est inconnue puisqu'elle n'a pas été retrouvée ailleurs, à l'exception d'un écouvillonnage nasal et de 2 frottis sur la peau des trayons (tableau 1). La contamination de l'installation de traite a été mentionnée dans plusieurs élevages de vaches laitières (Sanaa, 1993), sans être aussi massive et prolongée que dans l'élevage n° 2635. Nous avons vérifié que le nettoyage de la machine à traire était correct (durée des cycles, températures, utilisation des produits). La persistance de la souche pourrait être due à son adaptation à l'environnement particulier de la machine à traire (Fenlon *et al.*, 1996 ; Unnerstad *et al.*, 1996 ; Arimi *et al.*, 1997) et à la présence des joints et raccords sur les tuyauteries qui facilitent l'encrassement microbien (Mettler et Carpentier, 1997).

La persistance de cette souche malgré le nettoyage, et la possibilité de la prélever régulièrement par frottis en différents endroits de l'installation de traite correspondent à la définition d'un biofilm.

La capacité des *Listeria* à former des biofilms sur différents matériaux - acier inoxydable, Teflon®, caoutchouc (Bourion et Cerf, 1996) - est bien connue (Roberts et Wiedmann, 2003). La résistance des *Listeria* aux désinfectants dépend de la nature des surfaces et de la structure des biofilms : elle peut augmenter avec leur association avec d'autres bactéries (Bourion et Cerf, 1996). La persistance de *L. monocytogenes* malgré les opérations de nettoyage et de désinfection, démontrée dans des laiteries (Unnerstad *et al.*, 1996) ou des abattoirs (Giovannacci *et al.*, 1999), pourrait être due à des biofilms. En même temps, les produits alimentaires en cours de process peuvent être contaminés par le détachement d'une partie des *Listeria* du biofilm (Midelet et Carpentier, 2002). Un biofilm peut donc être une source de contamination du lait de troupeau, à côté des animaux excréteurs de *L. monocytogenes* par la mamelle (Zundel *et al.*, 1998) et des contaminations par défaut d'hygiène (Sanaa *et al.*, 1993).

L'augmentation de la virulence de certaines bactéries en biofilm a été montrée, par exemple pour *Staphylococcus epidermidis* (Deighton *et al.*, 1996) ou pour *Salmonella typhimurium* (Turnock *et al.*, 2002). Dans nos conditions, la virulence des souches de *L. monocytogenes* testées n'augmente pas lorsqu'elles sont en biofilms mono ou bimicrobien, mais est maintenue par rapport aux suspensions planctoniques quelle que soit la voie d'inoculation.

## CONCLUSION

Nous avons montré que *L. monocytogenes* peut se développer en biofilms en présence ou non d'une autre bactérie, de manière à produire des doses utilisables en modèle de virulence chez la souris. La virulence des souches testées est conservée en biofilms par rapport aux suspensions.

Nous avons aussi montré dans un élevage que l'installation de traite, à cause de l'implantation d'une souche de

*L. monocytogenes* résistant au nettoyage probablement sous forme de biofilm, peut être responsable de la contamination du lait.

Finalement, la capacité de survie de *L. monocytogenes* en biofilm, la conservation de sa virulence dans cette communauté microbienne, et la capacité d'un biofilm à contaminer par simple contact, justifient les mesures d'hygiène appliquées en élevage pour prévenir le risque "*Listeria*" en amont des filières agro-alimentaires.

**Tableau 1** : Chronologie des isollements et typages des souches de *L. monocytogenes* retrouvées dans l'élevage n° 2635

Dates	5/1	13/2	18/3	19/3	21/3	28/3	21/4	3/5	31/5	10/6	19/6	20/6
<b>Type de prélèvements</b>												
Alimentation												
- stockage :												
foin/paille/concentré												
ensilage	II	2						2				54
- au contact des animaux												
refus/aliment/foin dans auge				5				6				
abreuvoirs				4, 8				2				
litière												
Animaux												
- fèces	VII	5		8				2, III, IV				
- trayons	I	I		7								
- jetage	I											
Traite												
- manchons + coupelles	I	I		I				I				
- matériel de traite	I	I		I				I				
- lait de troupeau	I	I	I	3	I	I	I		V	V	VI	

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 54 : lysogroupes de sérotype 4.

I, II, III, IV, V, VI, VII : lysogroupes de sérotype 1.

*Une partie de ce travail a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Education nationale, de la Recherche et de la Technologie.*

**AFNOR. 1993.** Microbiologie alimentaire - Recherche de *Listeria monocytogenes* - V 08-055. Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris

**Arimi S.M., Ryser E.T., Pritchard T.J., Donnelly C.W. 1997.** J. Food Prot., 60, 811-6.

**Audurier A., Pardon P., Marly J., Lantier F., Loulergue J. 1981.** Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 132D, 191.

**Audurier A., Rocourt J., Courtieu A.L. 1977.** Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128A, 185-98.

**Bourion F., Cerf O. 1996.** Sci. Aliments, 16, 151-66.

**Deighton M.A., Borland R., Capstick J.A. 1996.** Epidemiol. Infect., 117, 267-80.

**Fenlon D.R., Wilson J., Donachie W. 1996.** J. Appl. Bacteriol., 81, 641-50.

**Giovannacci I., Ragimbeau C., Queguiner S., Salvat G., Vendevre J.L., Carlier V., Ermel G. 1999.** Int. J. Food Microbiol., 53, 127-40.

**Low J.C., Donachie W., McLauchlin J., Wright F. 1995.** In : Proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis, Perth, W. Australia, 2-6 october 1995. Promaco Conventions, Canning Bridge, Australia, 141-4.

**Marquet-Van der Mee N., Audurier A. 1995.** Appl. Env. Microbiol., 61, 303-9.

**Mazurier S.I., Wernars K. 1992.** Res. Microbiol., 143, 499-505.

**Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S.,**

**Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. 1999.** Emerg. Infect. Dis., 5, 607-25.

**Ménard J., Ribaud D., Heuchel V., Zundel E., Pardon P., Marquet-Van der Mee N., Audurier A., Verneau D., Pelloquin F., Bernard N. 1998.** Réussir La Chèvre, 227, 33-7.

**Mettler E., Carpentier B. 1997.** Lait, 77, 489-503.

**Meylheuc T., Herry J.M., Rault J., Bellon-Fontaine M.N. 1998.** In : Résumés - Forum (5ème Congrès de la SFM, Lille). Société Française de Microbiologie, 291.

**Midelet G., Carpentier B. 2002.** Appl. Environ. Microbiol., 68, 4015-24.

**Roberts A.J., Wiedmann M. 2003.** Cell. Mol. Life Sci. 60(5), 904-18.

**Sanaa M. 1993.** Thèse de Doctorat d'Université. Université Paris XI., 207pp.

**Sanaa M., Poutrel B., Ménard J.L., Serieys F. 1993.** J. Dairy Sci., 76, 2891-8.

**Turnock L.L., Somers E.B., Faith N.G., Czuprynski C.J., Lee W.A. 2002.** Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 25(1), 43-8.

**Unnerstad H., Bannerman E., Bille J., Danielsson-Tham M.L., Waak E., Tham W. 1996.** Neth. Milk Dairy J., 50, 493-9.

**Van Langendonck N., Bottreau E., Bailly S., Tabouret M., Marly J., Pardon P., Velge P. 1998.** J. Appl. Microbiol., 85, 337-46.

**Wiedmann M. 2002.** J. AOAC Int., 85, 524-31.

**Wimpenny J. 1995.** Microb. Ecol. Health Dis., 8, 305-8.

**Zundel E., Pardon P., Ménard J., Heuchel V., Marquet-Van der Mee N., Audurier A., Verneau D., Pelloquin F., Bernard N. 1998.** Réussir La Chèvre, 225, 32-5.