Déterminants moléculaires impliqués dans la phase de persistance intracellulaire de la bactérie pathogène Listeria monocytogenes

Aurélie Lotoux

▶ **To cite this version:**

Aurélie Lotoux. Déterminants moléculaires impliqués dans la phase de persistance intracellulaire de la bactérie pathogène Listeria monocytogenes. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL021 . tel-04547398

HAL Id: tel-04547398

https://theses.hal.science/tel-04547398

Submitted on 15 Apr 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

NNT :2023UPASL021

université PARIS-SACLAY

Déterminants moléculaires impliqués dans la phase de persistance intracellulaire de la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*

Molecular determinants involved in the intracellular persistence phase of the pathogenic bacterium Listeria monocytogenes

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale : n°577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Science de la vie et santé. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'Unité de Recherche **MICALIS (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech)**,
sous la direction de **Alessandro PAGLIUSO**, Chargé de recherche
la co-direction de **Hélène BIERNE**, Directrice de recherche
le co-encadrement de **Eliane MILOHANIC**, Chargée de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 24 mars 2023, par

Aurélie LOTOUX

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Mme Claire JANOIR Professeure des Universités Université Paris-Saclay	Présidente
Mme Nadejda BERKOVA Directrice de recherche INRAE, Institut Agro Rennes	Rapportrice & Examinatrice
Mr Philippe VELGE Directeur de recherche INRAE, Université de Tours	Rapporteur & Examinateur
Mr Olivier DUSSURGET Professeur des Universités Institut Pasteur Université Paris Cité	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord l'ensemble des membres du jury, Mme. **Nadejda Berkova**, Mr. **Philippe Velge**, Mme. **Claire Janoir**, Mr. **Olivier Dussurget** et Mme. **Pascale Cossart**, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je suis très honorée de vous avoir à mes côtés pour l'appréciation et les échanges autour de mon travail.

Je remercie évidemment les membres de mon équipe EpiMic, sans qui ce travail de thèse n'aurait probablement jamais abouti et qui ont rendu ces 4 dernières années très heureuses. Merci à **Eliane Milohanic**, ma co-directrice de thèse, qui a toujours su faire preuve d'une patience sans faille, d'une grande pédagogie et toujours à l'écoute de mes petits tracas. Tes conseils en génétique et en microbiologie me resteront précieux et ta compagnie de bureau me manquera. Je remercie également particulièrement **Alessandro Pagliuso**, qui a su assumer de lourdes responsabilités cette année passée, avec un très grand professionnalisme. Tu as su être d'une oreille attentive, nous transmettre ta bonne humeur et ton enthousiasme quotidien, malgré ton manque de sommeil ponctuel à cause d'une certaine Anna :). Merci aussi à **Goran Lakisic** pour tout ce que tu es, ta curiosité et ta passion scientifique, tes sifflements de chansons pour enfants ou de Laurel et Hardy, ton petit ton grognon et surtout tes blagues nulles auxquelles j'ai pourtant toujours rigolé. Après je suis bon public comme tu me le dis aussi ;). Merci à **Filipe Carvalho**, le petit soleil de cette équipe toujours souriant et attentionné. Plein de merci aussi à **Emma Desgranges**, pour nos moments de partage sur la science et nos petites vies respectives. J'ai et je garderais une profonde admiration pour ton parcours et ton travail. Merci pour ta motivation communicative et tes conseils. Merci à **Matthieu Bertrand** de m'avoir accompagné durant ces derniers mois pour l'article, que tu as su rendre bien plus beau grâce à tes beaux graphiques R et tes belles analyses de données. Je croise les doigts pour ton contrat doctoral !! Merci également à **Alexis Carreaux**, toujours au top et en concurrence avec Goran sur les blagues nulles (mais drôles), merci à **Lydia Palaiodimou** pour sa bonne humeur et merci à **Delphine Lechardeur** pour sa grande bienveillance. Une pensée pour les membres qui sont partis vers d'autres horizons et qui ont occupé une place importante durant cette thèse **Mounia Kortebi**, **Renaud Pourpre** et **Natalie Descoeudres**. Merci à toute l'équipe pour tous ces moments partagés, de science comme de moments conviviaux autour d'un petit verre. Vous allez énormément me manquer.

Merci infiniment à **Hélène Bierne**, ma directrice de thèse. Je te remercie de m'avoir donné la chance de rejoindre ton équipe en 2019 pour mon stage de Master 2. Tu m'as tant appris et tes conseils continueront de raisonner dans mon esprit. Tu as été soucieuse de me transmettre la rigueur scientifique et surtout ta passion pour la recherche. J'espère que j'en serais digne. J'ai été fière d'avoir croisé ta route durant ces 4 années. Tes conseils scientifiques, ta spontanéité, ton amour de la vie et de la science me manquent.

Outre l'équipe EpiMic, je remercie l'équipe CPE, notre équipe voisine et co-partner du P2. Merci à **Pascale Serror** pour sa gentillesse et son soutien moral parfois tard le soir :). Merci énormément à **Lionel Rigottier-Gois**, de m'avoir tenu compagnie dans les allées malfamées de Vauboyen, pour ta bonne humeur communicative, ta rigueur dans tes relectures et tout le soutien que tu m'as apporté et qui m'a été très précieux. Merci à **Aurélie Derré-Bobillot** ma copine de prénom et ma compagnie favorite de P2 lors des lonnnnngues manips de criblage. Merci à **Cristel Archambaud** pour ta sympathie, tes conseils toujours avisés, tes remarques toujours pertinentes sur mes présentations et surtout merci pour les petites séries de chocolat dans ton bureau :)). Merci à **Francis Repoila**, pour nos conversations riches et variées qui ponctuaient nos après-midis et surtout ta profonde gentillesse. Une pensée également pour **Alan**, **Alexandre** et **Clara**, je vous souhaite tout plein de bonnes choses pour la suite.

A l'échelle de MICALIS, je remercie **Stéphane Aymerich** pour m'avoir accueilli dans cet institut et je remercie **Philippe Noirot**, pour m'avoir accompagné durant la fin et l'aboutissement de ma thèse.
Merci à **Hugo**, mon seul partenaire de galère :) de m'avoir écouté me plaindre beaucoup et pour avoir su faire preuve de compassion. Merci aussi pour nos aventures partagées autour de quelques verres et au salon de l'agriculture !
Merci aux autres étudiants et membres de MICALIS rencontrés au cours de ces dernières années, **Pauline**, **Simon d'en bas** et **Simon de Paroi**, **Romain**, **Jeanne**, **Maud**, **Vincent**, **Damien**, **Oliver** et **Julien**.
Merci aux collaborateurs de mon travail et particulièrement **Pierre-Emmanuel Douarre** de l'ANSES pour sa disponibilité et pour nous avoir transmis les outils nécessaires aux analyses de génomique comparative. Merci également à **Pierre Nicolas** de l'unité MAIAGE pour les analyses de données transcriptomiques.

Merci évidemment à mes proches,

Je commence par mes fidèles compagnons de l'agro, pas toujours très malins mais toujours très drôles et toujours détenteurs d'une brillante idée (ou pas). Mes années passées à vos côtés resteront gravées dans mon cœur, même si elles ont bien affecté ma santé. Merci à mes agros loin des yeux mais près du cœur. Merci à **Viannus**, **Paulo**, **Tritri** et mon ancienne coloc d'amour **Riri** Bellier, puis aussi **Guerbette**, **Chau**, **Vincy**, **Charly**, **Morgui**, **Morse**, **Nathan**, **Lisô** et **Nathan**, **Micka**, **Taron**, **Clara, Apo** et **Bertille**. Merci à mes agros Parisiens ou Versaillais, ou proches Paris : **Pepy**, **Eveuh**, **Loulou**, **Poule**, **Guigs**, **Margaux**, **Momoche** et **Menard**. Mentions spéciales à Ménard et Pepy pour la relecture de la petite introduction. Merci encore et surtout n'oubliez pas : " Un génie avant d'être ingénieur".
Merci à l'équipe de la promo 166 aussi chouettes que les 167. Des bisous particuliers à l'équipe de la Shot'loc et leurs amoureuses respectives et à l'équipe de Paris qui m'accompagne (ou m'influence) dans mes sorties du samedi soir.

Merci à mes copines **Amandine** et **Morgane**, compagnes de galère en classe préparatoire puis trouple iconique qui n'est plus vraiment qu'un trouple avec tous vos petits animaux de compagnie (je ne parle pas de Vincent et Florian). J'attends de vous recevoir à Paris pour que vous illuminiez la ville aux côtés de la tour Eiffel.

Merci à mes copines d'enfance **Jane** et **Julie**, sans qui ma vie serait beaucoup plus terne. Merci d'être comme vous êtes car ça fait plus de 10 ans que je vous aime comme ça. Continuez à avoir 1000 projets à la seconde et de faire partie des belles femmes que comptent ce pays. Sans vous mettre la pression, je compte toujours sur vous pour devenir Tata.

Merci à mes amis proches de lycée, ma belle **Naïd** maintenant sur son île, **Margo Roseau** bientôt sur une prochaine île elle aussi, **Toto**, **Vincent** dans les airs, **Vlad** et mes copines de Treb qui se reconnaitront.

Merci à la personne qui partage ma vie depuis 6 ans, qui incarne toutes les qualités mentionnées ci-dessus mais qui surtout, me supporte au quotidien dans mes moments de doute, mes blagues pas toujours très drôles mais récurrentes, mes attentes constantes d'encouragements et mes catastrophes culinaires régulières. J'espère que tu accepteras encore un bon moment de partager

ma route. Je te remercie de faire partie de ma vie, pour ces années passées et pour celles qui restent à vivre ensemble.

Merci à ma famille, ma tante **Danielle**, qui m'a toujours soutenu et encouragé et surtout mes parents **Pierro** et **Babeth**, sans qui tout ça n'aurait pas été possible. Merci d'avoir été d'un soutien sans faille et de m'avoir toujours accompagné dans mes décisions et merci de m'avoir transmis des valeurs importantes comme l'authenticité, la simplicité et la curiosité. Je vous aime d'amour. Une pensée pour Bibi et Pipette (et oui la science est partout, même pour les prénoms des chiens), les vedettes de la famille.

Merci à ceux qui nous ont quitté mais qui restent dans nos pensées,
à Papi Henri, Mamie Louisette, Mamie Jeanne

à Hélène

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....

LISTE DES TABLEAUX.....

LISTE DES ABREVIATIONS.....

INTRODUCTION.....

A. ***Listeria monocytogenes:* la bactérie pathogène responsable de la listériose..... 1**

1. Une découverte de près d'un siècle 1

2. Position taxonomique 1

3. Caractères d'identification bactériologique 2

4. Niches écologiques : un pathogène ubiquitaire 3

5. Pathogénicité : la listériose..... 4

5.1 La listériose humaine 4

5.1.1 Données épidémiologiques..... 4

5.1.2 Transmission, manifestations cliniques et traitements 5

5.1.3 Incidence à l'échelle nationale et internationale 7

5.1.4 Mécanisme d'infection de l'organisme 7

a. Pénétration par voie digestive et traversée de la barrière intestinale 7

b. Dissémination dans l'organisme 9

c. Infection du Système Nerveux Central (SNC)..... 10

d. Passage transplacentaire..... 10

5.2 La listériose animale 11

6. Portage asymptomatique chez l'homme et les animaux..... 12

B. ***Listeria monocytogenes* : un pathogène intracellulaire facultatif..... 15**

1. Processus d'infection intracellulaire de *Listeria monocytogenes*..... 15

2. Déterminants bactériens impliqués dans la vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes*. 16

2.1 Les protéines d'invasion du locus *inlAB*..... 17

2.2 Internalines supplémentaires..... 19

2.2.1 Protéines impliquées dans l'invasion..... 20

a. Vip (Virulence-Protein) 20

b. Ami et Auto..... 20

c. Déterminants bactériens complémentaires 21

2.3 Les facteurs de virulence du locus LIPI-1 21

2.3.1 Listériolysine O (LLO)..... 21

2.3.2 *Actin-assembly-inducing protein* (ActA) 23

a. Description..... 23

b. Localisation d'ActA à la surface bactérienne 25
c. Modifications post-traductionnelles de ActA 25
2.3.3 Stratégies d'évitement de l'autophagie médiées par ActA et LLO 25
2.3.4 Phospholipases PlcA et PlcB 28
2.3.5 Métalloprotéase Mpl 28
2.3.6 La nucléomoduline OrfX 29
2.3.7 Le facteur de transcription PrfA 29
2.4 Régulation des gènes de virulence 30
2.4.1 PrfA 30
2.4.2 Le facteur alternatif Sigma B 32
2.4.3 Protéines régulatrices additionnelles 33

3. Le mode de vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes* : des phases vacuolaires et cytosoliques 34

3.1 Modes de vie et niches intracellulaires de quelques bactéries pathogènes 34
3.1.1 Bactéries dites "cytosoliques" qui rompent la vacuole d'internalisation : *Shigella flexneri*, *Burkholderia* spp. *Rickettsia* spp. et *Francisella tularensis* 36
3.1.2 Bactéries dites "vacuolaires" échappant à la dégradation endosomale-lysosomale : *Salmonella enterica, Coxiella burnetii et Legionella pneumophila* 37
3.2 Le cas de *Listeria monocytogenes* 38
3.2.1 Compartiments vacuolaires dérivant des vacuoles primaires : SLAP et vacuoles de transcytose 41
a. Spacious Listeria-containing phagosome (SLAP) 41
b. Epithelial SLAP-like vacuole (eSLAP) 42
c. Replication-permissive SLAP (rSLAP) 42
d. Vacuoles de transcytose dans les entérocytes 44
3.2.2 Vacuoles tertiaires de persistance dans les cellules épithéliales : *les Listeria-Containing Vacuoles* (LisCV) 44

C. La persistance et l'état viable mais non cultivable (VBNC) de *Listeria monocytogenes* 47

1. La persistance, une définition controversée 47

2. Mécanismes de persistance dans l'environnement et dans les ateliers agro-alimentaires 48

2.1 Capacité de *Listeria monocytogenes* à former des biofilms sur les surfaces 49
2.2 Résistance de *Listeria monocytogenes* aux procédures de nettoyage et de désinfection 50
2.3 Déterminants moléculaires impliqués dans la persistance en industrie 51

3. Les cas des "*persisters*" tolérants aux antibiotiques 51

4. Persistance chez l'hôte 54

5. L'état *viable but not cultiva*ble (VBNC) de *Listeria monocytogenes* 54

D. Biodiversité de l'espèce *Listeria monocytogenes* 56

1. Diversité de l'espèce *Listeria monocytogenes* 56

1.1 Structure phylogénétique de l'espèce 56

1.2 Diversité et distribution spatiotemporelle de l'espèce *Listeria monocytogenes* 58

1.3 Caractéristiques génomiques et souches modèles de l'espèce 60

2. Diversité de la virulence au sein de l'espèce *Listeria monocytogenes* 61

2.1 *Core-genome* et virulence 63

2.1.1 InlA 63

2.1.2 InlB 65

2.1.3 PrfA 65

2.1.4 LLO 66

2.1.5 ActA 67

2.1.6 Exemples de mutations dans d'autres gènes, associées à la virulence 67

2.2 Génome accessoire et virulence 68

2.2.1 LIPI-2 68

2.2.2 Les internalines 68

2.2.3 Listeria *Pathogenicity Island-3* (LIPI-3) 68

2.2.4 Listeria *Pathogenicity Island-4* (LIPI-4) 69

2.2.5 Lmo2776 70

2.3 Les sucres associés aux acides téichoïques de la paroi bactérienne 70

2.4 Cas des clones hyper-virulents 70

2.5 Cas des clones hypo-virulents 71

3. Diversité génétique de *Listeria monocytogenes* et persistance dans les ateliers agro-alimentaires 72

OBJECTIFS DE LA THESE 74

RESULTATS 77

Partie I : Identification de déterminants bactériens impliqués dans la phase intracellulaire de persistance de *Listeria monocytogenes*

Partie II : Étude de la reprogrammation transcriptionnelle de *Listeria monocytogenes* dans les vacuoles LisCVs

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 154

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 162

ANNEXES 197

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Sources de contamination de *L. monocytogenes* (adapté de Quereda et al., 2021).. 4
Figure 2 : Schéma de l'infection par *L. monocytogenes* chez l'homme..... 6
Figure 3 : Schéma de la traversée de la barrière intestinale par *L. monocytogenes* (d'après Radoshevich & Cossart, 2018 et Kim et al., 2021). 9
Figure 4 : Passage de la barrière fœto-placentaire par *Listeria monocytogenes* (d'après Lamond & Freitag, 2018). 11
Figure 5 : Représentation schématique du cycle intracellulaire de *L. monocytogenes* et images de microscopie électronique représentant chaque étape du cycle (d'après Cossart, 2011)..... 16
Figure 6 : Organisation de l'îlot de pathogénicité (LIPI-1) de *L. monocytogenes* régulé par l'activateur transcriptionnel PrfA (d'après Scortti et al., 2007). 16
Figure 7 : Les protéines de surface InlA et InlB chez *L. monocytogenes* (adapté de Bierne & Cossart, 2007 ; Ireton et al., 2021) 17
Figure 8 : Structure de la toxine Listériolysine O (LLO) et représentations schématiques de la formation des pores dans la membrane (adapté de Hamon et al., 2011)..... 21
Figure 9 : Polymérisation de l'actine par la protéine de surface ActA (adapté de Kocks et al., 1992 ; Travier et al., 2013). 24
Figure 10 : Les 4 étapes de polarisation de ActA à la surface de *Lm* au cours de la division bactérienne (adapté de Rafelski & Theriot, 2006). 25
Figure 11 : Schéma du processus d'autophagie dite canonique (d'après Hansen et al., 2018).26
Figure 12 : Structure du glutathion (GSH) ou γ-glutamylcysteinyl glycine et son rôle en tant que co-facteur dans l'activation de PrfA (adapté de Lu 1999 ; Hall et al., 2016)..... 32
Figure 13 : Représentation schématique des modes de vie intra-vacuolaires et/ou intra-cytosoliques des principales bactéries pathogènes intracellulaires. 36
Figure 14 : Représentation de trois niches de résidence vacuolaire pour *L. monocytogenes* dans les macrophages, les cellules épithéliales, les trophoblastes et les hépatocytes (d'après Petit et al., 2022). 39
Figure 15 : Vie intracellulaire de *Lm* dans les SLAP et modèle de formation..... 42
Figure 16 : Occupation du site de co-activation de PrfA par la molécule inhibitrice IWP-2 (d'après Tran et al., 2022).. 43

Figure 17 : Formation des rSLAP observées en microscopie électronique à transmission en fonction du temps dans des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (d'après Tran et al., 2022). 44
Figure 18 : Cycle de vie intracellulaire de *L. monocytogenes* et modèle de formation des LisCVs dans des hépatocytes humains ou des cellules trophoblastiques (adapté de Bierne et al., 2018). 46
Figure 19 : Exemples de produits rappelés entre le 27 et le 31 octobre 2022, en France (d'après le compte officiel @RappelConso du gouvernement français, sur la plateforme Twitter) 48
Figure 20 : Croissance expérimentale de *Lm* après exposition aux antibiotiques – Mise en évidence de cellules « dormantes », de *persisters* et de cellules VBNC (d'après Ayrapetyan et al., 2018). 53
Figure 21 : Arbre phylogénétique de la population de *L. monocytogenes* basé sur les données MLST de 360 isolats (d'après Ragon et al., 2008). 57
Figure 22 : Distribution et fréquence des complexes clonaux les plus prévalents parmi les isolats alimentaires et cliniques et selon leur lignée (d'après Maury et al., 2016). 60
Figure 23 : Comparaison des séquences protéiques de InlA entre EGD et LO28 (adapté de Jonquières et al., 1998). 61
Figure 24 : Cartes génomiques de *Listeria monocytogenes* EGD-e et *Listeria innocua* CLIP11262 (d'après Disson et al., 2021). 62
Figure 25 : Polymorphisme de *inlA* et mutations dans la protéine associée. 65
Figure 26 : Contenu génétique du cluster PTS du LIPI-4 (adapté de Maury et al., 2016). 69
Figure 27 : Images de microscopie à immunofluorescence des souches *Lm*-WT et *Lm*-Δ*actA* après 72 h d'infection dans les cellules JEG-3 (d'après Kortebi et al., 2017). 135
Figure 28 : Expérience et traitement des échantillons pour le RNAseq 136
Figure 29 : Heatmap des expressions normalisées, exprimées en log2fpkm, de l'ensemble des gènes, pour les 3 échantillons de chaque condition testée. 138
Figure 30 : Représentations des gènes dérégulés à 6h et 72 *p.i.,* comparé à la condition BHI DO 1. FDR < 0.05 et log 2FC < -1 (réprimés) ou log2FC>1 (surexprimés) (CUTOFF 1). 139
Figure 31 : Ensemble des gènes sur-exprimés en conditions intracellulaires réplicatives (6h à 8h *p.i.*) comparé à une condition extracellulaire (BHI DO 1) selon 4 autres jeux de données transcriptomiques publiés. 140

Figure 32 : Nombre gènes différentiellement exprimés à 72h *p.i,* comparé à et 6h *p.i.* selon différents seuils de log2FC. CUTOFF 1 (log2FC<-1 et log2FC>1). 141
Figure 33 : Représentation des gènes dérégulés à 72h *p.i.*, comparé à 6h *p.i*. selon leur(s) catégorie(s) fonctionnelle(s) (COG), avec un CUTOFF de 1. 142
Figure 34 : Différence d'expression des gènes de *Lm* annotés comme étant Sigma B dépendants, entre 72h et 6h *p.i.* 146
Figure 35 : Principaux systèmes impliqués dans la résistance à l'acidité chez *Lm*. Le système GAD est le système Glutamate décarboxylase et le système ADI est le système Arginine déiminase. 147
Figure 36 : Expression des gènes appartenant au stressosome, impliqués dans la régulation du facteur Sigma B (d'après Dessaux et al., 2020). 148
Figure 37 : Phénotypes intracellulaires des mutants testés après 72h d'infection dans le modèle épithélial trophoblastique JEG-3. 152
Figure 39 : Cartes des plasmides pPL2 (a) et pPL2-PactA-RFP (b) (d'après Lauer et al., 2002 ; Zeldovich et al., 2011 ; Portman et al., 2017). 153
Figure 40 : Exemples des souches EGDe-P*lmo0254*-RFP et EGDe-P*lmo1263*-RFP après 72h d'infection dans le modèle cellulaire JEG-3. 154

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de vacuoles intracellulaires de *Lm* 40
Tableau 2 : Définitions des termes utilisés pour décrire les stratégies de survie des bactéries selon leur niche écologique (d'après Lotoux et al., 2022)..... 47
Tableau 3 : Exemples de déterminants moléculaires impliqués dans la formation de biofilm et indirectement dans la persistance chez *L. monocytogenes* (d'après Kocot et al., 2017)..... 51
Tableau 4 : Les 13 sérotypes de *L. monocytogenes* (d'après Seeliger & Höhne, 1979)..... 56
Tableau 5 : Transcriptomes des *Listeria* intracellulaires dans différentes conditions d'infection 137
Tableau 7 : Tableau des gènes dérégulés appartenant au COG des gènes de virulence. 143
Tableau 6 : Différence d'expression des gènes de virulence de EGDe-Δ*actA* appartenant au locus LIPI-1 (A) et *inlAB* (B) entre 6 h et BHI et 72h comparé à 6 h *p.i.*..... 143
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des mutants testés..... 149
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des gènes candidats selon leurs expressions log2fpkm et leurs log2FC entre 72 h et 6 h *p.i.* 151

LISTE DES ABREVIATIONS

µm	Micromètre
aa	Acide Aminé
ActA	Actin-assembly-inducing protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPK	AMP-activated kinase
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
ARN	Acide ribonucléique
ARNP	ARN Polymérase
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
ATG	Autophagy-Related genes
ATP	Adénosine triphosphate
BC	Benzalkonium chloride
BCAA	Branched-Chain Amino Acids
BHI	Brain Heart Infusion
Caco-2	Lignée cellulaire de carcinome colique humain
CALCOCO2	Calcium binding and coiled-coil domaine 2
Cbl	ubiquitine protéine ligase E3
CCV	*Coxiella*-Containing Vacuole
CC	Complexe Clonal
CDC	Cholesterol-Dependent Cytolysin
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFU	Colony forming unit
CK2	Caséine Kinase 2
CNR	Centre National de Référence
Crp/Fnr	cAMP receptor protein/fumarate and nitrate reduction regulator
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	cgMLST types
CTB	Cytotrophoblaste
Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
DDASS	Département Des Affaires Sanitaires et Sociales
DO	Densité Optique
E-cad	E-cadhérine
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
Ena/VASP	Enabled/Vasolator-stimulated phosphoprotein
GAD	Acide glutamique décarboxylase
GILT	Gamma-interferon-inductible lysosomal thio reductase
Glu (E)	Acide glutamique
GSH	Glutathion réduit
gshF	glutathione-synthase
GSSG	Glutathion sous forme disulfure-oxydée
GTP	Guanosine Triphosphate
GW	Domaine Glycine-Tryptophane
GWAS	Genome-wide association study
h	heure
HBSC	Hélène Bierne Strain Collection
HGF	Hepatocyte Growth Factor
Hsp60	Heat Shock Protein 60
HTH	Helix-Turn-Helix
IF	ImmunoFluorescence
iFABP-hcad	Intestinal Fatty Acid Binding Protein-human cadherin
IR	Inter-répétition
InlX	Internaline X
JEG3	Lignée épithéliale humain dérivé d'un carcinome de placenta
J.H.H Pirie	James Hunter Harvey Pirie
KIE16P	Knock-in Acide Glutamique-16-Proline
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1

LAP	*Listeria* Adhesion Protein
LAP	LC3-associated phagocytosis
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LCV	*Legionella*-Containing Vacuole
LLO	Listériolysine O
Lm	*Listeria monocytogenes*
Li	*Listeria ivanovii*
LIPI-°	*Listeria* Pathogenecity island-°
LisCV	*Listeria*-Containing Vacuole
LPXTG	Leucine-Proline-X-Thréonine-Glycine
LRR	Leucine Rich Repeat
LSS	Listériolysine S
MGEs	Mobile genetic elements
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLST	MultiLocus Sequence Typing
cgMLST	core genome MLST
wgMLST	whole genome MLST
MOI	Mulitplicity of Infection
MONALISA	Multicentric Observational National Analysis of LISteriosis & ListeriA
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
mTOR	Mammalian target of rapamycin
min	minute
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ncRNA	Noncoding RNA
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NLRX1	Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat containing X1
NOD	Nucleotide oligomerization domain
NOX	NADPH oxidase
NPF	Nucleation promoting factors
MVP	major vault protein
ORF	Open Reading Frame
Opp	Oligopeptide perméase
pb	Paires de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Pathogen-containing-vacuole
PC-PLC	Phosphatidyl-choline phospholipase C
PE_PGRS	Protein containing polymorphic GC-rich sequences
PFA	paraformaldéhyde
PFGE	Pulse-Field Gel Electrophoresis
pH	potentiel Hydrogène
p.i.	post-infection
PI-PLC	Phosphotidyl-inositol phospholipase C
PI3P	Phosphotidylinositol-3-phosphate
PMSC	Premature Stop Codon
PP	Plaque de Peyer
PrfA	Positive regulatory factor A
PRR	Prolin Rich Repeats
ProMED	Program for Monitoring Emerging Diseases
PTS	Phosphoénolpyruvate-carbohydrate-phosphotransférase
QACs	Quaternary ammonium compounds
qPCR	Quantitative PCR
RE	Reticulum endoplasmique
RFP	Red-fluorescent protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RTE-food	Ready-to-Eat food (aliment prêt à consommer)
RT-PCR	Reverse transcription PCR
SAM	S-adénosylméthionine
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SCV	Small Colony Variant
SH3	Src Homoly 3
σ_B	Sigma B factor
SL	Sublineage
SLAP	Spacious *Listeria*-containing phagosome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNVPhyl	Single Variant Phylogenomics
sp.	specie
SQSTM1	Sequestosome-1

Src	Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase
SrtA	Sortase A
ST	Sequence Type
ST	Serotype
SYN	Syncytiotrophoblaste
TEM	Microscopie électronique à transmission
TEV	Trophoblaste extra-villeux
TMH	Transmembrane Hairpin
TXSS	Type X Secretion System
ULK1	Unc-51-like kinase 1
5’ UTR	5' Untranslated Transcribed Region
VFDB	Virulence factors database
VBNC	Viable But Not Cultivable
WASP	Wiskott-Aldrich syndrom protein
WHO	World Health Organization
WT	Wild-type
WTA	Wall teichoic acid

INTRODUCTION

A. *Listeria monocytogenes:* la bactérie pathogène responsable de la listériose

1. Une découverte de près d'un siècle

La bactérie *Listeria monocytogenes* (*Lm*) a été décrite pour la première fois en 1926 par E.G.D. Murray, au sein du département de pathologie de l'Université de Cambridge. Isolée à partir de foies de lapins subitement morts de causes inexpliquées, mais présentant des nécroses du foie et des leucocytoses, ce sont ces principaux symptômes qui ont valu l'origine du nom de ce nouveau petit bacille infectieux : *Bacterium monocytogenes* (Murray et al., 1926). Un an plus tard, en 1927, la bactérie est de nouveau isolée chez des gerbilles. J.H.H Pirie attribuera à ce nouveau genre le nom de *Listerella*, en hommage au père de la chirurgie antiseptique, Joseph Lister (Pirie, 1940). *Listerella* étant déjà attribué au groupe des Mycétozoaires, le nom de *Listeria* sera suggéré par Pirie et sera finalement définitivement adopté en 1940 (Pirie, 1940).
La première infection signalée chez l'homme date de 1929, au Danemark (Nyfeldt, 1937). On note cependant l'observation de cas de « septicémies néonatales » et de « pseudotuberculoses », s'apparentant à des cas de listériose, en 1891 (Gray & Killinger, 1966), ainsi que l'isolement d'un organisme "diphtéroïde" à partir du liquide céphalo-rachidien d'un soldat français en 1919, confirmé 20 ans plus tard comme étant *Lm* (Dumont & Cotoni, 1921 ; Mclauchlin et al., 1986). À la suite de ces épisodes, quelques cas sporadiques sont signalés chez l'homme sous la forme, entre autres, d'infections périnatales ou de méningites, sans pouvoir en retrouver la cause (Gray & Killinger, 1966). Il faudra attendre 1981 pour que le lien entre l'ingestion d'aliments contaminés et la listériose soit établi, lors d'une épidémie au Canada, après ingestion de chou cru (Schlech et al., 1983).

2. Position taxonomique

Le genre *Listeria* est regroupé avec le genre *Brochontrix* dans la famille des *Listeriaceae*, l'ordre des *Bacillales,* classe des *Bacilli* et *phylum* des Firmicutes. Depuis 2009, le nombre d'espèces attribué au genre *Listeria* a quadruplé, passant de 6 à 27 espèces (Carlin et al., 2022). Les espèces de *Listeria* sont divisées en 2 clades : « *Listeria sensu stricto* » (clade I) et « *Listeria sensu lato* » (clade II).
L. monocytogenes, *L. innocua*, *L. ivanovii (Liv)*, *L. seeligeri, L. welshimeri, L. marthii*, *L. immobilis, L. cossartiae, L. farberi* et *L. swaminathanii* appartiennent au clade I (Murray et al.,

1926 ; Seeliger, 1981 ; Rocourt et al., 1983 ; Graves et al., 2010 ; Carlin et al., 2022). Sur l'ensemble de ces espèces, seules *Lm* et *Liv* sont pathogènes, *Liv* étant plus fréquemment pathogène pour les animaux et les ruminants et *Lm* pour l'homme (Seeliger et al., 1984 ; Alexander et al., 1992 ; Bagatella et al., 2022).

Le clade II regroupe les espèces : *L. grayi, L. fleischmannii, L. floridensis, L. aquatica, L. newyorkensis, L. cornellensis, L. rocourtiae, L. grandensis, L. riparia, L. weihenstephanensis, L. booriae, L. goaensis, L. thailandensis, L. costaricensis, L. portnoyi, L. rustica et L. valentina* (Rocourt et al., 1992 ; Leclercq et al., 2010 ; Bertsch et al., 2013 ; Halter et al., 2013 ; den Bakker et al., 2014 ; Weller et al., 2015 ; Doijad et al., 2018 ; Núñez-Montero et al., 2018 ; Querada et al., 2020 ; Carlin et al., 2022).

3. Caractères d'identification bactériologique

Listeria monocytogenes (Lm) est un bacille de petite taille (0,5 à 2 µm de longueur et de 0,4 à 0,5 µm de diamètre) à coloration Gram positive, isolé ou en chaînettes, non sporulé et non capsulé. La bactérie est mobile à 20-25°C par flagellation péritriche, et immobile à 37°C (ANSES, 2020). Chez l'hôte, à une température de 37°C, *Lm* utilise MogR pour réprimer l'expression des protéines flagellaires, empêchant donc la production de flagelles. À l'extérieur de l'hôte ou dans l'environnement, la formation de flagelles est rendue possible par l'anti-répresseur GmaR qui inactive MogR. C'est donc un système thermo-régulé (Williams et al., 2005 ; Lebreton et Cossart, 2017).

Lm est anaérobie facultative et micro-aérophile, catalase-positive pour la majorité des souches, négative pour l'oxydase et capable de fermenter de nombreux glucides sans production de gaz. Les souches *Lm* sont toujours D-xylose-négatives et produisent des lécithinases. Elles sont également ß-hémolytiques et L-rhamnose-positives (ANSES, 2020). En termes de conditions de culture, ce n'est pas un microorganisme très exigeant et il peut former des colonies translucides, à reflets bleutés, sur gélose nutritive entre 24 h et 48 h, à 37°C.

Lm a la capacité de se multiplier à basse température (0 – 45°C), avec une température optimale de 37°C. Elle peut également tolérer une large gamme de pH (4,0 – 9,6) et une pression osmotique importante avec des fortes concentrations en sel (<12%) (Thevenot et al., 2006 ; Chen et al., 2019 ; ANSES, 2020).

Des milieux de culture spécifiques pour la détection de *Listeria* existent. Par exemple, on peut citer les géloses sélectives du genre *Listeria* telles que PALCAM ou Oxford, ou sélectives de l'espèce *Lm* avec la gélose ALOA-Agar *Listeria* ou "Rapid L'mono".

4. Niches écologiques : un pathogène ubiquitaire

Lm est omniprésente dans l'environnement et possède une capacité d'adaptation remarquable à différents écosystèmes (**Figure 1**). Elle utilise 70% de son génome pour s'adapter et engager une réponse spécifique aux environnements qu'elle rencontre (Glaser et al., 2001). Elle a déjà été isolée dans des environnements naturels tels que les fermes, les sols, les eaux des rivières et des lacs, les ensilages, les égouts, les effluents agricoles et les prairies, dans une variété d'aliments destinés à l'alimentation humaine, ainsi que dans le tractus digestif d'hôtes de diverses espèces, incluant l'homme (**§A.6**) (Vivant et al., 2013 ; Quereda et al., 2021).

Sa capacité à tolérer un large éventail de conditions environnementales défavorables (température et pH) et ses exigences nutritives modérées lui permettent de survivre et de persister dans diverses niches écologiques, y compris les environnements réfrigérés, salés et soumis à des traitements désinfectants (Ryan et al., 2008 ; Querada et al., 2021). Ces différentes aptitudes font de *Lm* un archétype important de l'approche "One Health" des maladies infectieuses, qui reconnaît l'interconnexion entre la santé humaine, animale et les écosystèmes environnementaux (**Figure 1**) (Lotoux et al., 2022).

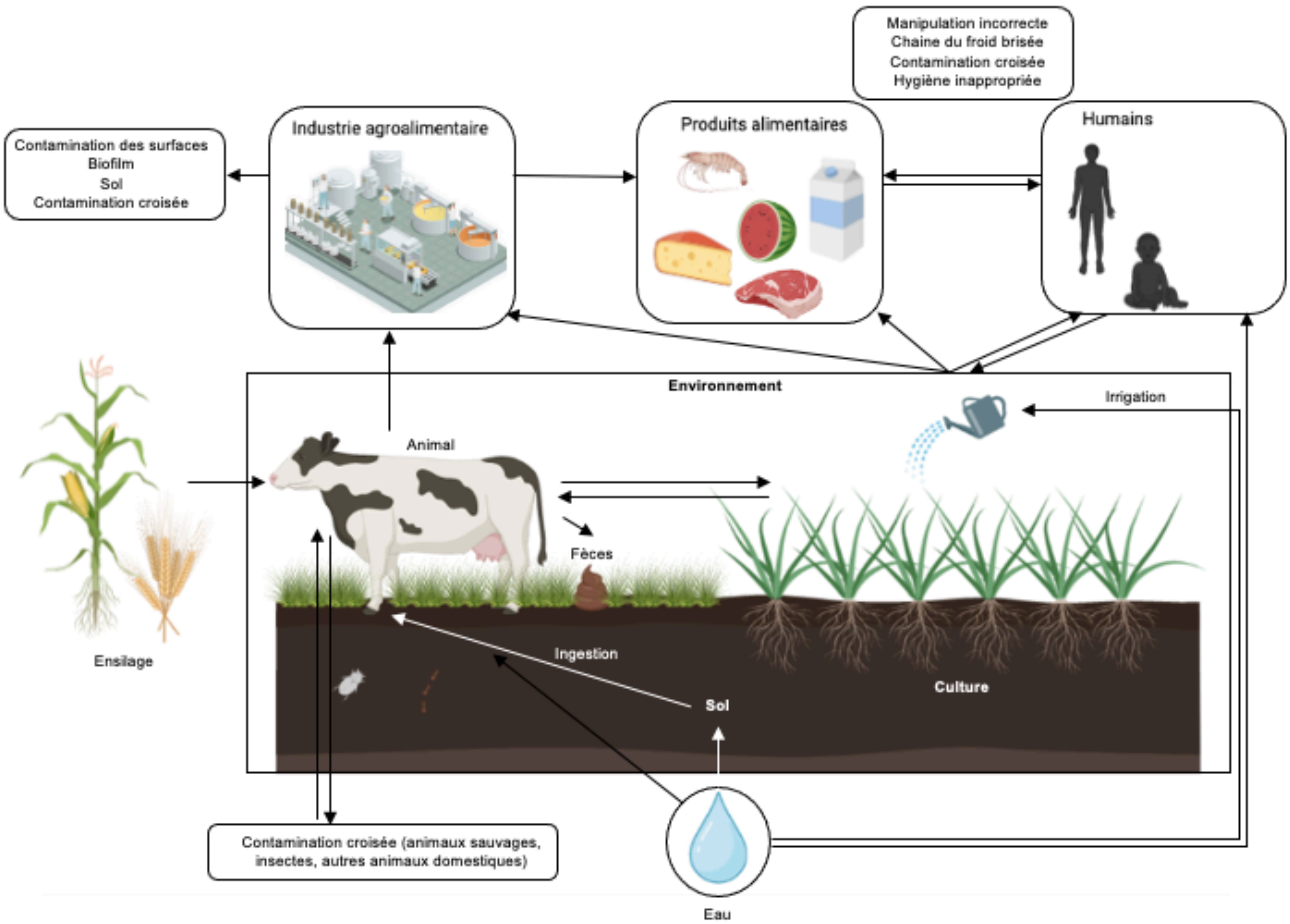


Figure 1 : Sources de contamination de *L. monocytogenes* (adapté de Quereda et al., 2021). Scénarios de contaminations/transmissions possibles entre le sol, l'eau, les cultures, l'ensilage, les produits de consommation destinés à l'alimentation humaine, l'animal, l'homme et l'environnement. Les transmissions potentielles entre les différents acteurs sont indiquées par des flèches.

5. Pathogénicité : la listériose

5.1 La listériose humaine

5.1.1 Données épidémiologiques

La listériose est une maladie rare, principalement sporadique, qui concerne généralement un ou deux cas isolés (Desai et al., 2019). Plus rarement, elle peut concerner un groupe de personnes, voire provoquer de véritables épidémies. Malgré sa faible prévalence chez l'homme (5 – 6 cas par million d'habitants, en France, Santé Publique France, 2022), *Lm* présente un risque majeur pour la santé publique, en raison de son taux de mortalité élevé chez les individus fragiles (2ème cause de mortalité d'origine alimentaire en France, Santé publique France, 2022), et 20 - 30 % de mortalité selon l'Organisation Mondiale de la Santé (*World Health Organization*, 2018).

Une étude récente a comptabilisé 126 évènements épidémiques dans 30 pays entre 1996 et 2016, selon les bases de données du programme de surveillance des maladies émergentes ProMED (Desai et al., 2019). Malgré des cas majoritairement sporadiques, certaines épidémies ont pris une ampleur importante. En 2017, l'Afrique du Sud a été marquée par plus de 1060 cas dont 20 % de décès, avec des produits carnés comme origine de contamination (Rapport du NICD, Juillet 2018, Kaptchouang Tchatchouang et al., 2020). La dernière épidémie en date et encore sous surveillance active concerne des glaces à la vanille dans la ville de Fredericksburg, Ohio en Floride. On enregistre à ce jour 24 hospitalisations et 1 décès (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2022). En France, l'épidémie la plus importante date de 1992, avec 279 cas et 28% de mortalité, due en partie à la consommation de langue de porc en gelée (Rocourt et al., 1993).

Par ailleurs, la demande croissante de produits frais, prêts à être consommés et sans ajout d'additifs, fait de *Lm* l'un des risques microbiens majeurs associés à ces nouvelles pratiques alimentaires. Ces dernières années, plusieurs épidémies apparaissent après l'ingestion de légumes ou de fruits crus, fraîchement coupés, comme en Europe avec la consommation de maïs doux congelé (2015-2018 ; 53 cas, 10 décès) et aux Etats-Unis après la consommation de champignons enoki (2020, 36 cas, 4 décès) (McLauchlin et al., 2021 ; Lotoux et al., 2022 ; https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.htlm).

5.1.2 Transmission, manifestations cliniques et traitements

La transmission de la listériose se fait principalement par voie digestive après l'ingestion d'aliments contaminés. Des travaux suggèrent d'autres cas de transmissions beaucoup plus rares tels que des transmissions verticales entre la femme enceinte et le fœtus *in utero*, après accouchement par contamination vaginale ou des transmissions par contact responsables d'infections cutanées ou de conjonctivites (Betriu et al., 2001 ; Lamont et al., 2011 ; Bajor et al., 2016 ; Rees et al., 2017 ; Lamond et al., 2018 ; Pägelow et al., 2018).

Chez les sujets immunocompétents, *Lm* peut entrainer une listériose non-invasive, caractérisée par une gastro-entérite fébrile et des symptômes qui disparaissent au bout de quelques jours, sans traitement (**Figure 2**) (Donovan et al., 2015).

La listériose invasive, beaucoup plus grave et plus rare, concerne principalement des sujets présentant divers facteurs à risque comme un âge avancé, une déficience immunitaire, une tumeur maligne, une infection au VIH, une cirrhose, du diabète, de l'alcoolisme ou un traitement immunosuppresseur. Elle est classée en 3 formes : septicémie, neurolistériose et infection materno-fœtale ou néonatale (chez les femmes enceintes) (Charlier et al., 2017), en lien avec la capacité de *Lm* à franchir la barrière intestinale, la barrière hémato-encéphalique et la barrière fœto-placentaire (Lecuit et al., 2001).

Chez la femme enceinte, les risques de développer la listériose sont augmentés d'un facteur 18 et les cas d'infections materno-fœtales représentaient 13% des cas de listériose en France entre 2009 et 2013, selon l'étude MONALISA (*Multicentric Observational National Analysis of LISteriosis and ListeriA*) (Charlier et al., 2017). L'infection chez la mère se manifeste principalement de manière asymptomatique ou par des symptômes pseudo-grippaux légers.

Pourtant, la listériose peut être grave pour le fœtus (mort intra-utérine, naissance prématurée ou infection néonatale) dans 80% des cas de listériose materno-fœtale (**Figure 2**). Le diagnostic de la listériose materno-fœtale repose sur la présence de bactéries dans les prélèvements génitaux, placentaires, le sang maternel ou du nouveau-né, après culture sur gélose. Or, dans 50% des cas, l'hémoculture à partir du sang maternel reste négative (Charlier et al., 2017).

De plus, la durée d'incubation moyenne de la listériose peut être longue, jusqu'à 3 mois entre l'ingestion de l'aliment contaminé et la déclaration des premiers symptômes ce qui suggère une phase asymptomatique chez l'hôte. La **Partie A.6** de ce manuscrit est consacrée au portage asymptomatique de *Lm* chez l'homme et les animaux. Les mécanismes associés à ce portage ne sont toujours pas compris. Plusieurs hypothèses sont présentées dans notre revue, en particulier

la persistance intracellulaire du pathogène dans les tissus qui peut adopter un état indétectable par les tests de détection classiques notamment l'état *viable but not cultivable* (VBNC) (**§C.5)** (Lotoux et al., 2022). En conséquence de ces longues périodes d'incubation, il peut y avoir des prises en charge tardives et des mauvais diagnostics pouvant conduire à des fausses-couches, et des difficultés pour l'identification de l'origine de l'aliment contaminé, pouvant générer d'autres infections (Allerger & Wagner, 2010, Goulet et al., 2013).

Le traitement antibiotique le plus souvent préconisé lors de la listériose combine en général l'ampicilline et la gentamicine pour les personnes immunodéprimées ou atteintes de méningite. Le triméthoprime-sulfaméthoxazole est une alternative pour les patients intolérants à la gentamicine ou à l'ampicilline. La durée recommandée du traitement est de 10 à 14 jours pour une infection sanguine et de 14 à 21 jours pour une méningite (Donovan et al., 2015).

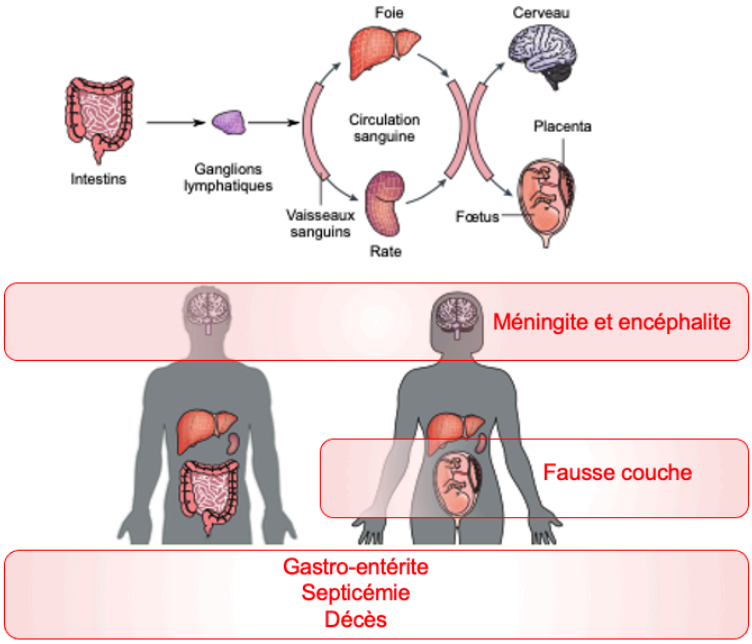


Figure 2 : Schéma de l'infection par *L. monocytogenes* chez l'homme. Suite à l'ingestion d'aliment contaminé, *Lm* peut traverser la barrière intestinale puis circuler dans l'organisme *via* la circulation sanguine et cibler certains organes tels que le foie et la rate. Chez les individus les plus fragiles, elle peut également traverser la barrière hémato-encéphalique et la barrière fœto-placentaire pour coloniser le cerveau et le fœtus, chez les femmes enceintes. Finalement, elle peut être responsable de symptômes légers chez les individus immunocompétents mais peut être létale chez les individus immunodéprimés.

5.1.3 Incidence à l'échelle nationale et internationale

La listériose entraîne le plus grand nombre d'hospitalisations et le plus haut taux de létalité parmi toutes les zoonoses d'origine alimentaire en Europe (Europe Food Safety et al., 2021), ainsi qu'aux Etats-Unis (Scallan et al., 2011). En France, la listériose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1999. Le Centre National de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur centralise et caractérise toutes les souches isolées dans des cas cliniques et dans les laboratoires de microbiologie, à l'échelle du territoire. La déclaration obligatoire permet aux médecins de la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) de recueillir des informations sur les patients touchés et sur les aliments ingérés, ce qui permet de suivre l'évolution des contaminations. Ces informations ont d'ailleurs permis les travaux dans le cadre du projet MONALISA, qui a établi un modèle de prédiction du pronostic vital des patients à partir des caractéristiques cliniques de la listériose une fois déclarée (Charlier et al., 2017).

En 2020, la listériose était la cinquième zoonose la plus fréquemment signalée (1876 cas), touchant principalement les personnes âgées de plus de 64 ans, avec une incidence croissante (Rapport EFSA/ECDC 2020). En effet, si l'incidence a diminué à la fin du XXème siècle, notamment à la suite des campagnes de sensibilisation pour les femmes enceintes, elle augmente depuis ces dernières années et se stabilise désormais autour des 400 cas par an, en France (Rapport d'activité du CNR *Listeria* de 2019). Cette augmentation s'explique notamment par une hausse de la consommation des plats prêts à consommer (*Ready-To-Eat foo, RTE*), exposés à de multiples contacts avec *Lm*, par les surfaces, les préparateurs et les matières premières, et seulement réfrigérés à des températures de multiplication permissives pour *Lm* (Tabit, 2017). En raison du manque de connaissance de la dose infectieuse exacte responsable des cas de listériose, l'agence américaine *Food Safety Inspection Service* a établi une politique de "tolérance 0" concernant la présence de *Lm* dans les aliments, en particulier les produits RTE, depuis 1989 (0 bactérie dans les échantillons 5 x 25g). Cette politique est toujours appliquée aujourd'hui (Archer, 2018).

5.1.4 Mécanisme d'infection de l'organisme

a. *Pénétration par voie digestive et traversée de la barrière intestinale*

Après ingestion d'un aliment contaminé, *Lm* peut franchir la barrière intestinale notamment grâce à sa capacité à induire son internalisation dans des cellules non-phagocytaires (InlA-dépendant) (**Figure 3**). Il est important de constater que l'invasion par *Lm* dépend de la lignée

cellulaire étudiée mais également de l'état d'immortalisation cellulaire. En effet, *Lm* rentre jusqu'à 100 fois plus dans des lignées intestinales comme Caco-2, comparées à des cellules primaires dérivées d'un iléon porcin (Velge et al., 1994).

Dans les cellules non-phagocytaires, *Lm* interagit principalement avec le récepteur E-cadhérine (E-cad) des cellules épithéliales, majoritairement peu accessible dans la lumière intestinale car impliqué dans des jonctions adhérentes situées sous les jonctions serrées. *Lm* ne perturbe pas activement les jonctions serrées mais trouve la E-cad accessible dans certains sites d'irrégularité de l'épithélium tels que les sites d'extrusion cellulaire à l'apex des villosités, aux jonctions entre les cellules caliciformes (sécrétrices de mucus) et les entérocytes adjacents ou dans les replis des villosités, ce qui lui permet d'entrer dans les cellules (Pentecost et al., 2006, 2010 ; Nikitas et al., 2011). Dans les cellules caliciformes, la bactérie est ensuite retrouvée dans une vacuole transférée au pôle basal par un mécanisme de type transcytose puis relarguée dans la *lamina propria* (Lecuit et al., 2001 ; Nikitas et al., 2011 ; Ribet et al., 2015 ; Kim et al., 2021) (**§B.3.2.1, Figure 3.B**).

Lm est également capable d'induire un dysfonctionnement de la barrière intestinale pour faciliter sa translocation *via* la voie LAP (*Listeria Adhesion Protein*). Après engagement de son récepteur de surface *Heat Shock Protein* 60 (Hsp60), LAP active la signalisation canonique *nuclear factor kB* (NF-kB), qui facilite l'ouverture de la barrière épithéliale en redistribuant les protéines de jonction claudine-1, occludine et E-cad (Drolia et al., 2018). Enfin, *Lm* peut traverser *via* un mécanisme non spécifique (InlA-indépendant) et une efficacité moindre, *via* les cellules M au niveau des plaques de Peyer (PP) (Jensen et al., 1998 ; Chiba et al., 2011). Il a été démontré que cette invasion déclenche la réponse de l'hôte et conduit à une augmentation de la prolifération des entérocytes et une diminution de la maturation des cellules caliciformes, réduisant ainsi l'accessibilité à l'E-cad (Disson et al., 2018).

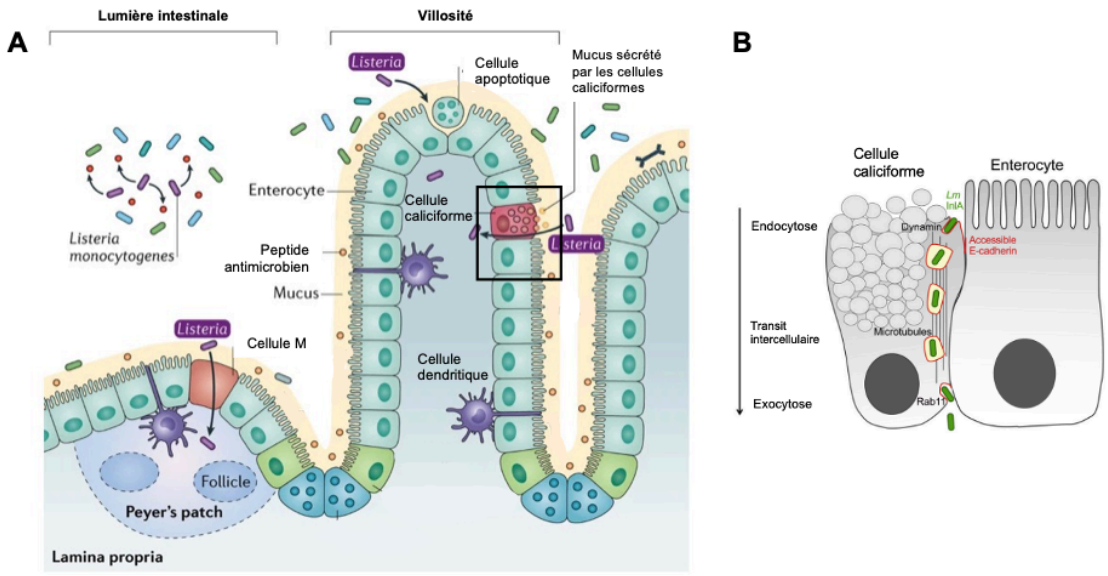


Figure 3 : Schéma de la traversée de la barrière intestinale par *L. monocytogenes* (d'après Radoshevich & Cossart, 2018 et Kim et al., 2021). A. Une fois dans la lumière intestinale, *Lm* (violet) lutte contre les systèmes de défense de l'intestin tels que la sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens, et contre les bactéries du microbiote intestinal. En parallèle, *Lm* peut traverser les villosités intestinales *via* la E-cad exposée à la surface des entérocytes dans la région des cellules apoptotiques ou à la jonction avec les cellules caliciformes (rose et **B**). Elle peut également traverser l'épithélium par translocation dans les cellules M (orange) des plaques de Peyer. **B.** Traversée par transcytose de *Lm* (vert) dans les cellules caliciformes proposée dans un modèle *ex vivo* intestinal.

b. *Dissémination dans l'organisme*

Une fois dans la *lamina propria*, *Lm* dissémine dans l'organisme *via* la circulation lymphatique puis sanguine vers le foie et la rate (**Figure 2**) (Melton-Witt et al., 2012). La dissémination vers le foie est possible par deux voies : directement à travers la veine porte hépatique depuis l'intestin ou de façon indirecte depuis la rate ou les ganglions mésentériques (Melton-Witt et al., 2012). La bactérie atteint la moelle osseuse, le foie et la rate, où la majorité des bactéries sont phagocytées par les macrophages. Dans le foie, *Lm* se réplique rapidement dans les macrophages résidents et envahit les hépatocytes. La maladie à ce stade est souvent contrôlée chez les sujets immunocompétents qui feront une infection *a minima*, souvent asymptomatique. Cependant, si l'inoculum est important ou en cas de réponse immunitaire défaillante, l'infection n'est plus contrôlée et la bactérie se retrouve dans le sang, où elle peut disséminer vers d'autres organes cibles tels que le cerveau ou le placenta, chez les individus immunodéprimés et les femmes enceintes.

c. *Infection du Système Nerveux Central (SNC)*

Chez l'adulte, l'infection du système nerveux central se manifeste principalement par une méningo-encéphalite (infection des méninges et du cerveau). Des travaux récents montrent que la neuroinvasion est principalement médiée par l'Internaline B (InlB) (**§B.2.1)**, qui protège les monocytes infectés de la mort cellulaire, ce qui favorise le transfert des *Lm* des monocytes vers le cerveau (Maudet et al., 2022).

d. *Passage transplacentaire*

Le placenta est un organe spécifique de la grossesse et transitoire, puisqu'il est expulsé lors de l'accouchement. Il assure beaucoup de fonctions dont la sécrétion d'hormones nécessaires au développement du fœtus, l'apport d'énergie par divers mécanismes, l'évacuation des déchets et le maintien d'une balance immunitaire entre la protection et le non-rejet du fœtus (Maltepe & Fisher, 2015). Au cœur de ses fonctions, on retrouve les cellules trophoblastiques, des cellules épithéliales dérivées de la couche externe du blastocyste (trophectoderme ou chorion) qui jouent un rôle clé dans l'ancrage du blastocyste dans le tissu utérin maternel. Divers sous-types de trophoblastes se spécialisent dans des fonctions distinctes : le syncytiotrophoblaste (SYN) est un syncytium formé à partir des cytotrophoblastes sous-jacents (CTB), qui couvre une partie des villosités choriales et baigne dans le sang maternel pour permettre les échanges de nutriments. Les trophoblastes extra-villeux (TEV) sont situés à l'extrémité des villosités placentaires permettant l'ancrage dans l'endomètre. Enfin, les trophoblastes endovasculaires, qui sont des TEV différenciés, alimentent le placenta en sang maternel *via* le tissu décidual provenant de l'endomètre et maximisent la surface d'échange (**Figure 4**) (Johnson et al., 2021). Les mécanismes spécifiques de la transmission transplacentaire restent peu compris. Plusieurs études exposent quelques arguments sur le rôle coopératif de InlA et InlB, et de la contribution de LLO, ActA et InlP (Vasquez-Boland et al., 2017 ; Charlier et al, 2020).

Ainsi, *Lm* a la capacité de traverser diverses barrières protectrices comme la barrière intestinale, la barrière hémato-encéphalique et la barrière fœto-placentaire, ce qui en fait un pathogène redoutable (Radoshevich and Cossart, 2018).

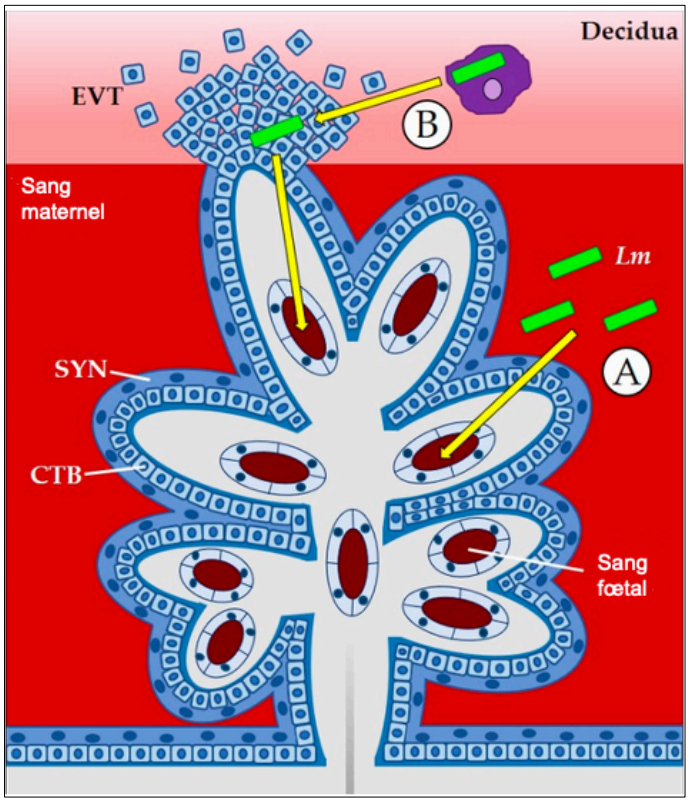


Figure 4 : Passage de la barrière fœto-placentaire par *Listeria monocytogenes* (d'après Lamond & Freitag, 2018). *Lm* (bâtonnet vert) peut envahir le placenta directement par les syncytiotrophoblastes (SYN), **(A)** ou après colonisation de la *decidua* ou au sein des leucocytes maternels vers les cytotrophoblastes (CTB) extravilleux **(B)**.

5.2 La listériose animale

L'espèce *monocytogenes* est non seulement pathogène pour l'homme mais aussi pour les animaux (zoonose), tandis que *L. ivanovii* a également été identifiée comme pathogène, mais majoritairement chez les ruminants (Liu, 2008). *Lm* a été retrouvée chez plus de 40 espèces d'animaux, domestiques et sauvages incluant certains oiseaux et poissons (Fenlon, 1985 ; Karunasagar, 2000). La contamination semble principalement d'origine végétale, en lien avec la saisonnalité des contaminations bovines, caprines et ovines, observée dans l'hémisphère nord, qui coïncide avec l'alimentation de type ensilage (décembre - mai) (Pauly et al., 2003 ; Queiroz et al., 2018). On observe également une hausse de l'infection durant la période hivernale qui correspond à la mise en stabulation des animaux (Nightingale et al., 2005). Les fourrages mal conservés humides ou trop grossiers peuvent favoriser les contaminations animales (Driehuis, 2018).

Les formes cliniques de la listériose animale sont, comme chez l'homme, principalement subcliniques avec des symptômes légers comme des perturbations respiratoires, des mammites, des fièvres, des gastro-entérites et des ophtalmies (Dhama et al., 2015). Néanmoins, on peut observer des formes sévères telles que des avortements spontanés, des entérites, des septicémies, des encéphalites (méningoencéphalite ou "*cercling disease*") (Rawool et al., 2007 ; Ryseur & Marth, 2007 ; Dhama et al., 2015). L'infection du système nerveux peut également adopter des formes de paralysies ipsilatérales de la face, perte de reflexes et présence de nystagmus (mouvement involontaire des yeux) (Nightingale et al., 2004 ; Dill & Rissi, 2014).
Les aliments issus des animaux contaminés sont des sources de contaminations potentielles pour l'homme, en particulier le lait, les produits issus de lait cru ou la viande crue ou mal cuite (Oliver et al., 2005 ; Ricchi et al., 2019). Il existe également une forme inhabituelle de listériose cutanée, une éruption pyogranulomateuse observée chez les agriculteurs ou les vétérinaires, contractée par exposition directe à des lochies infectées (écoulements utérins post-accouchement), à du placenta ou des fœtus avortés provenant de cas materno-fœtaux chez les ruminants (McLauchlin et al., 1994 ; Koopmans et al., 2022).

6. Portage asymptomatique chez l'homme et les animaux

Lm est un contaminant courant des denrées alimentaires et les individus semblent fréquemment exposés (plusieurs fois par an dans les pays occidentaux) (Ricci et al., 2018). La listériose a touché 1876 individus recensés en Europe en 2020 et représente la zoonose avec le taux de mortalité le plus élevé en Europe (10%) (Shoder et al., 2022). Pourtant, l'incidence de la listériose invasive est extrêmement faible avec 0.28 et 0.6 cas pour 100 000 individus aux Etats-Unis et en France, respectivement (Scallan et al., 2011 ; Pohl et al., 2019). S'il est connu que la listériose se déclare principalement chez les individus immunodéprimés, ces données suggèrent l'existence d'un portage ou d'une colonisation intestinale silencieuse, sans déclaration de symptômes chez une partie de la population (Bierne et al., 2018 ; Lotoux et al., 2022).
La plupart des études ont recherché *Lm* chez les individus malades, pourtant d'autres travaux démontrent l'existence d'un portage fécal asymptomatique chez l'homme et les animaux sains, qui pourraient constituer un réservoir important du pathogène et contribuer à sa dispersion dans l'environnement par le biais des excrétions fécales (Schuchat et al., 1991 ; Grif et al., 2001 ; Sauders et al., 2005 ; Zundel et al., 2006 ; Hafner et al., 2021). Chez les animaux, la prévalence peut parfois atteindre 30 à 40%, particulièrement dans la matière fécale de bovins sains (Weber et al., 1995 ; Hurtado et al., 2017). Dès les années 1960, Gray et Killinger (1966) ont cité 37

espèces de mammifères chez lesquelles ce pathogène a été isolé dans les fèces (Gray & Killinger, 1966). *Lm* est également présente chez de nombreuses espèces de mammifères sauvages (rats, lièvres, hérissons, blaireaux, cerfs entre autres), aquatiques (dauphin) et domestiques (chiens, chats, moutons, chèvres, porcs, lapins entre autres) (Lotoux et al., 2022). Une revue récente discute plus en détail du portage asymptomatique de *Lm* chez les animaux domestiques et sauvages (Schoder et al., 2022).

Chez l'homme, les travaux récents de Hafner et coll., ont mentionné que *Lm* pouvait être détectée dans 10% d'échantillons de fèces humains, parmi une cohorte indépendante de 900 donneurs asymptomatiques (Hafner et al., 2021). Cette détection est basée sur une méthode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), plus sensible que les méthodes de culture classiques généralement utilisées, mais qui ne discrimine pas les cellules vivantes des mortes. De manière intéressante, *Lm* est la plus fréquemment retrouvée dans les échantillons fécaux, associée à une signature spécifique du microbiote de l'hôte "infecté", suggérant un lien entre la pathogénicité et le portage asymptomatique (Hafner et al., 2021). Des études antérieures utilisant des méthodes de détection de *Lm* basées sur la culture ont mis en évidence entre 0,2% et 3,6% de selles positives pour *Lm* chez des volontaires sains (Grif et al., 2001). Une étude récente a également mis en évidence la contribution d'InlB dans un mécanisme qui permet de prolonger la durée de vie des cellules infectées par *Lm*, qui se traduit par une propagation accrue de *Lm* dans les tissus de l'hôte, dont le cerveau (Maudet et al., 2022). Cette propriété contribue également à une excrétion plus importante de *Lm* dans la lumière intestinale ainsi que dans les fèces favorisant ainsi son passage et sa présence dans l'environnement (Maudet et al., 2022).

Outre des portages fécaux, suggérant un passage transitoire le long du système digestif, *Lm* a déjà été retrouvée dans le lait de vaches et de chèvres en bonne santé (Bourry et al., 1997 ; Conly & Johnston, 2008 ; Pang et al., 2018). Ces observations suggèrent qu'il existe non seulement un portage asymptomatique fécal mais également d'autres types de niches que le tractus intestinal comme ici les glandes mammaires chez les bovins (Pang et al., 2018). La phase asymptomatique de la listériose invasive (i.e. la période d'incubation), en particulier lorsqu'elle est associée à une grossesse, peut aussi durer jusqu'à 3 mois selon les travaux de Goulet et al., (2013) et Angelo et al., (2016). Durant cette phase, dans la majorité des cas de listériose materno-fœtale, les femmes ne présentent peu ou pas de symptômes (Charlier et al., 2020) et l'hémoculture reste négative dans environ la moitié des cas testés (Charlier et al., 2017). On peut donc s'interroger sur la pertinence et la sensibilité des méthodes de détection des bactéries

impliquées dans cette phase asymptomatique, et sur l'existence d'une niche "cachée" dans l'hôte durant la période d'incubation. Ce problème de dépistage est particulièrement critique puisque la détection se fait généralement lors du troisième trimestre (Charlier et al., 2020), lorsqu'il est déjà trop tard et que l'infection peut conduire à un avortement. La détection de *Lm* chez la femme enceinte plus tôt lors de la grossesse pourrait prévenir certaines fausses-couches.

Cependant, les mécanismes associés à cette phase asymptomatique restent mal compris. Certains auteurs montrent que les souches de *Lm* qui portent les formes tronquées de l'InlA peuvent être plus fréquemment associées au portage asymptomatique (Maury et al., 2016 ; Schoder et al., 2022). Nos travaux proposent plusieurs hypothèses sur les formes de persistance de *Lm* lors de la phase asymptomatique, notamment l'existence de bactéries dans un état dit *viable but not culturable* (VBNC) et d'une niche de persistance chez l'hôte (LisCV) (**§B.3.2**). Ces hypothèses sont présentées dans notre revue "The Viable But Non-Culturable State of *Listeria monocytogenes* in the One-Health *continuum*" présentée en **Annexe I**.

B. *Listeria monocytogenes* : un pathogène intracellulaire facultatif

1. Processus d'infection intracellulaire de *Listeria monocytogenes*

Lm est une bactérie intracellulaire facultative qui dispose d'un arsenal de facteurs de virulence lui permettant d'infecter son hôte. Les nombreux travaux sur l'invasion et la réplication de *Lm* dans différents types cellulaires ont révélé l'extraordinaire adaptation de ce pathogène pour déjouer les mécanismes de défense de l'hôte, assurer sa survie intracellulaire et se multiplier en se propageant dans les tissus de l'hôte (Hamon, Bierne & Cossart, 2006). *Lm* peut survivre dans les cellules phagocytaires comme les macrophages et les cellules dendritiques, et également envahir et se multiplier dans les cellules non-phagocytaires comme les cellules épithéliales, endothéliales, les hépatocytes et les fibroblastes (Pizarro-Cerdà & Cossart, 2018 ; Descoeudres et al., 2021). Suite à une étape initiale d'adhésion à la surface de la cellule hôte puis d'internalisation, *Lm* peut s'échapper de sa vacuole primaire d'entrée *via* la sécrétion d'une toxine créant des pores dans la membrane (**Figure 5**). Une fois dans le cytosol, elle peut se multiplier et utiliser le cytosquelette d'actine de l'hôte afin de se mouvoir dans la cellule, puis de disséminer de cellule à cellule en générant des protrusions membranaires. Dans la cellule adjacente, elle se retrouve dans une vacuole secondaire à double membrane dont elle s'échappe de nouveau puis initie un nouveau cycle d'infection (Portnoy et al., 2002 ; Lebreton, Bierne & Cossart, 2012).

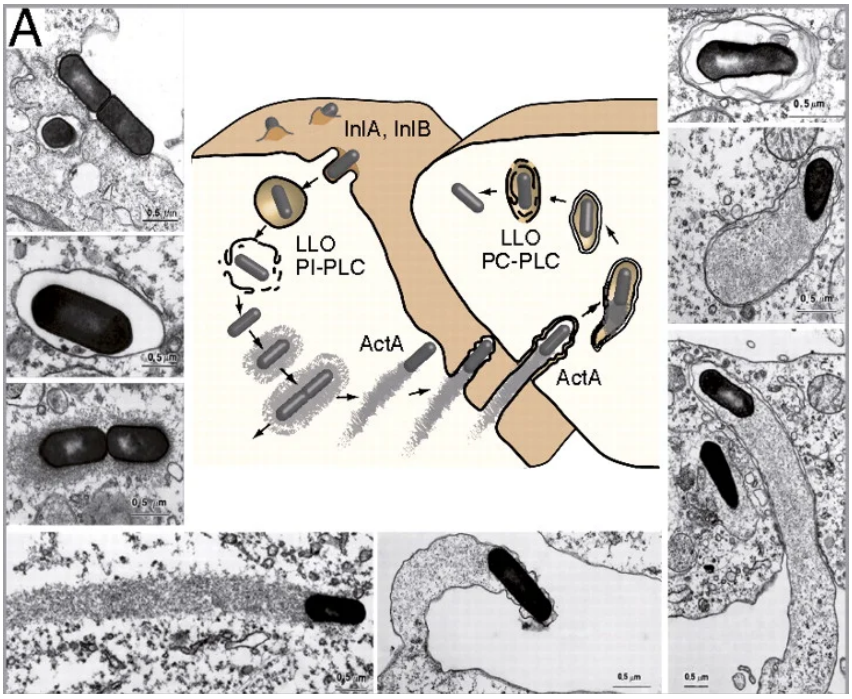


Figure 5 : Représentation schématique du cycle intracellulaire de *L. monocytogenes* et images de microscopie électronique représentant chaque étape du cycle (d'après Cossart, 2011). *Lm* induit son internalisation dans les cellules épithéliales par un processus dépendant des Internalines A et B (InlA, InlB). Les bactéries sont internalisées dans une vacuole, d'où elles peuvent s'échapper en sécrétant deux phospholipases (PI-PLC) et une toxine formant des pores dans la membrane, la Listériolysine O (LLO). *Lm* est libérée dans le cytoplasme où elle se multiplie et polymérise l'actine grâce à sa protéine de surface ActA. La polymérisation d'actine qui a lieu à un pôle de la bactérie va propulser celle-ci dans le cytosol. Lorsque *Lm* atteint la membrane cellulaire, elle forme une protrusion membranaire lui permettant d'atteindre la cellule voisine. Le cycle se répète dans les cellules voisines après la sortie de la vacuole à double membrane. La polymérisation d'actine est aisément observée grâce à la présence de queues d'actine caractéristiques.

2. Déterminants bactériens impliqués dans la vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes*

Le processus d'infection de *Lm* et les facteurs bactériens impliqués sont bien caractérisés, du fait de l'essor des techniques de biologie moléculaire, des progrès en matière de séquençage et de l'utilisation de modèles d'études innovants (modèle murin humanisé, par exemple). L'ensemble de ces progrès techniques a permis l'identification de plus de 50 facteurs de virulence. Cependant, certains restent encore à élucider (Glaser et al., 2001 ; Toledo-Arana et al., 2009 ; Jason David et al., 2018 ; Gouin et al., 2019 ; Meza-Torres et al., 2021). Une synthèse de ces différents facteurs est disponible sur le site VFDB (*Virulence factors database*, http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Listeria), le site BIGSdb-Pasteur (https://bigsdb.pasteur.fr/) (Moura et al., 2016) et dans des revues récentes (Camejo et al., 2011 ; Radoshevich & Cossart, 2018). Dans la suite du manuscrit, je me consacrerais aux principaux gènes de virulence situés sur deux régions distinctes du chromosome bactérien : l'îlot de pathogénicité « *Listeria* Pathogenicity-1 (LIPI-1) » (**Figure 6**) et le locus *inlAB* (Portnoy *et al.,* 1992).

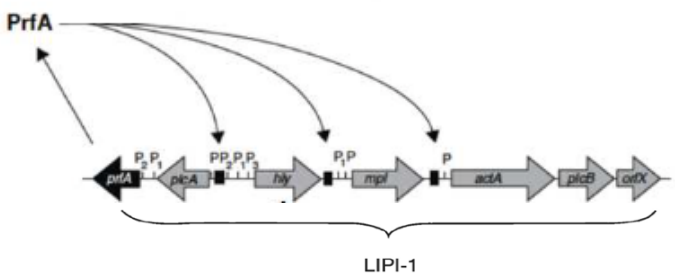


Figure 6 : Organisation de l'îlot de pathogénicité (LIPI-1) de *L. monocytogenes* régulé par l'activateur transcriptionnel PrfA (d'après Scortti et al., 2007). Les boîtes PrfA sont indiquées par les carrés noirs et les promoteurs connus par « P ».

2.1 Les protéines d'invasion du locus *inlAB*

Lm est capable d'induire son internalisation dans les cellules non-phagocytaires par un mécanisme dit « zipper », c'est-à-dire par l'interaction entre un ligand bactérien et un récepteur eucaryote, qui conduit à une réorganisation du cytosquelette et à la formation d'une vacuole d'internalisation. L'entrée de *Lm* dépend de deux protéines de surface : InlA et InlB, dont l'opéron a été découvert après criblage d'une banque de mutants pour leur capacité à entrer dans le modèle de cellules épithéliales Caco-2 (cellules de carcinome colique humain) (Gaillard et al., 1991). InlA et InlB sont les paradigmes d'une famille de protéines structurellement apparentées : les internalines. Elles sont caractérisées par la présence d'un peptide-signal dans le domaine N-terminal contenant des motifs répétés riches en leucine (LRR). InlA et InlB possèdent également une région conservée semblable à celle d'une immunoglobuline (région inter-répétitions (IR)) (Bierne & Cossart, 2007). Parmi les 27 internalines existantes chez la souche *Lm* EGD-e de référence, seules InlA et InlB ont été démontrées comme étant impliquées dans le processus d'internalisation (**Figure 7**).

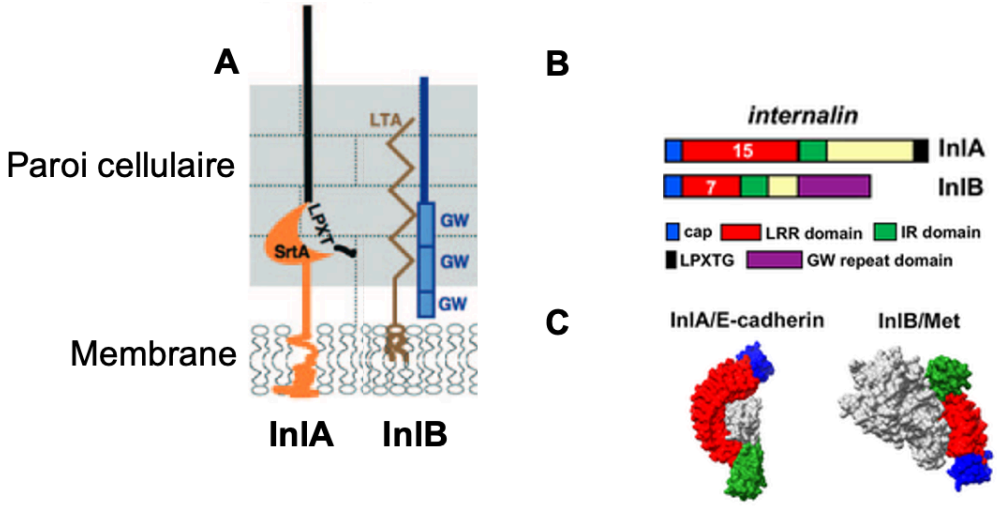


Figure 7 : Les protéines de surface InlA et InlB chez *L. monocytogenes* (adapté de Bierne & Cossart, 2007 ; Ireton et al., 2021) A. Ancrage par liaison covalente au peptidoglycane après clivage par la sortase A (SrtA) du motif LPXTG de InlA, et par liaison non covalente entre le motif GW de InlB et les acides lipotéichoïques de la paroi cellulaire. **B.** Domaines protéiques de InlA et InlB. **C.** Structure tridimensionnelle des protéines en interaction avec les récepteurs de l'hôte (E-cadhérine et Met, respectivement). Les domaines des protéines internalines sont colorés comme dans le schéma B et les récepteurs en gris.

InlA est codée par le gène *inlA.* C'est une protéine de surface de 80 kDa (800 aa), contenant 15 répétitions riches en leucine (LRR) de 22 acides aminés (aa) et un motif LPXTG (Leucine-Proline-X-Thréonine-Glycine) à l'extrémité C-terminale, une signature d'ancrage au peptidoglycane bactérien de manière covalente par la sortase A (Bierne et al., 2007). Le récepteur eucaryote de InlA est la E-cadhérine (E-cad), une glycoprotéine d'adhésion intercellulaire permettant notamment l'étanchéité et l'intégrité de différentes barrières épithéliales telles que la barrière intestinale et la barrière fœto-placentaire (Mengaud et al., 1996). L'interaction InlA-E-cad se fait principalement par les domaines LRR et IR d'InlA (Pizarro-Cerda et al., 2012) et est spécifique de l'espèce (Lecuit et al., 1999). Une simple proline en position 16 de la E-cad humaine est nécessaire pour l'interaction. Cette interaction est perdue chez la souris et le rat, qui présentent un acide glutamique à la même position. Cette observation a contribué au développement de nouveaux modèles pour l'étude du rôle d'InlA *in vivo*, avec des souris « humanisées » exprimant la E-cad humaine (Lecuit et al., 2001 ; Disson et al., 2008) et des *Lm* « murinisées » qui expriment une InlA capable d'interagir avec la E-cad murine (Wollert et al., 2007 ; Bergmann et al., 2013). À la suite de l'interaction entre InlA et E-cad, un complexe comprenant l'actine et les caténines α, ß et p120 est recruté. Il se produit ensuite l'activation de plusieurs voies de signalisation qui conduisent à la réorganisation du cytosquelette et à la mise en place de la machinerie d'endocytose médiée par la clathrine permettant l'internalisation de *Lm* (Pizarro-Cerda et al., 2012).

InlB est le second acteur majeur identifié qui contribue à l'invasion de *Lm* dans les cellules eucaryotes (Dramsi et al., 1995). Cette protéine de surface de 630 aa est codée par le gène *inlB,* Elle contient 8 répétitions LRR suivies d'une région inter-repeat (IR) et de 3 répétitions de 80 aa contenant des motifs Glycine-Tryptophane (domaine GW). Ce motif GW permet la liaison non-covalente entre InlB et les acides lipotéichoïques au niveau de la paroi bactérienne (Braun et al., 1997 ; Jonquières et al., 1999).

Le récepteur de InlB est c-Met (ou Met), le récepteur ubiquitaire du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Shen et al., 2000). Met est un récepteur à activité tyrosine kinase qui contrôle la migration et la croissance cellulaire lors de l'embryogénèse (Pizarro-Cerda et al., 2012), dont la suractivation est impliquée dans la formation de métastases de cellules cancéreuses, ce qui en fait une cible thérapeutique privilégiée (Benvenuti & Comoglio, 2007). L'interaction se fait entre le domaine LRR en position N-terminale d'InlB et la partie extracellulaire de Met (les deux sous unités α), ce qui mime l'activation de la voie de

signalisation HGF-Met (ligand naturel) (Braun et al., 1999). L'interaction dépend de l'espèce comme pour InlA. En effet, InlB interagit avec le Met humain et murin mais ne reconnait pas le Met des cellules de cochons d'Inde et de lapin (Khelef et al., 2005 ; Kammoun et al., 2022). La sous-unité ß de InlB induit la dimérisation et l'autophosphorylation de Met (Shen et al., 2000), le recrutement de l'ubiquitine protéine ligase E3 (Cbl) et l'ubiquitinylation de Met (Veiga & Cossart, 2005). Semblable au mécanisme induit par InlA, la machinerie d'endocytose par la clathrine est activée et le cytosquelette d'actine est remodelé pour permettre l'internalisation, *via* un recrutement d'actine dépendant de la voie de signalisation PI3-kinase (Pizarro-Cerda & Cossart, 2018). Une étude récente a également mis en évidence l'implication de InlB dans la neuroinvasion par un mécanisme médié par Fas, qui protège les monocytes de la mort cellulaire et permet donc une durée de vie accrue de la cellule infectée et facilite la dissémination de *Lm* dans le système nerveux de l'hôte (Maudet et al., 2022).

Un rôle coopératif de InlA et InlB a été mis en évidence lors d'infections materno-fœtales. Des coupes histologiques de placentas issus de patientes atteintes de listériose révèlent la présence de bactéries dans le cytoplasme des SYN et dans les villosités suggérant un passage par le SYN (Lecuit et al., 2004). De plus, il est connu que les récepteurs cellulaires E-cad et Met sont exprimées à la surface du SYN et des CTB, suggérant l'implication de InlA et InlB dans l'invasion. InlA est impliquée dans l'invasion du modèle trophoblastique humain BeWo (SYN-différenciées), Jar, de cultures primaires trophoblastiques ainsi que des explants placentaires du troisième trimestre (Lecuit et al., 2004 ; Bakardjiev et al., 2004 ; Gessain et al., 2015). Dans les modèles de gerbilles et de souris permissives pour l'infection, les mutants de délétion Δ*inlA*, Δ*inlB* et Δ*inlAB* sont tous moins invasifs que la souche sauvage (Disson et al., 2008). De plus, il a été montré que la voie PI3-kinase est inactive à l'état basal dans les trophoblastes, donc l'interaction entre Met et InlB est nécessaire à son activation et donc à l'internalisation InlA-dépendante de *Lm* dans les trophoblastes (Gessain et al., 2015 ; Charlier et al., 2020). InlA et InlB sont donc toutes les deux requises pour la traversée de la barrière placentaire.

2.2 Internalines supplémentaires

D'autres membres de la famille des internalines sont impliqués dans l'adhésion et dans la virulence de *Lm*. La protéine de surface InlF participe à la colonisation du cerveau, chez la souris, en utilisant les filaments de vimentine des cellules endothéliales de l'hôte (Ghosh et al., 2018). InlC joue un rôle dans la propagation intercellulaire de *Lm* en stimulant la formation de

protubérances membranaires, grâce à l'interaction avec le domaine Src homology 3 (SH3) de la protéine humaine Tuba, impliquée dans le maintien des jonctions serrées (Rajabian et al., 2009 ; Polle et al., 2014). Elle joue également un rôle dans l'immunité innée en amortissant la réponse immunitaire de l'hôte en s'associant à l'IKK-α humain, qui régule l'activation de la voie NF-kB (Gouin et al., 2010 ; Radoshevich & Cossart, 2018). InlP a été identifié comme un facteur qui contribue à l'infection fœto-placentaire *via* son interaction avec l'afadine, une protéine humaine exprimée à la surface du cytotrophoblaste du placenta, qui se lie aux molécules de nectine membranaires au niveau des jonctions adhérentes et serrées (Faralla et al., 2016 ; Faralla et al., 2019). De plus, des récents travaux de mon équipe montrent qu'une expression ectopique d'InlP dans les cellules humaines, modifie la morphologie de granules nucléaires induits par RBM5 (une protéine qui se lie à l'ARN, *RNA-binding motif 5*), qui apparaît en interaction avec InlP. Ces résultats montrent qu'InlP agit comme une nucléomoduline qui contrôle la compartimentation et la fonction de RBM5 dans le noyau (Pourpre et al., 2022). Enfin, InlJ serait spécifiquement exprimée lors de l'adhésion *in vivo* de *Lm* (Sabet et al., 2008) et InlH en conditions de stress intracellulaire, avec un possible rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte (Personnic et al., 2010).

2.2.1 Protéines impliquées dans l'invasion

a. *Vip (Virulence-Protein)*

Vip est une protéine de surface ancrée à la paroi bactérienne impliquée dans l'invasion de diverses lignées cellulaires dont les cellules épithéliales Caco-2 et GPC16, grâce à l'interaction avec le récepteur Gp96 présent à la surface de ces deux lignées cellulaires (Cabanes et al., 2005 ; Seveau et al., 2007).

b. *Ami et Auto*

Ami est une autolysine de 917 aa dont le domaine amino-terminal ressemble au domaine amidase de l'autolysine Atl de *Staphylococcus aureus*, tandis que son domaine C-terminal constitué de huit domaines GW permet une association forte non-covalente à la paroi bactérienne. Ami digère les parois cellulaires de *Lm* et sert de médiateur pour l'adhésion des souches dépourvues de InlA et InlB (Milohanic et al., 2001). Auto est une seconde autolysine, associée à la surface par des motifs GW, qui promeut l'attachement des *Lm* à la surface des cellules hôtes et dont l'inactivation diminue l'invasion dans les cellules hôtes (Jonquières et al., 1999 ; Cabanes et al., 2004 ; Seveau et al., 2007).

c. *Déterminants bactériens complémentaires*

Les modificateurs d'acide lipoteichoïque GtcA et DltA, la lipoprotéine LpeA, la prolipoprotéine transférase Lgt et le modificateur de lysylphosphatidylglycérol MprF jouent un rôle dans l'adhésion ou l'invasion des cellules hôtes, probablement en modulant la charge de la surface bactérienne et/ou en modifiant l'organisation des protéines de surface de *Lm* (Pizarro-Cerda & Cossart, 2018).

2.3 Les facteurs de virulence du locus LIPI-1

2.3.1 Listériolysine O (LLO)

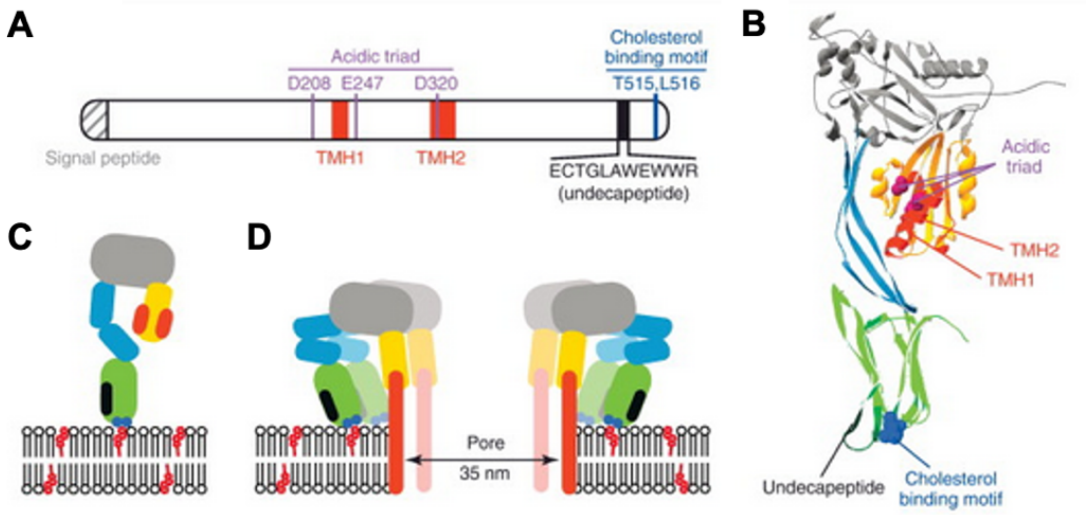


Figure 8 : Structure de la toxine Listériolysine O (LLO) et représentations schématiques de la formation des pores dans la membrane (adapté de Hamon et al., 2011). A. Schéma des différents domaines de la LLO. **B.** Modèle structural d'un monomère de LLO. **C. D.** Mécanisme de formations des pores avec la liaison des monomères au cholestérol de la membrane (C), la diffusion latérale puis le changement de conformation des monomères conduisant à l'insertion des protéines en "épingle à cheveux" (*Transmembrane Hairpin ;* TMH) dans la membrane et donc la formation des pores transmembranaires. Le code couleur des acides aminés est le même pour B, C et D.

LLO est le premier facteur de virulence identifié chez *Lm* (Gaillard et al., 1986). Cette toxine est codée par le gène *hly*, en position centrale du locus LIPI-1 (**Figure 6**). C'est une cytolysine cholestérol-dépendante (CDC), responsable de la formation de pores dans les membranes des cellules de l'hôte en se liant au cholestérol de celles-ci (**Figure 8**). LLO permet le passage de *Lm* dans le cytosol suite à la lyse de la vacuole primaire d'internalisation et des vacuoles secondaires formées lors de la dissémination intercellulaire (Hamon et al., 2012). Son rôle lors

de l'infection est déterminant puisque son absence conduit à un blocage de *Lm* dans la vacuole primaire d'internalisation (Gaillard et al., 1996) et à une avirulence totale de *Lm* chez la souris (Vasquez-Boland et al., 2001). Elle se distingue des autres cytolysines de la même famille par la présence d'une triade acide dans le domaine transmembranaire (3 acides aminées chargés négativement Asp208, Glu247 et Asp320), qui lui confère une activité dépendante du pH. La LLO est active à pH ≤ 5.5 dans les vacuoles d'internalisation et peu active à pH neutre lorsque la bactérie se retrouve dans le cytosol (Schuerch et al., 2005). La formation des pores favorise également la fuite d'ions Ca^{2+} qui empêchent la maturation du phagosome en perturbant l'acidification de la vacuole, et la fusion avec les compartiments lysosomaux (**Figure 8**) (Shaughnessy et al., 2006).

Dans le phagosome, l'activité de la LLO est également potentialisée par l'enzyme GILT qui maintient le résidu cystéine unique de LLO à l'état réduit actif (lysosomal thiol réductase inductible par l'interféron γ) et CFTR qui favorise l'entrée de chlorure dans le phagosome (régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose cystique) (Singh et al., 2008 ; Radtke et al., 2011).

Dans le cas d'une listériose materno-fœtale, dans un modèle de souris non-permissif, le mutant Δ*hly* est incapable d'envahir le placenta, suggérant un rôle de la LLO dans la traversée de la barrière placentaire (Bakardjiev et al., 2005 ; Le Monnier et al., 2007). Cependant, une fois sécrétée, elle peut causer entre autres, l'apoptose, la fragmentation mitochondriale, du stress au niveau du reticulum endoplasmique, l'activation de l'inflammasome et des modifications au niveau des histones. (Seveau et al., 2014 ; Osborne & Brumell, 2017 ; Radoshevich & Cossart, 2018). Dans le cytoplasme, son activité est contrôlée par le pH neutre de la cellule hôte mais également par des mécanismes d'ubiquitinylation et de dégradation par le protéasome (Schnupf et al., 2007), ce qui préserve les organites des dommages par la LLO et l'intégrité de la niche intracellulaire de *Lm*. De plus, son activité peut être inhibée par la cathépsine D et la métalloprotéase MMP8 (Osborne et Brumell, 2017).

Finalement, LLO s'illustre non seulement par son activité de cytolysine mais également par de nombreuses autres activités au cours de l'infection. Plusieurs auteurs la qualifient d'ailleurs de "couteau suisse", un outil polyvalent qui permet à *Lm* d'induire de nombreuses altérations membranaires et réponses cellulaires qui favorisent sa dissémination intracellulaire. Les différents mécanismes associés à la LLO sont détaillés dans plusieurs revues (Hamon et al., 2012 ; Osborne & Brumell, 2017 ; Radoshevich & Cossart, 2018).

2.3.2 *Actin-assembly-inducing protein* (ActA)

a. *Description*

La formation des « étoiles filantes » (**Figure 9.A et B**), appelées « comètes d'actine » par *Lm* est la conséquence de la polymérisation de l'actine par la protéine de surface ActA. Elle confère à la bactérie sa motilité cytosolique intra- et inter-cellulaire (Tilney & Portnoy, 1989). C'est une protéine de 640 aa composée de 4 domaines (**Figure 9.C**) :

(a) un peptide signal de 21 aa

(b) un domaine N-terminal NH2 ou région N (21-231) essentiel pour la polymérisation de l'actine, en particulier les régions 126-158 et un segment acide dans le domaine 21-97 qui participent au recrutement du complexe Actin-related proteins-2/3 (Arp2/3)

(c) la région centrale P (232-393) qui contient des répétitions riches en proline qui se lient aux protéines de la famille Enabled/vasolator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) et Mena, qui après liaison aux filaments d'actine, participent à l'élongation des queues de comète

(d) un domaine C-terminal (394-525) qui contient des résidus hydrophobes, et qui est responsable de l'ancrage transmembranaire d'ActA à la surface bactérienne (Travier et al., 2013 ; Pillich et al., 2016).

Son rôle lors de l'infection est essentiel puisqu'un mutant de délétion pour le gène *actA* empêche la dissémination de *Lm* de cellule à cellule. *Lm*-Δ*actA* garde cependant la capacité à sortir du phagosome et à se multiplier dans le cytosol une fois entrée (Domann et al., 1992). ActA mime l'action des nucléateurs de l'actine (ou « *nucleation promoting factors* » NPF) de la famille *Wiskott-Aldrich syndrom protein* (WASP) (Gouin et al., 2005), responsables du recrutement d'Arp2/3, qui une fois actif se lie à un filament d'actine et catalyse la formation d'un nouveau filament, et permet à la bactérie de se mouvoir (Goley & Welch, 2006).

Des études récentes ont mis en évidence d'autres fonctions pour ActA. Dans un contexte infectieux, ActA semble être également impliquée dans la sortie du phagosome, l'évasion de l'autophagie (**§B.2.3.3**) et l'activation de NF-kB (Pillich et al., 2016). Dans un contexte non infectieux, ActA joue un rôle dans l'agrégation des *Lm*, la formation de biofilm et la persistance dans l'intestin (Travier et al., 2013 ; Pillich et al., 2016). Plus récemment, ActA a été identifiée comme responsable du mauvais alignement des chromosomes lors de la mitose des cellules infectées, en coopération avec un autre facteur de virulence, InlC (Costa et al., 2020).

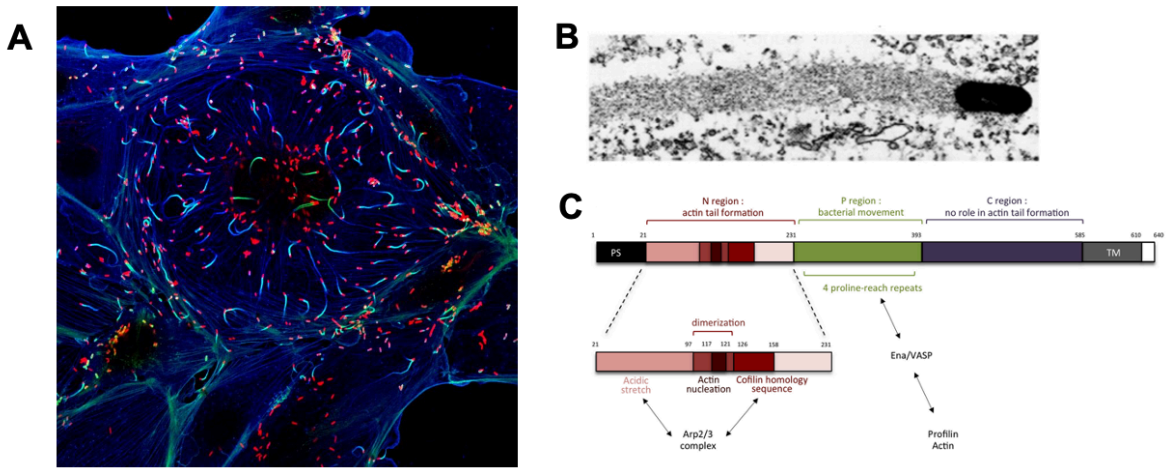


Figure 9 : Polymérisation de l'actine par la protéine de surface ActA (adapté de Kocks et al., 1992 ; Travier et al., 2013). A. Image de microscopie confocale qui représente des *Lm* (rouge) intracellulaires formant des comètes d'actine (bleu et vert). Image acquise par le Dr. Matteo Bonazzi (CNRS). **B**. Image en microscopie électronique de *Lm* polymérisant l'actine de la cellule hôte et formant une comète d'actine. C. Schéma des différents domaines d'ActA et leurs rôles connus dans la polymérisation de l'actine.

b. *Localisation d'ActA à la surface bactérienne*

Pendant la dissémination intracellulaire de *Lm*, ActA est concentrée à un pôle de la bactérie, créant les fameuses « comètes d'actine » (Pilich et al., 2016) (**Figure 9.B**). Cette distribution asymétrique de ActA, induisant la nucléation et la polymérisation d'actine d'un côté de la bactérie, est essentielle pour la motilité intracellulaire (Dabiri et al., 1990). Pendant la multiplication de la bactérie, ActA est localisée à un pôle de la bactérie et est absente du site de septation (Kocks et al., 1993). Ainsi, ActA se déplace vers le "vieux pôle". Les travaux de Rafelski et Theriot résument les étapes de localisation de ActA au cours de la division de *Lm* en 4 étapes (**Figure 10**) : (I) la détection de la protéine ActA-RFP principalement le long des côtés des bactéries après 20 minutes de croissance, (II) l'accumulation irrégulière d'ActA sur les côtés, (III) la couverture par ActA de la quasi-totalité de la surface bactérienne et enfin (IV), la croissance du peptidoglycane lors de la poursuite de la division cellulaire bactérienne qui repousse ActA vers le "vieux pôle". La polarisation de ActA dépend donc du mouvement et de la croissance du peptidoglycane (Rafelski & Theriot, 2006 ; Pillich et al., 2016). Les mécanismes associés à la migration d'ActA vers un pôle de la bactérie ne sont toujours pas caractérisés. Néanmoins, l'ensemble de ces données suggère un lien entre la division bactérienne et la migration d'ActA au vieux pôle. Il est tentant de spéculer que la motilité bactérienne repose sur l'état réplicatif/la division de la bactérie.

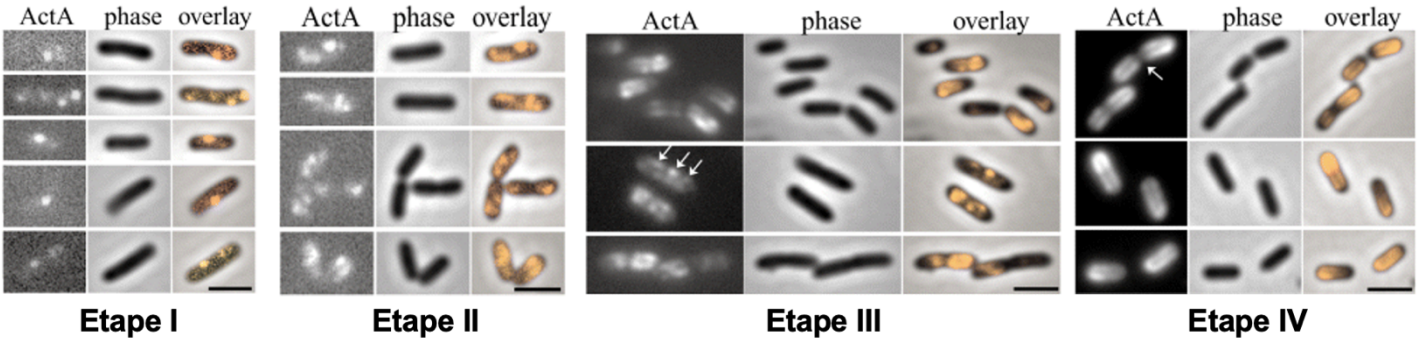


Figure 10 : Les 4 étapes de polarisation de ActA à la surface de *Lm* au cours de la division bactérienne (adapté de Rafelski & Theriot, 2006). Durant l'étape I, ActA-RFP est visible 20-30 min après l'induction, le long des côtés de la bactérie. 30 min - 1 h plus tard, les bactéries présentent ActA-RFP à des régions distinctes de sa surface à savoir le long des côtés mais ni aux pôles ni dans la zone de septation. Durant l'étape III, le signal ActA-RFP continue de s'intensifier en couvrant une plus grande surface souvent selon une distribution hélicoïdale comme l'indique les flèches blanches. Durant l'étape IV, la distribution du signal ActA-RFP est entièrement polarisée, avec une accumulation de la protéine aux niveaux des côtés de la bactérie selon une distribution continue à la surface de *Lm*. La protéine est bien visible aux pôles mais reste absente de la zone de septation (flèche). La barre est de 2 µm. Les 3 panneaux montrent les images acquises avec le canal ActA-RFP, en contraste de phase, et la superposition des deux canaux.

c. *Modifications post-traductionnelles de ActA*

Durant l'infection, ActA est phosphorylée au niveau de résidus Serine en position 155 et 157 (S155 et S157). La phosphorylation de S155 se produit par l'intermédiaire de la sérine/thréonine caséine kinase 2 (CK2) de la cellule hôte et est essentielle pour la motilité intracellulaire (Chong et al., 2009 ; Pllich et al., 2016). Pendant la croissance extracellulaire de *Lm*, ActA est également phosphorylée mais sur 5 résidus différents, situés dans sa région C-terminale (S356, S365, S470, S482, S546). Les mécanismes de ces phosphorylations sont majoritairement inconnus, exceptée pour la S470 qui est médiée par la protéine kinase Lmo1820 (Misra et al., 2014 ; Pillich et al., 2016).

2.3.3 Stratégies d'évitement de l'autophagie médiées par ActA et LLO

L'autophagie est un mécanisme de dégradation cellulaire, qui participe à la protection du cytosol contre les infections bactériennes et au recyclage des agrégats de protéines et des organelles cytoplasmiques endommagés *via* les lysosomes. Le processus commence par la formation d'un

autophagosome (vésicule à double membrane qui enferme un cargo), qui fusionne ensuite avec les lysosomes et acquiert donc des propriétés dégradatives (Hansen et al., 2018 ; Jagannath et al., 2021). Le processus d'autophagie mis en place lors d'une infection bactérienne est appelé "xénophagie" (Kwon & Song, 2018). L'autophagie non canonique fait référence à une autophagie non-conventionnelle qui implique d'autres types de protéines que les ATG (*Autophagy-Related Proteins*) (Codogno et al., 2012). Les déterminants moléculaires impliqués dans l'autophagie sont nombreux et complexes. Les principaux sont illustrés dans un modèle général présenté dans la **Figure 11**.

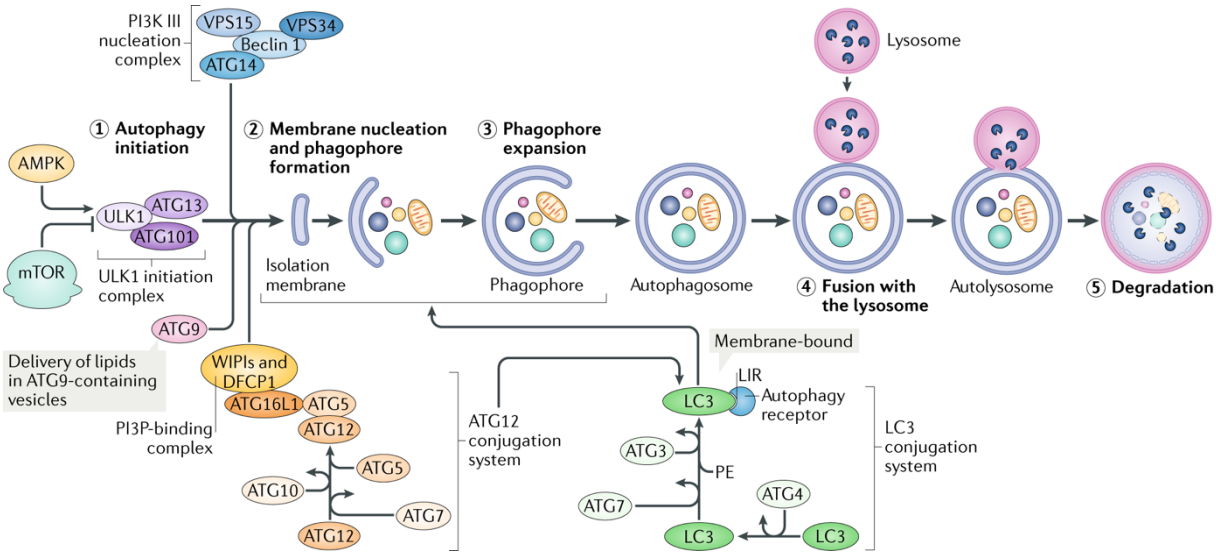


Figure 11 : Schéma du processus d'autophagie dite canonique (d'après Hansen et al., 2018). Le processus d'autophagie est médié par des protéines liées à l'autophagie (ATG)**.** mTOR et AMP-*activated kinase* (AMPK) sont les principaux régulateurs du processus, respectivement inhibiteur et activateur. Le processus débute par (1) l'étape d'initiation, (2) la nucléation de la membrane et la formation du phagophore, (3) l'expansion du phagophore, (4) la fusion avec le lysosome et (5) la dégradation. (1) est médiée par le complexe d'initiation Unc-51-like kinase 1 (ULK1) et le complexe de nucléation PI3K III (composé de VPS34 et de Beclin 1 entre autres) qui produit du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) qui participe au recrutement de la machinerie (notamment LC3-PE et ATG12-5) pour la formation de l'autophagosome. Les différentes protéines ATG telles que ATG5 et ATG7 sont des "systèmes de conjugaison de type ubiquitine" qui catalysent la formation de LC3-II et dirigent son incorporation dans la membrane du phagophore. Les membranes pour l'expansion du phagophore sont délivrées en partie par des vésicules contenant de l'ATG9. Le schéma est une version simplifiée du processus d'autophagie canonique.

Les stratégies d'évitement de l'autophagie de *Lm* sont multiples et participent à sa prospérité au sein de l'hôte (Huang & Brumell, 2014 ; Siqueira et al., 2018). L'une de ces stratégies est médiée par ActA (Birmingham et al., 2007 ; Yoshikawa et al., 2009 ; Cemma et al., 2015). L'étude pionnière, réalisée dans des macrophages, par Yoshikawa et al., démontre que ce n'est pas la motilité bactérienne des bactéries cytosoliques, qui est nécessaire pour échapper à l'autophagie mais plutôt la capacité d'ActA à engager la machinerie d'actine de l'hôte. Un mutant Δ*actA*, déficient dans le recrutement de la machinerie de polymérisation (notamment Arp2/3 et Ena/VASP), colocalise relativement plus avec LC3 et montre un taux de survie inférieur à la souche sauvage dans le modèle testé (cellules épithéliales MDCK). De plus, les souches dépourvues de ActA subissent une ubiquitination, le recrutement à leur surface du séquestosome A (SQSTM1 ou p62) et de l'*autophagy adaptor calcium binding and coiled-coil domain 2* (CALCOCO2 ou NDP52), puis sont dégradées (Yoshikawa et al., 2009 ; Mostowy et al., 2011). Les auteurs supposent qu'ActA médie la machinerie de polymérisation de l'actine pour couvrir toute la surface bactérienne et échapper à la reconnaissance autophagique (Yoshikawa et al., 2009 ; Pillich et al., 2016).

LLO contribue également à éviter l'autophagie en bloquant la fusion phagosome-lysosome en générant les pores membranaires dans la membrane du phagosome, comme décrit en **Partie B.2.3.1.** Cependant, d'autres rôles ont été caractérisés comme l'induction de l'autophagie des phagosomes endommagés ou la formation de SLAP (*Spacious* Listeria-*containing Phagosomes*) dans les macrophages (**§B.3.2.1.**). Plus récemment, Zhang et coll. ont identifié NLRX1 (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat containing x1*), un membre de la famille des récepteurs de type *nucleotide oligomerization domain* (NOD). NLRX1 contient une région LRR de liaison avec LC3 qui participe à l'induction de la mitophagie (autophagie spécifique des mitochondries) médiée par LLO. Le blocage de ce système induit l'accumulation de mitochondries endommagées et par conséquent l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont nuisibles pour la croissance de *Lm* (Zhang et al., 2019 ; Riebisch et al., 2021).

Lm est également capable de décorer sa surface avec InlK en interaction avec la *major vault protein* (MVP ou Vault) afin d'échapper à l'autophagie. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour comprendre s'il s'agit d'une stratégie basée uniquement sur le déguisement des *Lm* cytosoliques ou d'un mécanisme actif médié par MVP (Dortet et al., 2012).

2.3.4 Phospholipases PlcA et PlcB

Lm sécrète deux phospholipases C (PLC) impliquées dans la lyse des vacuoles intracellulaires : PlcA et PlcB, codées respectivement par *plcA* et *plcB* en aval du gène *actA* (Vazquez-Boland et al., 1992). PlcA (PI-PLC) est spécifique du phosphotidylinositol (PI) et des protéines ancrées au glycosyl-PI (Mengaud et al., 1991) tandis que PlcB (PC-PLC ; pour phosphatidylcholine) est une lécithinase à large spectre (incluant les sphingomyélines ou les liposomes) (Smith et al., 1995). PlcB est synthétisée sous forme de proenzyme maturée par la métalloprotéase zinc-dépendante codée par *mpl* (**§B.2.3.5.**). Une diminution du pH déclenche l'auto-clivage de Mpl qui conduit au clivage du propeptide N-terminal de PlcB et donc sa maturation (Marquis et al., 1997 ; Forster et al., 2011). Les deux enzymes agissent en synergie avec LLO pour lyser les vacuoles primaires et secondaires (Vazquez-Boland et al., 1992). Des mutants simples de délétion de *plcA* ou *plcB* testés *in vivo*, sont respectivement 3 et 20 fois moins virulents que la souche sauvage. Cependant, un mutant déficient pour les deux phospholipases est 500 fois moins virulent que la souche sauvage chez la souris, ce qui montre la complémentarité de l'activité de ces deux phospholipases (Smith et al., 1995).

PlcB et PlcA interfèrent avec l'autophagie **(§A.2.3.3.)** en réduisant les niveaux intracellulaires de PI3P (Tattoli et al., 2013 ; Mitchell et al., 2015), y compris pendant la phase cytosolique du cycle de vie intracellulaire de *Lm*, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle au-delà de celui de lipase lors de la phase précoce.

2.3.5 Métalloprotéase Mpl

Comme pour PlcB, Mpl est synthétisée et accumulée sous la forme d'une proenzyme dans l'interface membrane-paroi de la bactérie. Elle est activée à pH acide par auto-clivage, qui conduit à la rapide sécrétion de Mpl à travers la paroi bactérienne dans l'espace intra-vacuolaire. Mpl est également requise pour le clivage protéolytique d'ActA dans la protrusion, permettant la résolution de la protrusion en vacuole secondaire lors de la dissémination (Alvarez et al., 2016).

2.3.6 La nucléomoduline OrfX

Situé à l'extrémité 3' du locus de virulence, *orfX* code pour une protéine putative de 107 aa sans aucun orthologue ni aucun domaine conservé avec d'autres espèces sauf le domaine N-terminal (séquence de signal de sécrétion) (Vazquez et al., 1992). OrfX est un facteur de virulence qui contribue à la multiplication de *Lm* et atténue la réponse oxydative dans les macrophages. OrfX interagit avec la protéine RybP dans le noyau de la cellule infectée pour favoriser la survie intracellulaire de *Lm*. RybP est aussi connue pour induire l'apoptose et pour être impliquée dans le développement, l'oncogenèse et l'immunité innée (Prokop et al., 2017).

2.3.7 Le facteur de transcription PrfA

Les facteurs de virulence précédemment décrits sont sous le contrôle d'un activateur transcriptionnel appelé PrfA (*Positive regulatory factor A*) (Freitag et al., 2009). C'est une protéine de 233 aa classée dans la famille Crp/Fnr (*cAMP receptor protein/Fumarate and Nitrate reduction regulator*) du fait de ses homologies de structure et de fonction (Eiting et al., 2005). La majorité des facteurs de transcriptions appartenant à la famille Crp, ont la particularité d'être activés à la suite de la fixation d'un co-facteur induisant un changement de conformation allostérique augmentant leur affinité pour l'ADN. PrfA contient un domaine HTH (hélice-tour-hélice) de liaison à l'ADN situé dans la partie C-terminale, qui reconnait et se lie à une séquence nucléotidique consensus palindromique de 14 pb (boîte PrfA) retrouvé en amont des gènes régulés par PrfA (Sheehan et al., 1996). Les mutants de délétion Δ*prfA* sont avirulents chez la souris (Chakraborty et al., 1992 ; Maury et al., 2017).

Outre ces gènes directement régulés par PrfA, des études transcriptomiques et protéomiques ont montré qu'au moins 145 autres gènes seraient dépendants de PrfA (Milohanic et al., 2003). L'architecture du promoteur confère des caractéristiques spécifiques aux différents gènes dépendants de PrfA. Les promoteurs avec des boîtes PrfA parfaitement conservés, tels que P*plcA* ou P*hly*, sont plus efficacement activés par PrfA que les boîtes PrfA contenant des différences, comme P*actA* (1 mésappariement) ou P*inlAB* (2 mésappariements), dont l'activation nécessite une plus grande quantité de PrfA (Scortti et al., 2007).

L'expression de *prfA* est gouvernée par trois promoteurs : P1*prfA* et P2*prfA* situés en amont de *prfA,* respectivement contrôlés par le facteur sigma végétatif σA puis σA et σB, qui garantissent une quantité basale de PrfA, et P*plcA-prfA* qui agit comme une boucle de rétro-activation positive lors de l'entrée de *Lm* dans l'hôte (**Figure 6**) (de las Heras et al., 2011).

2.4 Régulation des gènes de virulence

2.4.1 PrfA

L'expression de *prfA* est auto-régulée par PrfA lui-même et par divers facteurs environnementaux (Scortti et al., 2007), dont la température. En effet, l'ARN messager (ARNm) de *prfA* fonctionne comme un thermo-senseur qui permet la traduction sélective de PrfA. À des températures inférieures à 30°C, la région 5'UTR (non-traduite, *Untranslated region*) de *prfA* adopte une structure secondaire en tige-boucle qui masque le site "Shine-Dalgarno" de liaison à la sous unité 30S ribosomale de l'ARNm, ce qui bloque la fixation du ribosome et l'initiation de la traduction de *prfA*. Sa transcription est donc limitée à ses interactions avec ses propres promoteurs précédemment décrits, permettant une expression faible mais à un niveau basal, sous forme monocistronique. À 37°C, la température corporelle des mammifères, la traduction est activée grâce à un mécanisme "riboswitch", c'est à dire le repliement d'une courte séquence présente dans la région 5'UTR (Reniere et al., 2016 ; Johansson et al., 2002). La région 5'UTR de l'ARNm de *prfA* change de structure et libère l'accès du ribosome au site de fixation, permettant de la traduction de PrfA (Johansson et al., 2002).

Les sources de carbone utilisées par *Lm* durant l'infection modulent également l'expression des gènes de virulence par l'intermédiaire de PrfA. Le régulon de PrfA est sous-exprimé en présence de sucres rapidement métabolisables tels que le glucose, le fructose, le mannose, le cellobiose et d'autres ß-glucosides, tous transportés par le PTS (phosphoénolpyruvate-carbohydrate-phosphotransférase). Les sucres PTS tels que les ß-glucosides sont abondants dans l'environnement et peuvent donc faire office de signaux pour empêcher de dépenser de l'énergie dans la production de facteurs de virulence en dehors de l'hôte (Scortti et al., 2007 ; Freitag et al., 2009). Le statut de phosphorylation des différents composants affecte l'activité de PrfA et l'expression des gènes de virulence (Aké et al., 2011). *A contrario*, en présence de substrats carbonés déjà métabolisés dont l'importation est indépendante des PTS (hexoses phosphates ou glycérol), PrfA est activé (Joseph et al., 2008). Une concentration intracellulaire limitante en aa à chaîne latérale ramifiée (*Branched-Chain Amino Acids* ou BCAA) induit également la transcription de *prfA* (Lobel & Herskovits, 2016).

Enfin, l'activité de PrfA peut être activée au niveau post-traductionnel *via* un changement de conformation allostérique, par le biais de co-facteurs tels que le glutathion. Le glutathion est un tripeptide, la γ-L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine, présent dans tous les tissus des mammifères et particulièrement dans le foie (**Figure 12.A**). Il existe sous la forme thiol-réduite (GSH) et sous

la forme disulfure-oxydée (GSSG) (Kaplowitz et al., 1985). La forme réduite est prédominante dans les cellules, en particulier dans le cytosol (Meredith & Reed, 1982 ; Hwang et al., 1992). GSH remplit plusieurs fonctions essentielles comme la détoxification des électrophiles, le piégeage des radicaux libres ou l'homéostasie redox des thiols et assure une réserve de cystéine (Lu et al., 2009). *Lm* a la capacité de réaliser la synthèse complète du glutathion grâce à la protéine multi-domaine nommée GshF codée par *gshF* (*lmo2770*). GshF intègre les deux activités catalytiques de biosynthèse du glutathion, à savoir la ligation du groupe γ-carboxyle du L-Glutamate avec le groupe amino de la L-cystéine qui donne la γ-glutamylcystéine, puis l'étape de condensation avec la glycine pour former la GSH (Gopal et al., 2005). Un mutant *Lm* déficient en GSH (Δ*gshF*) est moins virulent d'un facteur 150 *in vivo* et l'expression des gènes de virulence, en particulier PrfA-dépendant, est atténuée. Ces premiers travaux suggéraient une liaison covalente entre la GSH et PrfA, modulant l'activité transcriptionnelle de PrfA (Reniere et al., 2015). Ce modèle a été confirmé par les travaux de Hall et al., 2016, qui montrent par analyse cristallographique, une liaison covalente entre GSH et PrfA, qui induit une modification allostérique qui active la transcription PrfA-dépendante. En se liant à PrfA dans le cytosol de la cellule hôte, GSH induit le repliement des motifs HTH de PrfA, favorisant son interaction avec l'ADN (**Figure 12.B**) (Reniere et al., 2015 ; Wang et al., 2017). La cystéine (Cys) joue un rôle majeur dans la synthèse du glutathion chez *Lm*. Son absorption dépend de l'ABC transporter TcyKLMN (Brenner et al., 2021) ou de l'importation de peptides *via* les transporteurs Opp (Krypotou et al., 2019). Les peptides activateurs fournissent les précurseurs de cystéine essentiels à la biosynthèse du GSH et les peptides ne contenant pas de cystéine provoquent une inhibition de l'activité de PrfA par blocage stérique du site de liaison du GSH à PrfA. Les analyses des travaux de Krypotou et al., soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'équilibre des oligopeptides antagonistes importés par Opp favorisent l'induction de PrfA au niveau intracellulaire et la répression de PrfA en dehors de l'hôte (Krypotou et al., 2019).

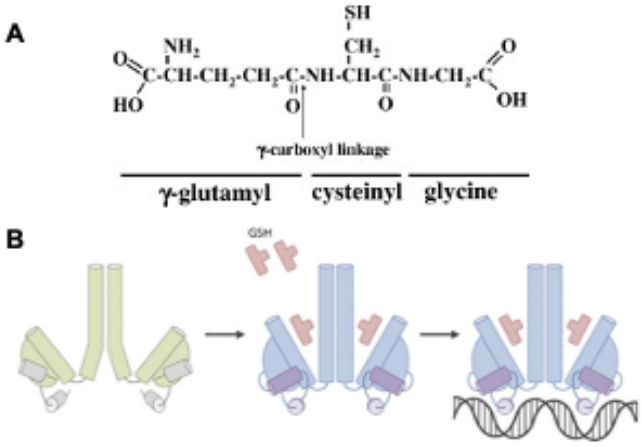


Figure 12 : Structure du glutathion (GSH) ou γ-glutamylcysteinyl glycine et son rôle en tant que co-facteur dans l'activation de PrfA (adapté de Lu 1999 ; Hall et al., 2016). A. La partie N-terminale du glutamate et de la cystéine sont liées par le groupe γ-carboxyl du glutamate. **B.** Liaison covalente entre le glutathion (rouge) et le site tunnel de PrfA (vert conformation sauvage, bleu conformation active), conduisant à une modification allostérique des résidus du domaine C-terminal de liaison à l'ADN et à la formation de motifs HTH, verrouillant PrfA dans une formation active, avec une liaison facilitée à l'ADN.

2.4.2 Le facteur alternatif Sigma B

Le facteur Sigma B (σ^B) est un régulateur transcriptionnel codé par le gène *sigB* (Becker et al., 1998 ; Wiedmann et al, 1998). Ce sont des sous-unités de l'ARN polymérase (ARNP), qui viennent s'y fixer selon les conditions environnementales et orienter l'ARNP vers des promoteurs spécifiques, induisant la transcription de gènes ciblés. σ^B contrôle la réponse générale au stress de *Lm, via* un mécanisme complexe et multifactoriel, impliquant le stressosome (complexe multiprotéique supramoléculaire qui orchestre la détection et la réponse au stress) (Impens et al., 2017 ; Guerreiro et al., 2020). Lorsque σ^B est libéré du facteur anti-sigma RsbW, plus de 300 gènes connus comme appartenant au régulon σ^B sont activés et garantissent une réponse appropriée aux nouvelles conditions environnementales (Guerreiro et al., 2020). Plusieurs études ont identifié de nombreux gènes et fonctions directement ou indirectement contrôlés par σ^B, y compris la réponse générale au stress, plusieurs systèmes de transport, la régulation post-transcriptionnelle, la virulence, le métabolisme, la résistance antimicrobienne et plusieurs gènes aux fonctions inconnues (Ferreira et al., 2001 ; Kazmierczak et al., 2003 ; Milohanic et al., 2003 ; Abram et al., 2008 ; Hain et al., 2008 ; Raengpradub et al., 2008 ; Makariti et al., 2015 ; Boura et al., 2016 ; Guerreiro et al., 2020).

σ^B est indispensable à la survie et à l'efficacité infectieuse de *Lm* chez l'hôte, notamment dans les conditions acides de l'estomac, le stress osmotique dans l'intestin grêle et la présence de sels biliaires dans le duodénum (Sleator et al., 2009 ; Tiensuu et al., 2019). En effet, une souche Δ*sigB* inoculée par voie gastrique chez le cochon d'inde présente une virulence atténuée (Oliver et al., 2010). On retrouve parmi les gènes du régulon σ^B : le système de réponse à l'acidité, la glutamate décarboxylase (GAD) (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004), les gènes de résistance à la bile tels que *bilE* et *bsh* (Dussurget et al., 2002 ; Sleator et al., 2005 ; Toledo-Arana et al., 2009), ou encore les gènes de résistance au stress osmotique comme *opuCA*, *gbu* et *betL* (Fraser et al., 2003 ; Sue et al., 2003). *In vitro*, σ^B participe à l'infection des cellules épithéliales intestinales (Caco-2) en contrôlant les gènes du locus *inlA-inlB* (Kim et al., 2005), ainsi que d'autres internalines comme *inlC2* et *inlD* (McGann et al., 2007). De plus, l'enzyme SrtA nécessaire à l'ancrage des internalines à motif LPXTG au peptidoglycane semble également dépendante de σ^B, suggérant le rôle complémentaire à PrfA et déterminant de σ^B dans l'invasion intestinale de *Lm* chez l'hôte (Bierne et al., 2002 ; Liu et al., 2017).

L'expression de *prfA* est également σ^B-dépendante à travers son promoteur P2*prfA*, dont la transcription est activée dans certaines conditions de stress (Kazmierczak et al., 2006). Plusieurs études mettent en évidence le chevauchement transcriptionnel des régulons σ^B et PrfA, suggérant un réseau de régulation bidirectionnel complexe entre σ^B et PrfA qui module la pathogénie de *Lm* (Gaballa et al., 2019, Tiensuu et al., 2019).

2.4.3 Protéines régulatrices additionnelles

Parmi les régulateurs des gènes de virulence, on trouve notamment les régulateurs de transcription CodY et Rex (Lobel et al., 2015 ; Halsey et al., 2021). CodY se lie à une région située 15 bases en aval du codon d'initiation de *prfA*, en réponse à la présence d'aa à chaîne ramifiée et de guanosine triphosphate (GTP) et au stress en général (Lobel et al., 2015). Rex est sensible au stress redox et permet la colonisation de la rate et du foie par *Lm, in vivo*, en permettant une croissance optimale en présence d'oxygène (Halsey et al., 2021).

La bactériocine LSS est codée par un ensemble de huit gènes formant le locus LIPI-3 dont l'expression est fortement activée dans l'intestin (Querada et al., 2016) (**§D.2.2.3**). Les gènes appartenant au locus LIPI-4 sont eux, spécifiquement exprimés lors de l'infection du système nerveux et du tissu placentaire (Maury et al., 2016) (**§D.2.2.4**). Ces deux *loci* ne sont pas contrôlés par PrfA, ce qui suggère l'implication d'autres régulateurs qui restent à caractériser.

3. Le mode de vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes* : des phases vacuolaires et cytosoliques

3.1 Modes de vie et niches intracellulaires de quelques bactéries pathogènes

Les bactéries invasives ont développé diverses stratégies de survie au sein de l'hôte, afin d'échapper aux conditions dégradatives initiées dans la vacuole d'internalisation. Dans cette partie, nous détaillerons les différentes stratégies mises en œuvre et donnerons quelques exemples des différents modes de vie des pathogènes intracellulaires avant de détailler celui de *Lm*.

Certains agents, notamment les bactéries du genre *Legionella, Chlamydia, Salmonella et Coxiella,* survivent dans des niches vacuolaires qui dérivent des vacuoles primaires d'entrée en empêchant la fusion vacuole-lysosome ou en modifiant l'environnement délétère de la vacuole. En revanche, d'autres bactéries dites "cytosoliques", comme *Listeria* ou les bactéries des genres *Shigella*, *Rickettsia*, *Mycobacterium* et *Francisella,* ont évolué pour s'échapper de la vacuole d'entrée et poursuivre leur cycle de vie dans le cytosol, où elles peuvent proliférer/se multiplier (Ray et al., 2009). Ainsi, nous retiendrons deux niches de survie principales : le cytosol et les vacuoles spécialisées. Pour certains modèles, notamment *Lm*, ces deux modes de vie ne sont pas exclusifs mais dépendent de la cellule hôte et du temps d'infection (Kortebi et al., 2017 ; Bierne et al., 2018). De plus en plus de travaux « cassent » les paradigmes en mettant en évidence de nouvelles niches d'infection intracellulaires, notamment le cytosol pour *Mycobacterium marinum* et *Salmonella enterica*, deux bactéries longtemps classifiées comme intra-vacuolaires (Castanheira & Garcia-del Portillo, 2017 ; Bussi & Gutierrez, 2019).

Dans le cytosol, les bactéries bénéficient d'un accès direct aux nutriments de l'hôte et d'une protection contre l'immunité. Cependant, elles doivent aussi faire face à la machinerie autophagique (**§B.2.3.3)**. Dans les vacuoles (*Pathogen-containing-vacuole* ou PCV), les bactéries évitent les mécanismes de dégradation et optimisent leur communication, tout en sécrétant des facteurs de virulence. Cependant, elles doivent adopter des stratégies pour s'échapper ou s'adapter aux contraintes lysosomales de la vacuole d'entrée, accéder aux nutriments et disposer de suffisamment d'énergie pour entretenir l'intégrité membranaire de la PCV (Cossart & Helenius, 2014 ; Petit et al., 2022) (**Figure 13**).

L'ensemble des exemples présentés ci-dessous sont également présentés en **Annexe II** qui précise les déterminants moléculaires bactériens associés.

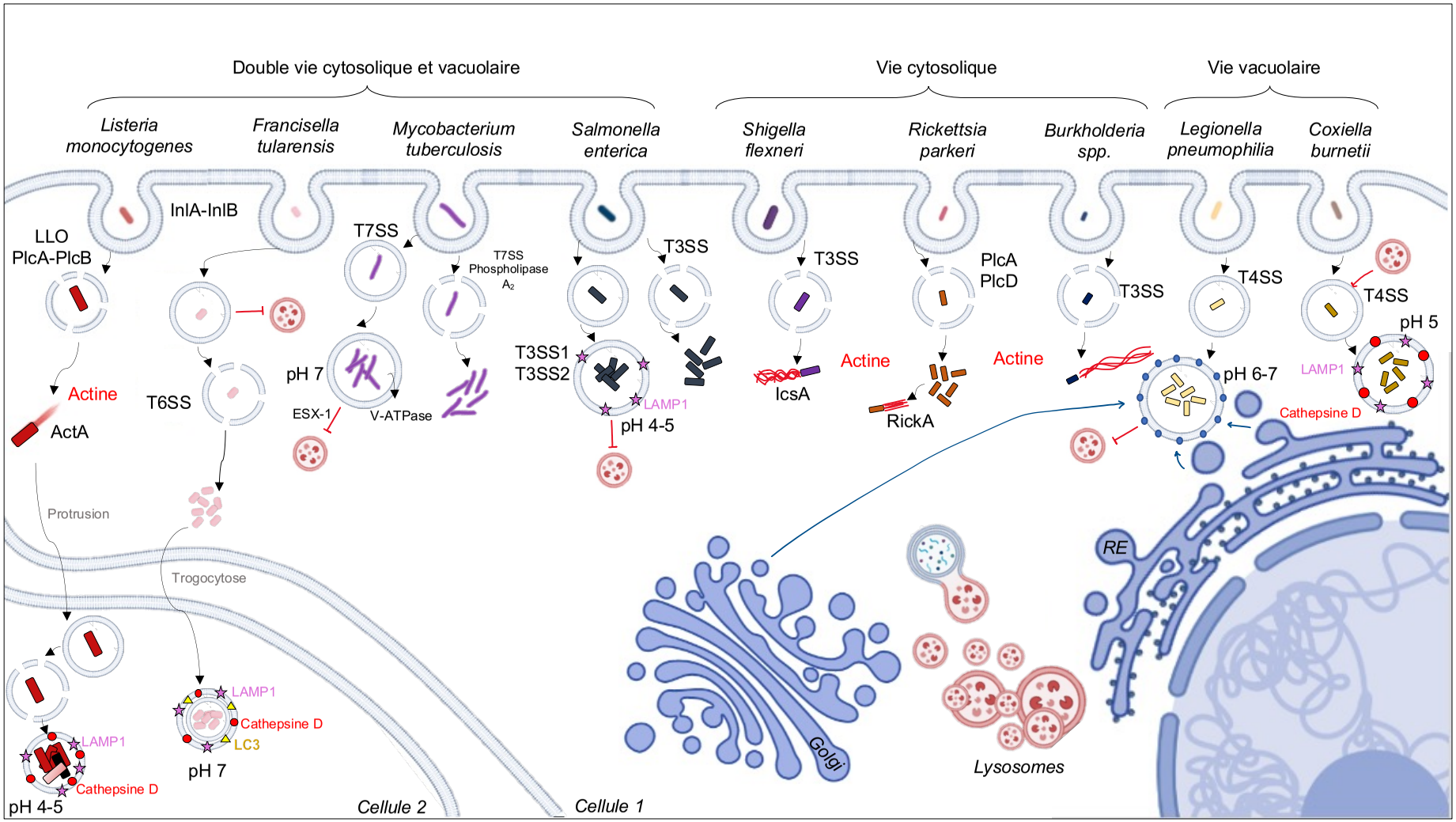

Double vie cytosolique et vacuolaire
Vie cytosolique
Vie vacuolaire
Listeria monocytogenes
Francisella tularensis
Mycobacterium tuberculosis
Salmonella enterica
Shigella flexneri
Rickettsia parkeri
Burkholderia spp.
Legionella pneumophilia
Coxiella burnetii
InlA-InlB
LLO
PlcA-PlcB
T7SS
T7SS
Phospholipase A2
T3SS
T3SS
PlcA
PlcD
T3SS
T4SS
T4SS
pH 5
Actine
ActA
T6SS
pH 7
ESX-1
V-ATPase
T3SS1
T3SS2
LAMP1
pH 4-5
IcsA
Actine
RickA
Actine
pH 6-7
LAMP1
Cathepsine D
Protrusion
Trogocytose
LAMP1
Cathepsine D
LC3
pH 7
LAMP1
Cathepsine D
pH 4-5
Cellule 2
Cellule 1
Golgi
RE
Lysosomes

Figure 13 : Représentation schématique des modes de vie intra-vacuolaires et/ou intra-cytosoliques des principales bactéries pathogènes intracellulaires. Les bactéries invasives utilisent différentes stratégies de survie au sein de l'hôte. Dans les macrophages, *Mycobacterium tuberculosis* et *Legionella pneumophilia* résident dans une vacuole, respectivement en bloquant la fusion avec les lysosomes et en acquérant des marqueurs du RE. Dans les cellules épithéliales, *Listeria monocytogenes*, *Rickettsia parkeri* et *Shigella flexneri* induisent leur internalisation et rompent leur vacuole d'entrée avant de se disséminer *via* la polymérisation de l'actine de l'hôte. En revanche, *Salmonella enterica*, *Coxiella burnetti* restent dans la vacuole primaire d'internalisation. D'autres bactéries telles *Francisella*, *Listeria*, *Mycobacterium* et *Salmonella* utilisent un double mode de vie à la fois cytosolique et vacuolaire.

3.1.1 Bactéries dites "cytosoliques" qui rompent la vacuole d'internalisation : *Shigella flexneri*, *Burkholderia* spp. *Rickettsia* spp. et *Francisella tularensis*

Dans cette partie, nous développerons les exemples de bactéries capables de s'échapper de la vacuole d'entrée pour coloniser le cytosol. Parmi les bactéries cytosoliques on retrouve, outre le paradigme *Lm*, des bactéries à Gram négatif comme des gammaprotéobactéries (*Shigella flexneri)*, de multiples espèces de *Rickettsia* qui sont des alphaprotéobactéries et des bétaprotéobactéries (*Burkholderia* spp.). Ces bactéries présentent une motilité intracellulaire basée sur l'actine pour se propager de cellule à cellule en formant des protubérances membranaires, échappant ainsi à l'immunité cellulaire.

Le recrutement du complexe Arp2/3 pour la dissémination intracellulaire de *Rickettsia* spp. et *Burkholderia* spp. sont similaires à celui de ActA pour *Lm*. Elles expriment des orthologues d'ActA, qui sont des *nucleation promoting factors* (NPF) de la famille WASP : RickA pour *Rickettsia* spp. et BimA pour *Burkholderia* spp. En revanche, *Shigella flexneri* utilise une stratégie différente *via* IcsA en recrutant N-WASP à sa surface, un facteur de nucléation de l'actine de l'hôte, pour activer le complexe Arp2/3 (Gouin et al., 2005 ; Choe & Welch, 2016). Cette stratégie est également adoptée par la protéine MirA de *Mycobacterium marinum*, qui appartient à la famille des *glycine-rich proteins* PE_PGRS, avec un domaine de 102 répétitions GGX contre 19 pour IcsA (Hill & Welch, 2022).

L'agent responsable de la tularémie, *Francisella tularensis,* est l'archétype de la bactérie cytosolique mais dépourvue de motilité à base d'actine. Après l'invasion dans les cellules hôtes, elle réside transitoirement dans un compartiment phagosomal dont elle est capable de s'échapper *via* un système de sécrétion de type VI (T6SS), pour ensuite se multiplier activement dans le cytosol. Elle est capable de survivre dans plusieurs types cellulaires et notamment les

cellules phagocytaires. Sa dissémination n'implique pas de polymérisation de l'actine mais repose sur la lyse cellulaire et la dissémination bactérienne. De plus, il a récemment été montré qu'elle pouvait également être transférée vers des macrophages non infectés par trogocytose, un nouveau mécanisme de dissémination de cellule à cellule par lequel *Francisella* peut infecter les cellules adjacentes sans passer par une étape extracellulaire suite à une lyse cellulaire. Ce mécanisme implique un contact entre cellules infectées et non-infectées, puis un échange de molécules membranaires entre elles (Steele et al., 2016 ; Pizarro-Cerda et al., 2016 ; Petit et al., 2022)

3.1.2 Bactéries dites "vacuolaires" échappant à la dégradation endosomale-lysosomale : *Salmonella enterica, Coxiella burnetii et Legionella pneumophila*

Dans cette partie, nous développerons des exemples de bactéries qui conservent un mode de vie vacuolaire dans la cellule hôte, soit en détournant le trafic endolysosomal qui empêche la maturation de la vacuole d'entrée par la voie de dégradation endosomale-lysosomale, soit en s'adaptant aux conditions lysosomales de la vacuole (Vaughn & Kwaik, 2021).

Salmonella enterica est le premier exemple de bactérie adoptant une vie intra-vacuolaire dans la cellule infectée. Des travaux de 1967 décrivent des bactéries qui pénètrent dans la cellule épithéliale intestinale et un « enfermement des bactéries dans une membrane » par un processus semblable à celui observé dans les macrophages (Takeuchi, 1967 ; Takeuchi & Sprinz, 1967). Dans les cellules non-phagocytaires comme les entérocytes, *Salmonella* déclenche sa propre internalisation *via* un système de sécrétion de type 3 codé par SPI-1 (T3SS-1). Elle sécrète un cocktail d'effecteurs dans le cytoplasme, induisant un remodelage intense du cytosquelette d'actine et de la membrane plasmique qui conduit à la formation de protubérances membranaires autour du site de contact entre *Salmonella* et la cellule hôte. Elle se retrouve dans un compartiment nommé *Salmonella-containing vacuole* (SCV) qui mature au cours de l'infection en acquérant des marqueurs endocytiques tels que Rab5, Rab7 et LAMP1, en s'acidifiant puis en modifiant son osmolarité. Ces modifications induisent l'inactivation de T3SS-1 et l'activation de T3SS-2, qui transforme la vacuole en une niche réplicative. Les SCV sont donc des compartiments hautement dynamiques dont le devenir intracellulaire dépend du type de cellule infectée (Pucciarelli & Garcia-Del Portillo, 2017 ; Stevenin et al., 2019).

Legionella pneumophila utilise également un système de sécrétion (Dot/Icm - T4SS) pour détourner la maturation de la vacuole primaire à son avantage. C'est une bactérie à Gram-négatif intracellulaire facultative, majoritairement retrouvée dans des milieux aquatiques, impliquée

dans la "maladie des légionnaires" (Fraser et al., 1977 ; McDade et al., 1977) qui provoque des infections pulmonaires. Une fois internalisée dans les macrophages, elle réside dans une *Legionella-containing vacuole* (LCV) et sécrète *via* un système de sécrétion de type IV de nombreux facteurs qui empêchent la fusion avec les endosomes tardifs et interfèrent avec le trafic des vésicules de transport entre le RE et l'appareil de Golgi, qui fusionnent avec la membrane de la LCV (Vaughn & Kwaik, 2021).

Coxiella burnetii est une bactérie intracellulaire obligatoire, responsable de la fièvre Q (Angelakis & Raoult, 2010). Une fois transmise par les aérosols, elle est phagocytée par les macrophages alvéolaires puis se retrouve dans une vacuole qui acquiert des propriétés phagolysosomales *via* la voie d'endocytose canonique. Ces compartiments sont de type « phagolysosome-like » appelés *Coxiella-containing vacuole* (CCV). Les CCV sont acides, contiennent des protéases lysosomales actives et sont décorées par LAMP1, la cathépsine D, l'ATPase vacuolaire, CD63 (LAMP3) et LC3 (Howe et al., 2010). *C. burnetii* est l'une des rares bactérie adaptée à l'environnement phagolysosomal. Elle sécrète des protéines effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte par un système de sécrétion Dot/Icm de type 4B (T4BSS) pour favoriser sa croissance au sein des CCV en bloquant leur maturation endosomale (Samanta et al., 2019).

3.2 Le cas de *Listeria monocytogenes*

Lm a longtemps été considérée comme l'archétype des bactéries pathogènes cytosoliques, mais elle apparaît aujourd'hui comme étant capable de résider à plus ou moins long terme dans des compartiments endomembranaires (**Figure 14**) (Bierne et al., 2018). Il existe aujourd'hui plusieurs travaux dont deux études récentes qui font état de la vie vacuolaire de *Lm* dans trois types de niches vacuolaires :

- des vacuoles dérivées de la vacuole d'entrée primaire dans les macrophages (les **SLAP**, et **rSLAP**) (Bhardwaj et al., 1998 ; Tran et al., 2022).
- des vacuoles dérivées de la vacuole d'entrée primaire dans les cellules épithéliales (**eSLAP)** (Peron-Cane et al., 2020).
- des vacuoles tertiaires de persistance (**LisCV**) dans les hépatocytes et les trophoblastes (Kortebi et al., 2017).

Les caractéristiques et spécificités associées à ces 3 types de vacuoles sont présentées dans les paragraphes suivants et recensées dans le **Tableau 1**.

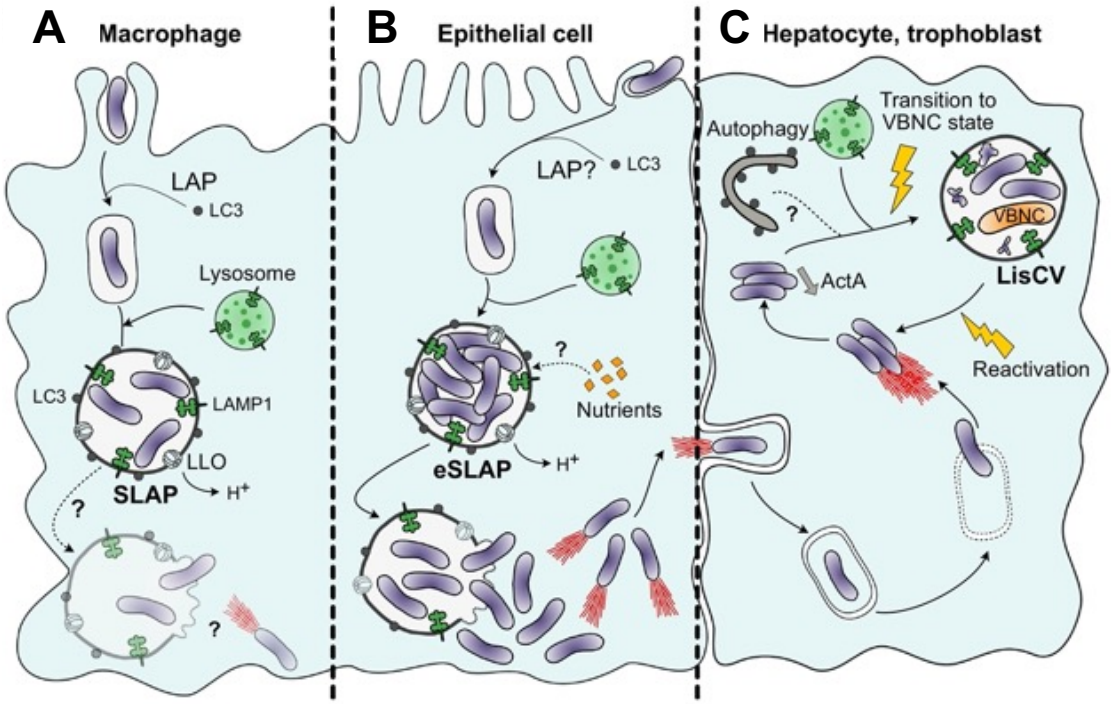


Figure 14 : Représentation de trois niches de résidence vacuolaire pour *L. monocytogenes* dans les macrophages, les cellules épithéliales, les trophoblastes et les hépatocytes (d'après Petit et al., 2022). Lors de la phase d'infection précoce, dans les macrophages et les cellules épithéliales, les bactéries résident dans des vacuoles qui dérivent de la vacuole primaire d'entrée, décorées par les marqueurs LC3 et LAMP1 et appelées respectivement SLAP et eSLAP. La réplication dans les eSLAP est plus efficace que dans les SLAP et conduit les bactéries à reprendre plus rapidement un mode de vie cytosolique. Lors de la phase d'infection à plus long terme, dans les hépatocytes et les cellules trophoblastique, un sous-ensemble de *Lm* cytosolique cesse de synthétiser ActA à sa surface et se retrouve piégé dans des vacuoles tertiaires appelées LisCV. Dedans, une sous-population de *Lm* persiste dans un état métabolique ralenti jusqu'à atteindre un état VBNC (*Viable but not cultivable*) et peut se réactiver par des mécanismes encore inconnus. Les mécanismes de formation des LisCV ne sont pas encore élucidés mais semblent associés à des mécanismes dérivés du processus d'autophagie.

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de vacuoles intracellulaires de *Lm*

"Spacious Listeria-containing phagosomes" (SLAPs)	"Epithelial SLAP-like vacuoles" (eSLAPs)	"Replication-permissive SLAPs" (rSLAPs)	"Listeria-containing vacuoles" (LisCVs)
Macrophages murins : - lignées cellulaires (RAW264.7 et J774) - macrophages murins dérivés de la moelle osseuse	Cellules épithéliales : -lignées cellulaires d'adénocarcinome du côlon (LoVo et Caco-2)	Macrophages murins : - lignées cellulaires (RAW264.7) - macrophages murins dérivés de la moelle osseuse	Cellules épithéliales humaines : - lignées cellulaires d'hépatocytes (HepG2, Huh7) et de trophoblaste (JEG-3 et BeWo) -Hépatocytes primaires humains
Large vacuole à simple-membrane	Large vacuole à simple membrane	Large vacuole à simple membrane	Vacuole à simple-membrane
LAMP1-positive	LAMP1-positive	LAMP1-positive	LAMP1-positive
LC3-positive	LC3-positive	LC3-positive	LC3-négative
pH neutre Cathépsine D-négative	pH neutre -	pH acide Cathépsine D-positive	pH acide Cathépsine D-positive
Temps d'infection précoce (1-4h) Faible proportion de la population de *Lm* internalisée	Temps d'infection court (jusqu'à 24h) Faible proposition de la population de *Lm* internalisée (12% pour EGD-e)	Temps d'infection précoce (entre 4h et 24h)	Temps d'infection tardif (2-3 jours) Forte proportion de la population de *Lm* dans les vacuoles (70/80% après 3 jours) Plusieurs LisCVs par cellule dans la région périnucléaire
Réplication lente voire inexistante	Réplication rapide	Réplication rapide	Réplication lente voire inexistante
Peut être associée à un processus de phagocytose LC3	Processus analogue à la voie de LAP		Processus inconnu
Dérive de la vacuole d'entrée (phagosome)	Dérive de la vacuole d'entrée (vacuole primaire d'internalisation)	Dérive de la vacuole d'entrée (phagosome) et de l'occupation artificielle du site d'activation de PrfA	Passage cytosolique avant la formation des LisCVs
Vacuole de persistance	Libération dans le cytosol après lyse de la vacuole (6-7h)	Dégradation intravacuolaire rapide	Vacuole de persistance
Présence dans les tissus de souris SCID infectées pendant 21 jours avec la souche 10403S	Aucune preuve dans les tissus	Aucune preuve dans les tissus	Aucune preuve dans les tissus
Bhardwaj et al., 1998 ; Birmingham et al., 2008	Peron-Cane et al., 2020	Tran et al., 2022	Kortebi et al., 2017

3.2.1 Compartiments vacuolaires dérivant des vacuoles primaires : SLAP et vacuoles de transcytose

a. *Spacious* Listeria-*containing phagosome (SLAP)*

Les travaux pionniers de Bhardwaj et coll. (1998) correspondent aux premières observations de la vie vacuolaire de *Lm*. Cette étude portait sur la caractérisation de la listériose chronique dans des souris atteintes de déficit immunitaire combiné sévère (*Severe Combined ImmuDeficiency* SCID), dépourvues d'immunité adaptative. Après plusieurs semaines, des observations de coupes histologiques de foie par microscopie électronique à transmission ont révélé la présence de *Lm* dans des vacuoles à simple membrane dans les macrophages hépatiques (**Figure 15.A**). Ces observations ont ensuite été reproduites puis mieux caractérisées dans des macrophages murins cultivés *in vitro*, par l'équipe de J.H. Brumell (**Figure 15.B**) (Birmingham et al., 2008). Ils attribuent le nom de « SLAP » (*Spacious* Listeria-*containing Phagosome*) à ces larges vacuoles, qui sont des compartiments à simple membrane, d'un diamètre d'environ 7 µm, contenant plusieurs bactéries marquées par le marqueur endosomal/lysosomal LAMP1 et le marqueur d'autophagie LC3 (**Figure 15.C** et **Partie B.2.3.3.**). Les SLAP ne sont ni acides ni marquées par la cathépsine D. Elles dérivent de la vacuole d'entrée et contiennent une sous-population de *Lm* intactes qui produisent une quantité insuffisante de LLO pour la lyse de la vacuole, mais suffisante et nécessaire pour bloquer la maturation du phagosome en phagolysosome dégradatif (Birmingham et al., 2008). La formation des SLAP semble également dépendante de la phagocytose associée aux protéines LC3 ou LAP (*LC3-associated phagocytosis*) (**Figure 15.C**) (Lam et al., 2013).

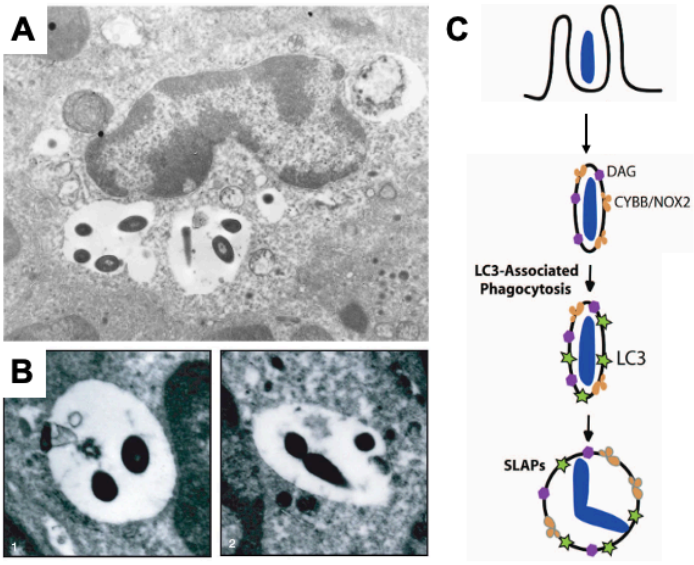


Figure 15 : Vie intracellulaire de *Lm* dans les SLAP et modèle de formation. A. Observation en microscopie électronique à transmission de macrophages hépatiques, à partir de souris immunodéficientes (SCID) infectées depuis 21 jours. Les *Lm* intactes sont identifiées dans des phagolysosomes dans des cellules mononucléaires (d'après Bhardwaj et al., 1998). **B.** SLAP dans des granulomes hépatiques après 21 jours d'infection de souris immunodéficientes (SCID), observés en microscopie électronique à transmission (d'après Birmingham et al., 2008). **C.** Modèle de formation des SLAP proposé par Lam et al., 2013. Le diacylglycérol (DAG) s'accumule à la surface du phagosome à la suite des activités phospholipases de *Lm* et de celles de l'hôte. L'accumulation favorise l'activation de la CYBB/NOX2 et la production de ROS. LC3 est ensuite recrutée à la surface des phagosomes à simple membrane contenant *Lm*, qui se réplique lentement.

Il a donc été proposé que la formation des SLAP résulte d'une « impasse » entre l'incapacité des macrophages à éliminer les bactéries et l'incapacité de *Lm* à sortir du phagosome et à se répliquer efficacement (Lam et al., 2013 ; Bierne et al., 2018 ; Petit et al., 2022).

b. *Epithelial SLAP-like vacuole (eSLAP)*

Des structures similaires appelées SLAP épithéliales ou eSLAP ont récemment été observées dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome du côlon (LoVo et Caco-2) (Peron-Cane et al., 2020). Comme dans les SLAP, ces vacuoles dérivent des vacuoles d'internalisation primaires, sont marquées par LC3 et permettent une réplication de *Lm*. Cependant, le taux de réplication observé dans les eSLAP est plus élevé que dans les SLAP, approchant l'efficacité de croissance cytosolique (1h40 contre 8h environ). LLO semble également jouer un rôle, à la fois dans la biogenèse des vacuoles avec une action probable sur la perméabilité membranaire pour l'accès aux nutriments et la libération cytosolique de *Lm* après plusieurs heures de résidence dans la vacuole. Les eSLAP sont décorées par des marqueurs de phagocytose et des endosomes tardifs tels que LC3, Rab7 et LAMP1, comme observé chez les SLAP des cellules phagocytaires. Les eSLAP semblent être dépendantes d'un mécanisme analogue à la voie LAP, qui reste à être caractériser dans les cellules épithéliales (Peron-Cane et al., 2020).

c. *Replication-permissive SLAP (rSLAP)*

Les rSLAP sont des vacuoles qui se forment « artificiellement » à la suite de l'occupation inhibitrice du site de co-activation de PrfA. Les auteurs ont testé une série de molécules qui ciblent certaines cascades de signalisation de cellules hôtes, en se focalisant sur l'expression des gènes de virulence de *Lm* lors de l'infection de macrophage. La molécule IWP-2

($C_{22}H_{18}N_4O_2S_3$) inhibe la production de WNT (voie de signalisation importante pour la prolifération et l'homéostasie cellulaire) et affecte l'expression des gènes de virulence de *Lm* en occupant le site de co-activation de PrfA (Tran et al., 2022) (**Figure 16**).

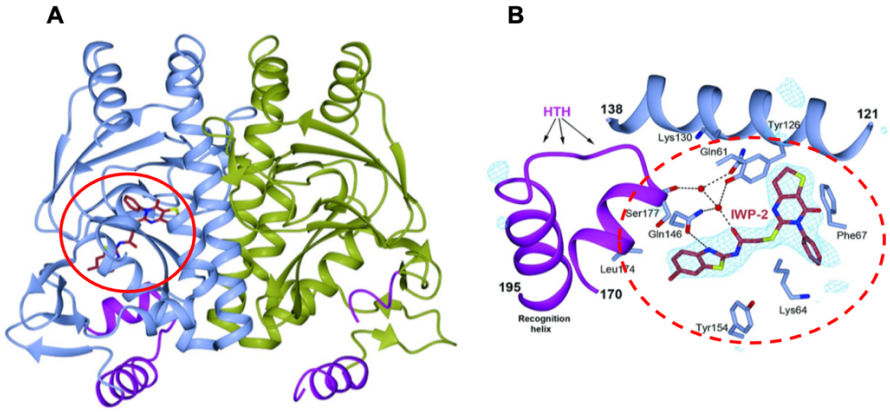


Figure 16 : Occupation du site de co-activation de PrfA par la molécule inhibitrice IWP-2 (d'après Tran et al., 2022). A. Structure cristallisée de PrfA (bleu et vert) en complexe avec IWP-2, représenté en bâton. **B.** Zoom sur l'interaction entre PrfA et IWP-2 avec représentation des acides aminés à proximité. La densité électronique des atomes de IWP-2 est aussi représentée (5 Å autour de chaque atome).

Les rSLAP ont donc été observées dans les macrophages (**Figure 17**) et se présentent sous la forme de larges vacuoles à simple membrane spacieuses qui favorisent une réplication bactérienne rapide et étendue. Comme les SLAP et les eSLAP, elles sont issues des vacuoles primaires d'entrée mais avec une dynamique temporelle distincte. Dans les premiers temps de formation, elles ne sont ni décorées par LAMP1, ni par la cathépsine D et présentent un pH neutre. Puis, elles évoluent progressivement vers des compartiments lysosomaux dégradatifs (acquisition des marqueurs LAMP1, cathépsine D et d'acidité) ce qui contribue à l'élimination finale de *Lm* dans le macrophage infecté. Ce processus est corrélé à l'accumulation de LLO qui déséquilibre l'intégrité membranaire de la vacuole. D'autres facteurs affectés par l'inhibition de PrfA pourraient également avoir un rôle dans la réplication intra-rSLAP de *Lm*.

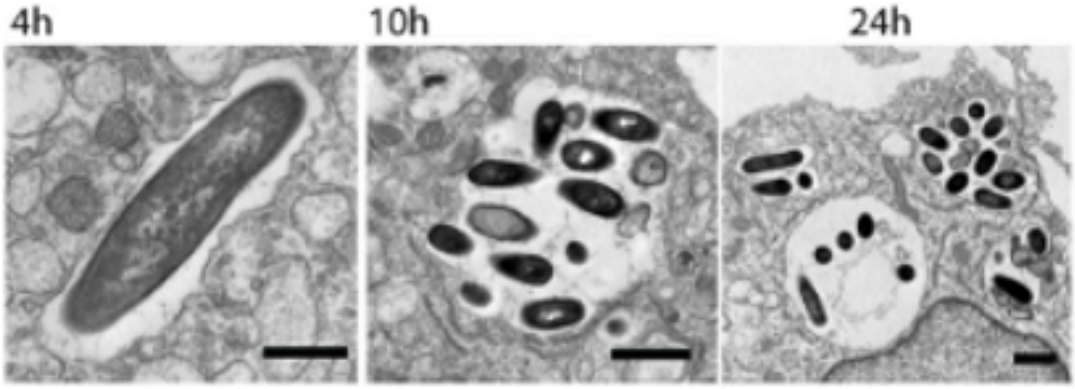


Figure 17 : Formation des rSLAP observées en microscopie électronique à transmission en fonction du temps dans des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (d'après Tran et al., 2022).

d. *Vacuoles de transcytose dans les entérocytes*

La translocation de *Lm* à travers l'épithélium intestinal est médiée par l'interaction entre InlA et E-cad. Elle se produit à travers les cellules caliciformes, sur lesquelles E-cad est luminalement accessible, *via* un mécanisme encore inconnu (Kim et al., 2021). Dans un modèle *ex vivo*, basé sur la micro-injection intraluminale de *Lm* dans des organoïdes intestinaux (issu de l'intestin de souris avec une E-cad génétiquement modifiée E16P KI), *Lm* transloque du pôle apical au pôle basolatéral de l'intestin dans une vacuole dépendante des microtubules et de InlA. Les résultats suggèrent que *Lm* détourne la voie de recyclage de l'E-cad pour être transférée par transcytose à travers les cellules caliciformes (Kim et al., 2021).

3.2.2 Vacuoles tertiaires de persistance dans les cellules épithéliales : *les Listeria-Containing Vacuoles* (LisCV)

Les LisCV ont été décrites par l'équipe d'Hélène Bierne en 2017 dans des hépatocytes et cellules trophoblastiques humaines. Elles se forment spécifiquement lors d'un temps d'infection prolongé, après une phase active de dissémination. Après 2-3 jours d'infection, *Lm* cesse de synthétiser la protéine de surface ActA, de polymériser l'actine et est capturée dans des structures membranaires qui forment les LisCV. Ces vacuoles ne dérivent donc pas des vacuoles primaires et sont considérés comme des vacuoles « tertiaires » (**Figure 18**). Comme les SLAP, elles ont une simple membrane et sont positives pour le marqueur LAMP1. Contrairement aux SLAP, elles sont négatives pour LC3, positives pour la cathépsine D et acides, ce qui indique qu'elles fusionnent avec les lysosomes. Les LisCV peuvent également être conservées durant la mitose et transmises aux cellules filles, de la même façon que les

lysosomes. Malgré des conditions dégradatives, la majorité des bactéries conservent une membrane intacte et entrent dans un état réplicatif ralenti, voire non-réplicatif, et pourraient atteindre un état VBNC. Les mécanismes associés à la formation des LisCV ne sont pas encore élucidés mais l'implication de la voie canonique d'autophagie a été écartée (Kortebi et al., 2017 ; Bierne et al., 2018). Enfin, des données *in vitro,* après sous-culture des cellules infectées, suggèrent qu'une sous-population de *Lm* pourrait s'échapper des LisCV et se réactiver pour de nouveau proliférer dans le cytosol. Ces données suggèrent que les *Lm* intra-vacuolaires peuvent persister en se propageant dans les cellules dans un état de dormance, échappant au système immunitaire mais en conservant la capacité de se réactiver et initier un nouveau cycle d'infection au moment opportun (Kortebi et al., 2017). Les auteurs spéculent également que cette stratégie pourrait contribuer au portage asymptomatique du pathogène chez l'homme et l'animal (**§A.6**) et dans la transmission du pathogène dans un contexte « One-Health ». De plus, elle pourrait expliquer les temps d'incubation longs observés lors de listériose invasive chez la femme enceinte ainsi que les listérioses récurrentes (Goulet et al., 2013 ; Bierne et al., 2018).

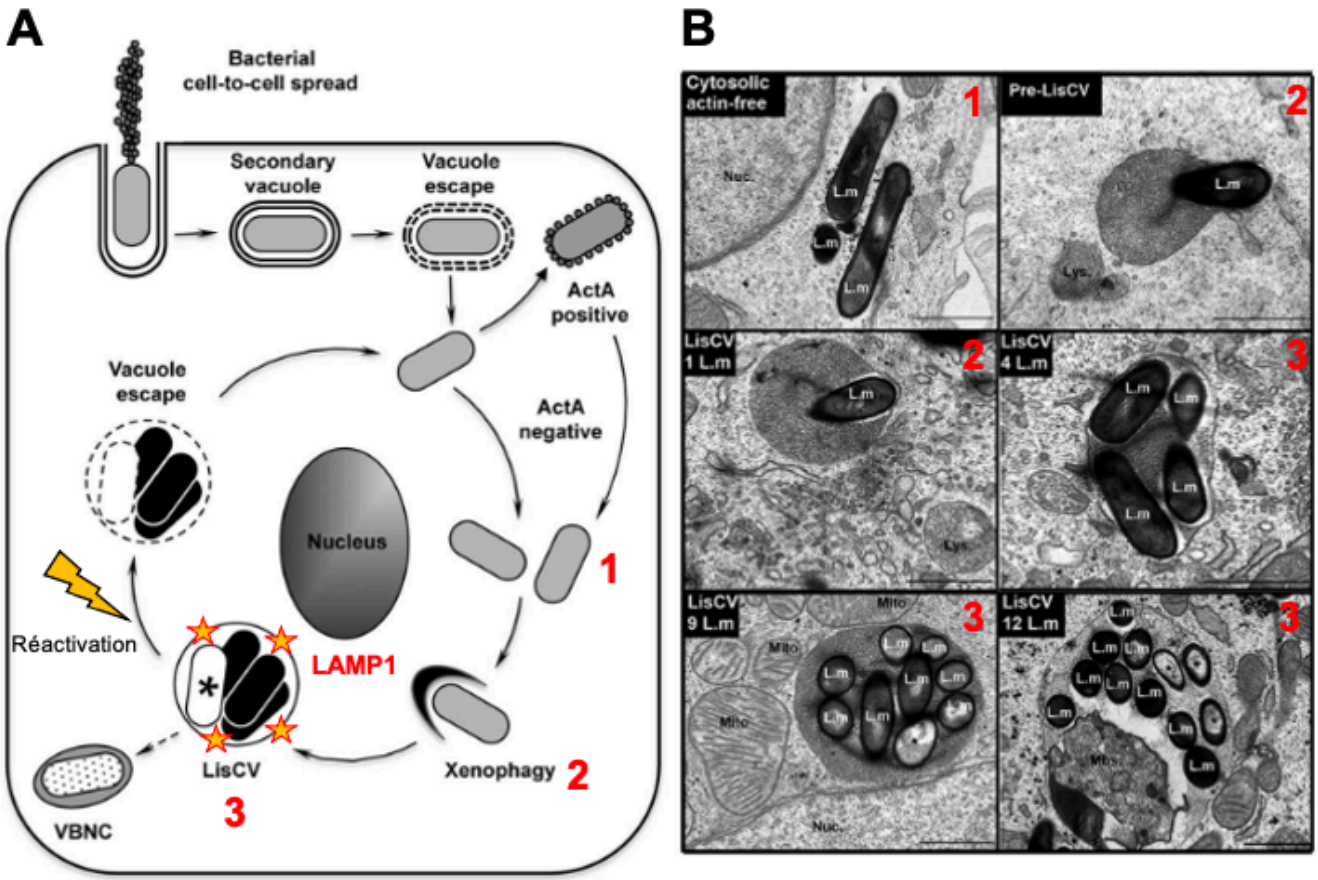


Figure 18 : Cycle de vie intracellulaire de *L. monocytogenes* et modèle de formation des LisCV dans des hépatocytes humains ou des cellules trophoblastiques (adapté de Bierne et al., 2018). **A.** Après une étape de dissémination active où *Lm* se propage de cellule à cellule, *Lm* cesse de produire la protéine de surface ActA après l'échappement de la vacuole secondaire (1). Les bactéries se multiplient dans le cytosol (1) et sont capturées par un mécanisme encore non identifié qui pourrait s'apparenter à un mécanisme de type xénophagie (2) qui conduit à la formation les LisCVs (3). Dans ces compartiments décorés par le marqueur des lysosomes LAMP1, on retrouve une population hétérogène de bactéries avec des bactéries dégradées (*) et des bactéries intactes dans un état réplicatif ralenti (noir). Dans certaines conditions, les bactéries peuvent sortir de la vacuole et ré-initier un nouveau cycle d'infection. **B.** Images de microscopie électronique à transmission qui illustrent les différentes étapes de la formation des LisCVs dans le modèle cellulaire trophoblastique. Les bactéries dégradées sont marquées « * ». Les chiffres correspondent aux différentes étapes schématisées en A.

C. La persistance et l'état viable mais non cultivable (VBNC) de *Listeria monocytogenes*

1. La persistance, une définition controversée

Le terme de "persistance" peut être utilisé dans différents contextes et sa définition reste controversée au sein de la communauté scientifique. Un consensus ressort néanmoins pour décrire les bactéries en état de "persistance" comme une sous-population bactérienne isogénique, pouvant survivre à l'exposition de stress létaux et isolées à plusieurs reprises dans un échantillon (Ferreira et al., 2014). La persistance peut être employée pour parler de la survie à long terme de pathogènes dans l'organisme (infection persistante), dans une matrice alimentaire, sur les surfaces ou au sein de biofilm. Les mécanismes de survie associés sont des états métaboliques ralentis, de "dormance" ou d'état *viable but not culturable* (VBNC) au sein de l'hôte ou de "*persisters*" lorsque l'on parle d'une sous population de bactérie tolérante aux antibiotiques (Bierne et al., 2018 ; Balaban et al., 2019 ; Lotoux et al., 2022). La notion de persistance est différente de celle de résistance. En effet, la persistance sous-entend des changements phénotypiques réversibles au sein d'une sous-population, contrairement à la résistance qui implique des changements génétiques irréversibles du pathogène pour l'ensemble de la population (Kussel et al., 2005 ; Ronneau et al., 2021). Ces différentes notions sont détaillées plus précisément dans le **Tableau 2**

Tableau 2 : Définitions des termes utilisés pour décrire les stratégies de survie des bactéries selon leur niche écologique (d'après Lotoux et al., 2022)

Terme	Définition
État dormant	Les bactéries sont dans un état dormant lorsqu'elles cessent de se diviser et réduisent fortement, voire complètement, leur activité métabolique lorsqu'elles sont exposées à un stress. Sous l'effet de stimuli spécifiques, ces cellules retrouvent leur activité et ont la capacité de se diviser à nouveau. Ce terme générique comprend différents phénotypes (tels que les états de persistance et VBNC).
État viable mais non cultivable	Les bactéries sont dans un état VBNC lorsqu'elles ont transitoirement perdu leur capacité à se développer sur le milieu de croissance habituel sur lequel elles étaient auparavant capables de se développer. Ces bactéries présentent une activité métabolique faible mais détectable, maintiennent l'intégrité de leur membrane, expriment des gènes et produisent des protéines à de faibles niveaux. Elles ne peuvent pas être détectées par des unités formant colonies (UFC) sur des milieux de culture standards. Dans des conditions appropriées, les bactéries VBNC retrouvent leur capacité à être cultivées grâce à un processus appelé réanimation.

État sublétal	Les bactéries sont dans un état sublétal lorsqu'elles ont subi des dommages aux structures cellulaires dus à des processus chimiques ou physiques, mais ne sont pas tuées et ont la capacité de réparer leurs dommages dans des conditions appropriées. Elles peuvent se développer sur des milieux de culture, cependant non sélectifs. Les cellules blessées de façon sublétale qui restent métaboliquement actives mais ne peuvent pas être réanimées dans un milieu de culture peuvent entrer dans l'état VBNC.
État de persistance	Les bactéries sont en état de persistance lorsqu'elles entrent dans un état de croissance lente ou nulle et qu'elles sont capables de survivre au stress au sein d'une population clonale par ailleurs sensible au stress. Il s'agit d'un terme général qui décrit un processus adaptatif et réversible. Ce terme est souvent associé aux *persisters*.
Persisters	Ce terme définit une sous-population de bactéries qui survivent à un traitement antibiotique, sans acquérir de modifications génétiques qui leur confèrent une résistance. Les persisters sont réfractaires au traitement antibiotique *in vitro* ou chez l'hôte en raison d'une faible activité de la cible ou d'une faible absorption de l'antibiotique.
Infection persistante	Ce terme clinique désigne une infection qui n'est pas efficacement éliminée par l'hôte. Les bactéries survivent dans les tissus de l'hôte pendant une période prolongée malgré les défenses immunitaires de l'hôte.
Infection latente	Ce terme clinique désigne une infection asymptomatique persistante. On parle d'infection latente lorsqu'un microbe persiste dans un hôte sans perturber suffisamment l'homéostasie pour provoquer des symptômes cliniques ou une maladie. La latence peut être bénéfique à la fois pour l'hôte et pour le microbe, dans un équilibre où l'hôte évite les dommages progressifs dus à l'interaction avec le microbe et où le microbe s'assure une niche stable dans laquelle il peut survivre. La latence peut être délétère pour l'hôte lorsqu'une infection latente se réactive, provoquant une maladie symptomatique des mois ou des années après l'infection initiale.

2. Mécanismes de persistance dans l'environnement et dans les ateliers agro-alimentaires

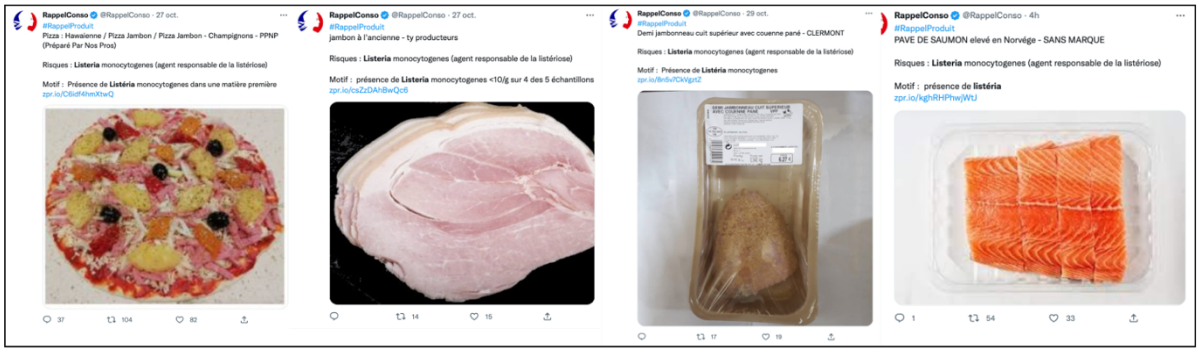


Figure 19 : Exemples de produits rappelés entre le 27 et le 31 octobre 2022, en France (d'après le compte officiel @RappelConso du gouvernement français, sur la plateforme Twitter)

Bien que la réglementation et la gestion des risques associées à la présence de *Lm* dans les matrices alimentaires soient très strictes, l'élimination du pathogène reste un défi pour les industriels. Nombreux sont encore les produits régulièrement rappelés au sein des ateliers agro-alimentaires (**Figure 19**), car susceptibles de causer des infections graves chez l'homme (Lianou & Sofos, 2007).

L'une des explications de la présence répétée de *Lm* dans les aliments est sa capacité à persister sur les chaînes de production, quel que soit le type d'aliment transformé (fromage (Fox et al., 2011), viande (Senczek et al., 2000), poisson (Vogel et al., 2001)). On considère qu'une souche est persistante (ou récurrente) quand elle est retrouvée dans un même endroit à plusieurs reprises, même après nettoyage et désinfection (Carpentier & Cerf, 2011 ; Ferreira et al., 2014). Elle peut ainsi être détectée pendant plusieurs mois ou plusieurs années (Tompkin, 2002 ; Ferreira et al., 2014). Les industriels doivent s'assurer qu'il s'agisse bien du même clone au cours du temps et pas d'une contamination récurrente traduisant une entrée répétée de clones différents.
Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la persistance de *Lm*, notamment, sa capacité à adhérer aux surfaces et/ou former des biofilms, à résister aux traitements désinfectants sur les lignes de production ainsi que le fort seuil de tolérance aux antibiotiques parmi une petite partie de sa population. Ces trois hypothèses sont développées dans la suite du manuscrit.

2.1 Capacité de *Listeria monocytogenes* à former des biofilms sur les surfaces

La formation de biofilms est initiée par l'adhérence de bactéries, grâce à des liaisons non-covalentes, à des surfaces d'origine biologique (muqueuse) ou abiotique qui inclue les supports présents dans les ateliers agroalimentaires (acier inoxydable, marbre, silicone, par exemple) (Beresford et al., 2001 ; Verran et al., 2008). Les bactéries colonisent ensuite la surface et produisent une matrice d'exopolysaccharides (EPS). Elles forment ainsi des agrégats puis des micro-colonies dont l'attachement à la surface est irréversible. Les bactéries continuent de proliférer pour créer une structure dynamique (maturation du biofilm, construction de canaux pour l'écoulement des nutriments/déchets organiques). Une fois le biofilm mature, les bactéries peuvent se disperser pour coloniser d'autres surfaces et entamer un nouveau cycle (da Silva et al., 2012 ; 2013 ; Veerachamy et al., 2014).

Certaines études ont mis en évidence un lien entre la capacité à former des biofilms et certaines souches de *Lm* persistantes isolées des ateliers (Nowak et al., 2017). Cependant, le lien n'est pas clairement établi. Néanmoins, le mode de vie en biofilm permet de protéger les bactéries contre les actions antimicrobiennes, les biocides et le séchage, grâce à une structure robuste et à la protection physique de la matrice extracellulaire, ce qui constitue une réelle préoccupation pour les industriels (Pan et al., 2006 ; Hingston et al., 2013). La formation des biofilms participe à la création de « niches » au sein des équipements ou des installations, qui peuvent être difficiles d'accès pour désinfection ou difficiles à identifier (Belias et al., 2022).

2.2 Résistance de *Listeria monocytogenes* aux procédures de nettoyage et de désinfection

L'utilisation de désinfectants est très largement répandue au sein des industries agro-alimentaires, afin d'assainir les équipements, les chaînes de production, les outils ainsi que les tuyaux de nettoyage, pour limiter au maximum le risque de propagation des microorganismes. (Wirtanen & Salo, 2003 ; Beauclair et al., 2011). Les différentes étapes de désinfection en France et en Europe sont référencées et soumises à des normes très strictes (NF EN ISO 862, EN T72-101). Les désinfectants les plus utilisés sont les composés à base d'ammonium quaternaire (*quaternary ammonium compounds, QACs*) et les composés chlorés (Wirtanen & Solo, 2003). L'usage de désinfectants est fréquent (au minimum quotidien) et peut donc exercer une pression de sélection qui favorise l'apparition de mécanismes de résistance ou l'acquisition de matériel génétique en réponse aux désinfectants utilisés (Ferreira et al., 2014). Le lien entre la tolérance/résistance aux désinfectants et la persistance, comme pour la formation des biofilms, n'est pas établi (Fox et al., 2011 ; Costa et al., 2016). Cependant, quelques études font cas de résistance aux désinfectants plus élevée chez les souches persistantes par rapport aux souches considérées comme non-persistantes (Aase et al., 2000 ; Lundén et al., 2003 ; Fox et al., 2011).

Afin de limiter les risques d'apparition de résistance aux désinfectants chez les souches dites "persistantes", les industriels mettent en place diverses méthodes alternatives avec notamment l'utilisation de la vapeur sèche, des UV, de lumière pulsée ou de bactériophages. Ces procédés ont l'avantage d'être généralement plus écologiques, avec un coût de production énergétique moins élevé. Cependant, les coûts d'investissement restent importants (Cappitelli et al., 2014 ; Pfendler et al., 2018 ; Hwang et al., 2021 ; Liu et al., 2021).

2.3 Déterminants moléculaires impliqués dans la persistance en industrie

Les données de la littérature sont encore une fois contradictoires concernant les possibles propriétés intrinsèques des souches persistantes par rapport aux souches sporadiques. On peut tout de même souligner l'importance de certains facteurs impliqués dans la mobilité cellulaire, l'adhérence aux surfaces et la communication cellulaire (*quorum sensing*) qui semblent jouer un rôle dans la persistance des souches de *Lm*. Ces facteurs sont présentés dans le **Tableau 3**. Certains gènes de résistance aux stress peuvent également participer à la tolérance aux désinfectants des souches persistantes, comme ceux appartenant aux *stress survival islet* SSI-1 et SSI-2 (Harter et al., 2017) (**§D.3**).

Tableau 3 : Exemples de déterminants moléculaires impliqués dans la formation de biofilm et indirectement dans la persistance chez *L. monocytogenes* (d'après Kocot et al., 2017)

Facteurs de *Lm*	Rôle dans la formation des biofilms	Références
Flagelle	Adhérence aux surfaces, mutants de délétion affectés dans la formation de biofilm	Vatanyoopaisarn et al., 2000
PrfA	Facteur de virulence et régulation de la biosynthèse du flagelle	Lemon et al., 2010
LuxS	Inhibition de la formation des biofilms, production de l'auto-inducteur AI-2 (*quorum sensing*)	Challan Belval et al., 2006
Système *agr*	Adhérence et régulation des phases précoces de formation du biofilm	Rieu et al., 2007
relA	Régulation de la réponse après carence nutritive	Taylor et al., 2002
hpt	Régulation de la réponse après carence nutritive	Taylor et al., 2002
BapL	Rôle potentiel mais qui reste à caractériser dans l'adhérence	Jordan et al., 2008
SecA2	Mutants de délétion qui promeuvent l'aggrégation des cellules et la formation de biofilm mais dont l'architecture est affectée	Renier et al., 2014

3. Les cas des "*persisters*" tolérants aux antibiotiques

Les *persisters* ont été pour la première fois mentionnés par Joseph Bigger en 1944, après l'observation d'une petite sous-population de *Staphylococcus pyogenes* survivante après des traitements avec de la pénicilline (Bigger et al., 1944). Les *persisters* désignent une sous-population de bactéries qui ne se multiplient pas mais qui sont capables de survivre à l'exposition d'une forte concentration d'antibiotique alors que la majorité de la population y succombe (Balaban et al., 2019). Lors de la première phrase d'exposition à une concentration létale d'antibiotique, on observe un déclin rapide de la cultivabilité en raison de la mort de la majorité des bactéries sensibles. Durant la deuxième phase, le nombre de cellules diminue plus lentement, de façon graduelle et est majoritairement constitué des survivantes, ou *persisters,* soit 1% de la population initiale (**Figure 20**) (Van den Bergh et al., 2017 ; Ayrapetyan et al., 2018). Les *persisters* peuvent apparaître de manière stochastique dans les cultures en croissance

mais aussi après l'exposition à des conditions stressantes autres que la pression antibiotique (carence nutritive, *in cellulo*, stress oxydatif, pH suboptimal, dommages à l'ADN, biofilm) (Stewart et al., 2008 ; Vega et al., 2012 ; Wu et al., 2012 ; Bernier et al., 2013 ; Helaine et al., 2014).

La capacité de *Lm* à former des *persisters* a été pour la première fois décrite par les travaux de Knudsen et coll. (2013) après exposition à des antibiotiques bactéricides tels que la norfloxacine ou la gentamicine. Récemment, des travaux ont mis en évidence l'implication du système à deux composants (TCS) LisRK dans la tolérance à l'ampicilline. La fraction de souches survivantes, après 24 h d'exposition à des niveaux 1.000 fois supérieurs à la concentration inhibitrice, était 20.000 fois plus élevée chez la souche sauvage comparée à la souche délétée de *lisRK* (Aslan et al., 2021). Plusieurs auteurs suggèrent un lien possible entre l'existence des *persisters*, tolérants aux traitements répétés, et des cas d'infections chroniques (Fauvart et al., 2011). Néanmoins, les mécanismes associés à ces changements phénotypiques de tolérance restent à mieux comprendre (Madhusoodanan et al., 2022).

D'autres réservoirs d'infections bactériennes persistantes et récurrentes, bien caractérisés chez *Staphylococcus aureus,* et également présents chez *Lm*, sont les *Small Colony Variants* (SCV) (Kahl et al., 2016). Ce sont des variants phénotypiques à croissance lente, qui apparaissent sous la forme de petites colonies sur gélose, résultant de mutations dans la chaîne de transport d'électrons, sous une forte pression de sélection, en particulier en présence d'antibiotique (Melter & Radojevic, 2010). Ils peuvent présenter d'autres caractéristiques phénotypiques comme une altération du métabolisme du carbone, une diminution de la production de toxines et d'enzymes lytiques, une résistance aux aminoglycosides ainsi qu'une persistance intracellulaire accrue (Balwit et al., 1994 ; Proctor et al., 2014).

Chez *Lm*, la formation de petites colonies a été observée en réponse à des conditions de stress extracellulaire comme l'exposition à H_2O_2 (Rea et al., 2005), l'exposition à des doses sublétales de triclosan (Kastbjerg et al., 2014) ou après une exposition à différents désinfectants utilisés dans l'industrie agro-alimentaire (Arvaniti et al., 2021). Il a également été montré que les bactéries provenant des SCV survivent mieux, par rapport à la souche *Lm* sauvage, après 48h d'exposition, à des fortes concentrations d'antibiotiques et dans des macrophages produisant des ROS (Curtis et al., 2016). Il est intéressant de noter que les auteurs placent la formation des SCV au stade initial du « *continuum* de dormance », avec un potentiel de réanimation rapide

dès la suppression du stress, avant d'atteindre le stade VBNC qui constitue un stade de dormance plus profond (Arvaniti et al., 2021). En effet, les stress qui induisent la persistance peuvent dans la majorité des cas aussi induire un état VBNC (**Figure 20**), ce qui suggère que ces deux états peuvent être apparentés et appartenir au même cycle de vie (Ayrapetyan et al., 2018). La sélection de SCV de *Lm* intracellulaires n'a encore jamais été décrite pour *Lm.* Néanmoins, comme pour les *persisters*, l'étude des SCV pourrait contribuer au développement de meilleures stratégies de traitement, en particulier lors des échecs thérapeutiques récurrents.

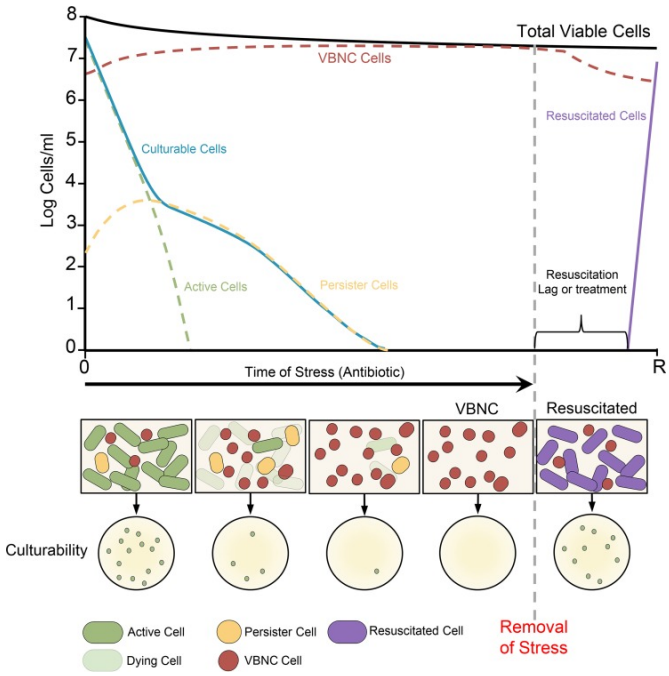


Figure 20 : Croissance expérimentale de *Lm* après exposition aux antibiotiques – Mise en évidence de cellules « dormantes », de *persisters* et de cellules VBNC (d'après Ayrapetyan et al., 2018). Après une exposition antibiotique à dose létale, les bactéries qui restent cultivables sont les *persisters*. On observe la courbe classique de destruction biphasique avec la pente initiale générée par la mort des bactéries sensibles et la pente de la seconde phase générée par les *persisters* survivants. Les bactéries VBNC sont également mises en évidence. Lors de la suppression de l'antibiotique, les bactéries modifient leur physiologie en vue d'une sortie de l'état de dormance et retrouvent la capacité de se développer.

4. Persistance chez l'hôte

La formation de niches intracellulaires pourrait également contribuer à la persistance de *Lm*. Dans cette partie, on peut évoquer notamment les SLAP (**§B.3.2.1.a**) et les LisCV (**§B.3.2.2**). Les bactéries contenues dans les SLAP, au sein des macrophages, ne sont pas dégradées et peuvent survivre à long terme car les SLAP ne fusionnent pas avec le lysosome, contrairement aux phagosomes (Birmingham et al., 2008 ; Lam et al., 2013).

Dans les LisCV, les mutants déficients pour la protéine de surface ActA (EGDe-Δ*actA*) sont capturés dans les vacuoles plus efficacement que pour la souche sauvage après 3 jours d'infection. Lors de la propagation des cellules épithéliales durant 10 jours, les bactéries sont toujours observables en microscopie au sein des vacuoles, avec une membrane intacte (Live&Dead) mais ne forment pas de colonies sur boîte, ce qui suggère qu'elles peuvent persister dans les cellules épithéliales durant plusieurs jours voire plusieurs semaines dans un état VBNC. Dans ce modèle EGDe-Δ*actA*, il a été mis également en évidence que les bactéries vacuolaires semblaient plus tolérantes aux antibiotiques, en particulier à la gentamicine. Après 3 jours d'infection, la gentamicine peut pénétrer les cellules mais n'élimine que les bactéries cytosoliques sans affecter le nombre de bactéries intra-LisCV Il a aussi été montré que les LisCV peuvent être transmises aux cellules filles lors des mitoses, ce qui pourrait permettre leur propagation dans les tissus en renouvellement. (Kortebi et al., 2017).

Lm peut également optimiser sa survie dans les cellules hépatocytaires en modulant la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi les gènes dérégulés lors d'infection long terme, et en corrélation avec la formation des vacuoles de persistance intracellulaire de *Lm* (LisCV) (Kortebi et al., 2017), on retrouve une forte activation de la réponse interféron (IFN). Il s'agit d'une répression des gènes qui codent pour des protéines de la phase aiguë (*acute phase proteins, APPs*), exprimées en réponse à l'inflammation, avec pour conséquence une diminution de la réponse pro-inflammatoire (*acute phase response, APR*). Ces observations suggèrent une survie accrue de *Lm* dans le foie et donc une possible persistance dans l'organisme, *via* un mécanisme actif de *Lm* dans la cellule hôte qui reste encore à caractériser (Descoeudres et al., 2021).

5. L'état *viable but not cultiva*ble (VBNC) de *Listeria monocytogenes*

L'entrée dans un état viable mais non cultivable (*viable but not culturable* VBNC) est l'une des stratégies de survie employée par *Lm,* une bactérie non-sporulée, afin de survivre aux différents stress environnementaux rencontrés. C'est un état de dormance, réversible, d'activité ralentie,

dans lequel une sous-population de cellules bactériennes peut survivre pendant des périodes prolongées sans division cellulaire. Cette propriété a été décrite il y a 20 ans pour *Lm* dans l'eau (Besnard et al., 2000) et plus récemment dans les cellules humaines (Kortebi et al., 2017). Cette découverte montre que les bactéries VBNC perdent transitoirement la capacité à se développer sur les milieux de culture standards où elles forment habituellement des colonies. Les bactéries VBNC peuvent retrouver la capacité de croître dans certaines conditions, appelée "réanimation" (Oliver, 2010 ; Li et al., 2014 ; Zhao et al., 2017). Elles peuvent donc échapper aux tests de détection réalisés au sein des ateliers agroalimentaires et retrouver des conditions de réplication au sein des aliments ou chez l'hôte (Lotoux et al., 2022). Les bactéries VBNC sont également soupçonnées de provoquer des infections asymptomatiques et de contribuer à la persistance chez l'hôte. Nous présentons quelques arguments en faveur de la contribution des VBNC dans le portage asymptomatique chez les animaux et l'homme, ainsi que dans la persistance et la transmission entre les différentes niches écologiques, dans un contexte "*One-Health*" dans notre revue "The Viable But Non-Culturable State of *Listeria monocytogenes* in the One-Health *continuum*", située en **Annexe I**.

D. Biodiversité de l'espèce *Listeria monocytogenes*

1. Diversité de l'espèce *Listeria monocytogenes*

1.1 Structure phylogénétique de l'espèce

L'espèce *Lm* a d'abord été classée en 13 sérotypes (**Tableau 4**) basés sur l'agglutination des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H). Cette méthode a été mise en place par Paterson en 1940 puis modifiée par Seeliger et Höhne en 1979 (Paterson, 1940 ; Seeliger & Höhne, 1979).

Tableau 4: Les 13 sérotypes de *L. monocytogenes* (d'après Seeliger & Höhne, 1979).

Espèce	Sérotype	Antigènes somatiques (O)	Antigènes flagellaires (H)
L. monocytogenes	1/2a	I II (III)	AB
	1/2b		ABC
	1/2c		BD
	3a	II (III) IV	AB
	3b		ABC
	3c	II (III) IV (XII) (XIII)	BD
	4a	(III) (V) VII IX	ABC
	4ab	(III) V VI VII IX X	
	4b	(III) V VI	
	4c	(III) V VII	
	4d	(III) (V) VI VIII	
	4e	(III) V VI (VIII) IX	
	7	(III) XII XIII	

Le développement de méthodes de typage phénotypiques, basées sur le polymorphisme électrophorétique des enzymes (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*, MLEE), ou moléculaires basées sur l'électrophorèse en champ pulsé (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), a permis d'établir des liens phylogénétiques étroits et fiables entre les souches et de différencier *Lm* en deux lignées principales (I et II) (Piffaretti et al., 1989 ; Brosch et al., 1991 ; Buchrieser et al., 1992). Rasmussen et al., ont fourni les premières preuves d'une troisième lignée phylogénétique (III) sur la base d'analyses de séquences partielles d'ADN (*flaA*, *iap*, *hly* et 23S rRNA). Les isolats de la lignée III se répartissaient en trois sous-groupes (IIIA, IIIB, IIIC) (Rasmussen et al., 1995 ; Roberts et al., 2006). La lignée IIIB a ensuite été reclassifiée en lignée IV (Ward et al., 2008). La plupart des isolats de *Lm* appartiennent aux lignées I et II. Les isolats des lignées III et IV sont rares et principalement isolés de sources animales (Orsi et al., 2011 ; Lee et al., 2018 ; Anwar et al., 2022).

En 2003, une nouvelle méthode de *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) a été développée et utilisée pour affiner la structure de la population de l'espèce. Cette méthode est basée sur la comparaison des séquences de sept gènes de ménage (*acbZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* et *lhkA*).

Les isolats avec le même profil allélique sont groupés au sein du même « *sequence type* » (ST) et les ST qui diffèrent de seulement un gène sont groupés en complexes clonaux (CC) (Salcedo et al., 2003). Les travaux de Ragon et coll. ont mis en évidence 126 différents ST répartis dans 23 CC à partir de 360 isolats (Ragon et al., 2008) (**Figure 21**).

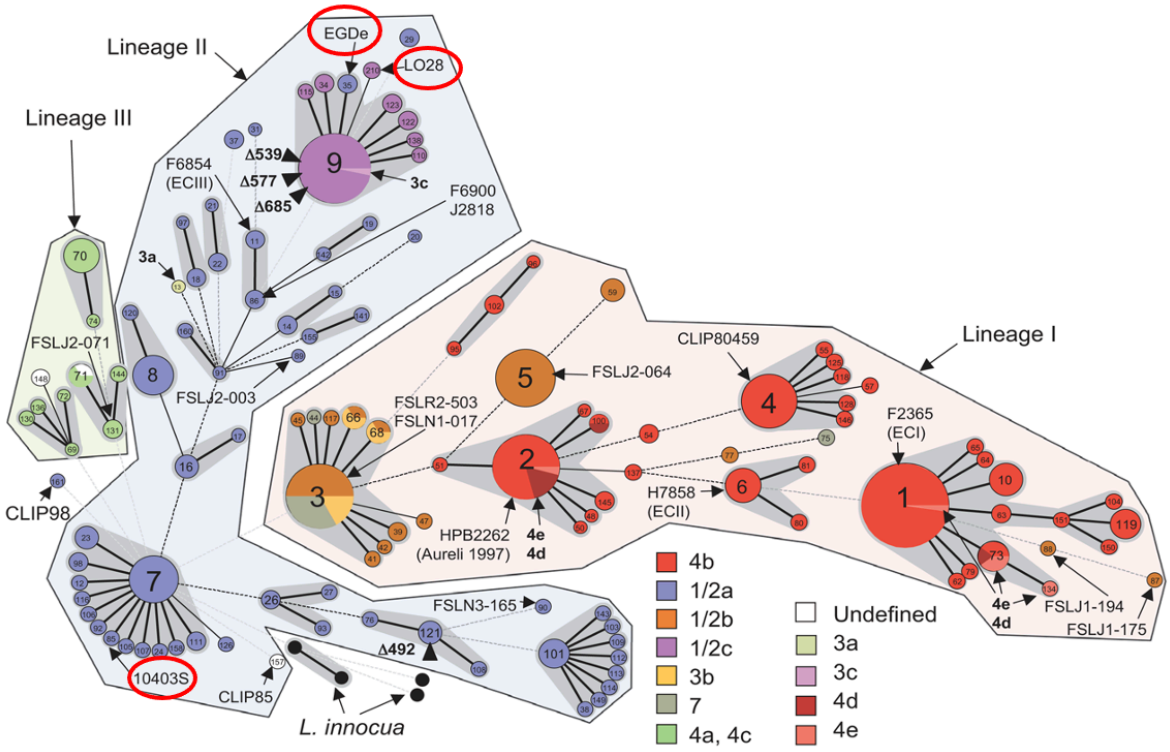


Figure 21 : Arbre phylogénétique de la population de *L. monocytogenes* basé sur les données MLST de 360 isolats (d'après Ragon et al., 2008). Chaque cercle correspond à un « *Sequence Type* » (ST). Les zones grises entourent les ST des souches qui appartiennent au même complexe clonal (CC). La couleur du ST dépend du sérotype auquel il appartient, mentionné en légende. Le numéro du ST est noté dans le cercle qui est agrandi lorsque le génotype central définit le CC principal (par exemple, ST9 définit le génotype central de CC9). Chaque lignée principale est entourée : la lignée I en rouge, la lignée II en bleu et la lignée III en vert. Les lignes entre les ST représentent le nombre de différences alléliques entre ST, de 1 à plus de 4, selon l'épaisseur de la ligne (trais épais, fin, discontinu et gris clair discontinu). Les formes tronquées de InlA sont indiquées par un triangle noir, avec la position des *Premature Stop Codon* (PMSC) indiquée après le Δ. Les principales souches de référence telles que 10403S, EGDe et LO28 sont entourées en rouge sur la figure (**§D.1.3**).

Avec l'essor des nouvelles méthodes de séquençage et la baisse des coûts, cette méthode MLST a été étendue à l'échelle du "core", génome "corps" ou "conservé" (*core genome* MLST, cgMLST) (Chen et al., 2016 ; Moura et al., 2016 ; Disson et al., 2021), du génome entier (*whole*

genome, wgMLST) (Hingston et al., 2017) ou sur les mutations ponctuelles à l'échelle du génome entier (*Single Variant Phylogenomics* SNVPhyl) (Petkau et al., 2017). Les travaux de Moura et coll, basés sur 1696 isolats, permettent une discrimination de l'espèce selon la méthode cgMLST, c'est-à-dire, selon 1748 *loci* appartenant au génome « conservé » entre les isolats (*core-genome*). Cette méthode est universellement applicable et est à ce jour l'outil de diagnostic le plus puissant de sous-typage de l'espèce. Les souches sont groupées selon deux niveaux, en sous-lignées (*sublineages* SL) et en « cgMLST types » (CT), avec respectivement 150 et 7 SNP de différence parmi les 1748 *loci*. Cette méthode a également l'avantage d'être concordante avec les données MLST précédemment décrites et largement utilisées jusqu'alors, ce qui permet ainsi d'intégrer les isolats dans la nouvelle nomenclature cgMLST, et de faire correspondre les ST/CC avec les CT/SL (Moura et al., 2016). L'ensemble des données MLST collectées sont recueillies et accessibles sur le site http://bigsdb.pasteur.fr/listeria/ où on retrouve à ce jour (novembre 2022) 174 CC et plus de 300 SL. Malgré l'évolution systématique des classifications, les travaux actuels se concentrent majoritairement sur les notions de lignée (définie par la méthode PFGE) et de complexe clonal (défini par la méthode MLST).

1.2 Diversité et distribution spatiotemporelle de l'espèce *Listeria monocytogenes*

L'espèce *Lm* est largement distribuée à l'échelle du globe puisqu'elle a été retrouvée sur tous les continents, excepté l'Antarctique (Chenal-Francisque et al., 2011). Mais un nombre croissant d'études met en évidence la répartition hétérogène de la population de *Lm* en fonction de l'origine des isolats.

La plupart des isolats de *Lm* appartiennent aux lignées I et II, qui abritent les sérotypes les plus fréquemment associés aux cas cliniques humains, notamment les sérotypes 1/2a et 1/2c (lignée II) et les sérotypes 1/2b et 4b (lignée I) (Piffaretti et al., 1989 ; Brosch et al., 1994 ; Ragon et al., 2008, Goulet et al., 2012 ; Haase et al., 2014). Les sérotypes 4b, 1/2b et 1/2a représentent 98% des isolats lors de listériose humaine (Burall et al., 2017) alors que les sérotypes 4a et 4c sont prédominants dans les isolats alimentaires et l'environnement et rarement associés à des cas de listérioses (Doumith et al., 2004 ; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007 ; Velge et al., 2010). Chez les ruminants présentant des listérioses, les principales souches isolées appartiennent aussi aux lignées I et II (Steckler et al., 2018). Plus généralement, les souches isolées des aliments et de l'environnement (agricole et global) appartiennent plus fréquemment à la lignée II (Orsi et al., 2011). Les souches de la lignée I ont en commun un taux de recombinaison plus bas que celles de la lignée II (Orsi et al., 2011), ce qui suggère une capacité

d'adaptation plus forte chez les souches de la lignée II aux conditions hostiles de l'environnement (plus forte présence de plasmides et d'éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance aux stress généralement) (Orsi et al., 2011 ; Maury et al., 2019).

Chaque CC est caractérisé par un sérotype largement majoritaire (**Figure 20**) : CC1, CC4 et CC6 sont principalement constitués de souches de sérotype 4b, CC9 de sérotype 1/2c et CC7 de sérotype 1/2a (Ragon et al., 2008). Les CC les plus prévalents sont géographiquement et temporellement répandus (Moura et al., 2016), mais on observe une prévalence inégale de certains CC entre les isolats alimentaires et les isolats cliniques (Maury et al., 2016 ; Moura et al., 2016).

CC9 et CC121 sont principalement associés aux isolats alimentaires, alors que CC1, CC2, CC4 et CC6 prévalent dans les isolats cliniques en Occident **(Figure 22)** (Maury et al., 2016 ; Moura et al., 2016 ; Lee et al., 2018). De façon intéressante, en Asie, le CC87 est le CC majoritaire dans les aliments et les cas cliniques, ce qui suggère une implication forte des habitudes alimentaires et culturelles dans la répartition de l'espèce (Disson et al., 2021). CC87 a été également impliqué dans des cas de listériose humaine en Espagne (Perez-Trallero et al., 2014 ; Fan et al., 2019 ; Charlier et al., 2020). Il est intéressant de noter que CC87 et CC4 présentent la particularité de porter le locus LIPI-4 (**§D.2.2.4**) (Luo et al., 2019).

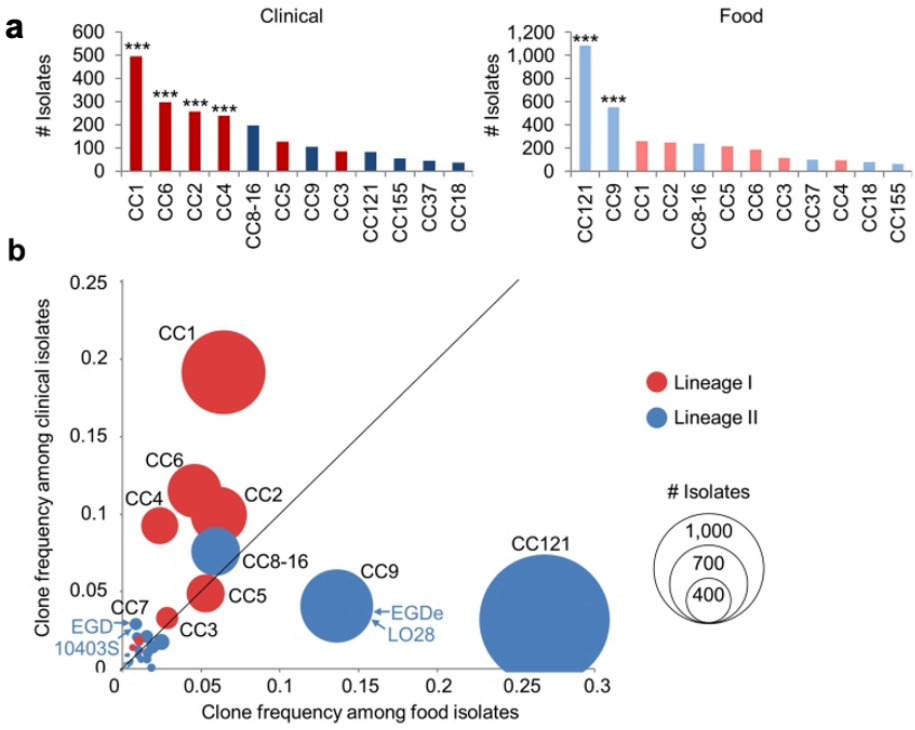


Figure 22 : Distribution et fréquence des complexes clonaux les plus prévalents parmi les isolats alimentaires et cliniques et selon leur lignée (d'après Maury et al., 2016). Les clones de la lignée I sont représentés en rouge et ceux de la lignée II en bleu. Les isolats cliniques sont en foncé et les isolats alimentaires en clair. Le nombre d'isolat associé à chaque CC est représenté par des histogrammes en **(a)** et par des cercles en **(b)**. Pour chaque CC, la taille du cercle dépend du nombre d'isolats. Les souches modèles de laboratoire sont indiquées en **(b)**.

La plupart des études mécanistiques chez *Lm* ont été réalisées à partir des souches de référence EGD-e et LO28 (CC9), et 10403S (CC7), appartenant toutes à la lignée II (présentées dans la **Partie D.1.3 et Figure 21).** Les connaissances moléculaires permettant d'expliquer la capacité des isolats cliniques de la lignée I à infecter l'homme restent limitées. Elles appellent également à la désignation de nouvelles souches de référence, représentatives de celles impliquées dans les infections humaines réelles (Maury et al., 2016).

1.3 Caractéristiques génomiques et souches modèles de l'espèce

Les souches de référence de laboratoire de *Lm* majoritairement utilisées depuis les 30 dernières années sont les souches 10403S, EGD, EGD-e et LO28. Elles appartiennent au sérotype 1/2a, lignée II, mais à des complexes clonaux différents.

La souche EGD, dérivée de la souche isolée de cobayes par E.G.D Murray **(§A.1)** (Murray et al., 1926) provient de l'Institut Trudeau. Elle a été ramenée en France en 1982 et en Allemagne en 1986, et passée dans des souris pour maintenir sa virulence (Becavin et al., 2014). En 2001, le premier génome complet de *Lm* publié par un *consortium* européen dirigé par Pascale Cossart, est celui de la souche *Lm* EGD allemande, rebaptisée EGD-e, qui dérive théoriquement de la souche originale. Le génome circulaire de EGD-e est constitué de 2,944,528 paires de bases (bp) avec un taux de G-C de 39% (Glaser et al., 2001). Néanmoins en 2014, des analyses de génomique comparative entre EGD-e et EGD contredisent le lien de parenté supposé entre les deux souches, avec un polymorphisme nucléotidique important (29 000 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) (Becavin et al., 2014). L'origine exacte de EGD-e n'est donc pas claire (Becavin et al., 2014). La souche 10403S, isolée après un cas de listériose humaine (Edman et al., 1968) appartient au CC7 et a été séquencée en 2008. Il est intéressant de noter que EGD et 10403S sont très proches (317 SNPs) (Becavin et al., 2014). Des études *in vivo* ont mis en évidence que 10403S était moins virulente que EGD-e chez la souris (moins présente dans le sang, la rate et le foie après infection) (Becavin et al., 2014). La souche LO28 appartient au sérotype 1/2c et a été isolée dans les selles d'une femme enceinte saine. C'est une souche

hypo-invasive de référence puisqu'elle porte une mutation au niveau du gène *inlA* qui conduit à une InlA tronquée. La délétion d'une adénine à la position 1637 conduit à la création d'un *premature stop codon* (PMSC) « TAA » à la position 1729, générant une protéine tronquée de 63-kDa qui a perdu son motif C-terminal d'ancrage au peptidoglycane LPXTG. La protéine est donc sécrétée et non fonctionnelle **(Figure 23)** (Jonquières et al., 1998).

En 2015, une analyse de 44 génomes de *Lm* a estimé que 43% des gènes (2360) appartiennent au *core-genome* et 57% (3109) au génome accessoire, c'est à dire aux gènes spécifiques des isolats étudiés (Tan et al., 2015). A ce jour (septembre 2022), 50 337 génomes de *Lm* sont disponibles dans la base de données *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) contre 23 210 en 2019 (Fritsch, 2019).

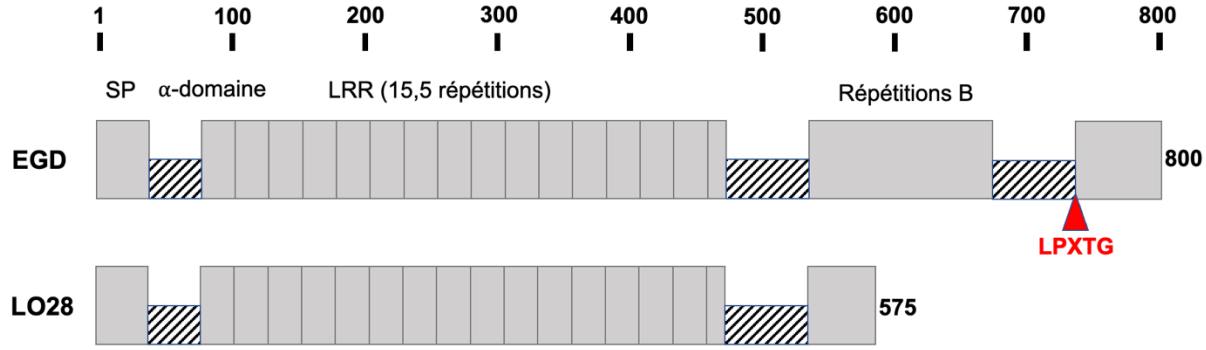


Figure 23 : Comparaison des séquences protéiques de InlA entre EGD et LO28 (adapté de Jonquières et al., 1998). SP : Signal Peptide ; LRR : Leucine-Rich Repeat. LPXTG : Motif d'ancrage au peptidoglycane. L'échelle est en aa. La taille de chaque Internaline A est indiquée à droite du schéma.

2. Diversité de la virulence au sein de l'espèce *Listeria monocytogenes*

Les débuts de la génomique comparative, à l'échelle du génome entier, se basaient sur la comparaison de souches d'espèces pathogènes et non-pathogènes génétiquement proches, dans le but de mettre en évidence les déterminants moléculaires impliqués spécifiquement dans la pathogénicité (Glaser et al., 2001). Les travaux de Glaser et coll. ont notamment permis de comparer le génome de la souche de référence *Lm* EGD-e avec celui de la souche non pathogène *L. innocua* CLIP11626 (Glaser et al., 2001). La majorité des gènes sont conservés entre les deux souches, avec seulement 270 gènes (9,5%) spécifiques à *Lm* et 149 gènes (5%) spécifiques à *L. innocua*. Cette comparaison a contribué à la mise en évidence de nombreux gènes impliqués dans la virulence de *Lm* mais également un polymorphisme des gènes de virulence qui affecte le pouvoir pathogène de *Lm* **(§D.2.1)** **(Figure 24)** (Disson et al., 2021).

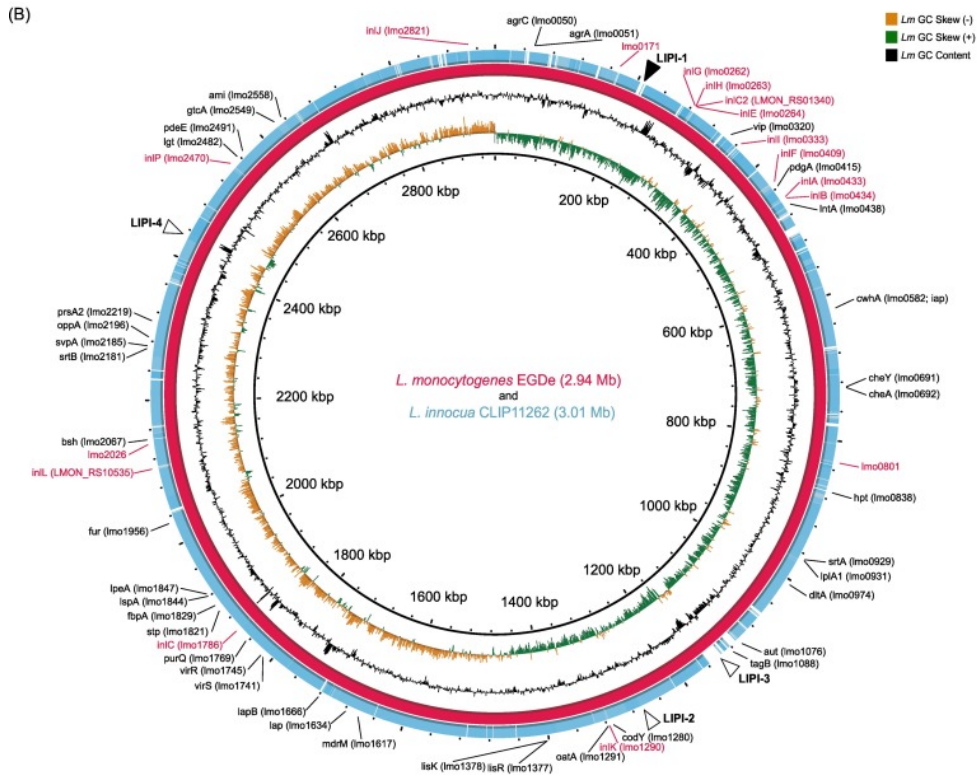


Figure 24 : Cartes génomiques de *L. monocytogenes* EGD-e et *L. innocua* CLIP11262 (d'après Disson et al., 2021). Les cercles intérieurs représentent les variations en GC et le contenu en GC de EGD-e. Les trous dans le chromosome de *L. innocua* (bleu) représentent les régions génomiques absentes du génome par rapport à EGD-e (rouge). Les gènes de virulence connus chez EGD-e sont positionnés avec leur nom commun et le nom du locus (*lmo*). Les gènes de la famille des internalines sont mis en évidence en rouge. Les triangles noirs indiquent la position des ilots de pathogénicité connus chez EGD-e (en noir) ou dans le genre *Listeria* (en triangle ouvert).

De plus, les progrès en génomique ont permis d'exploiter la grande biodiversité intra-spécifique et de mettre en évidence de nouveaux déterminants moléculaires impliqués dans la virulence (Maury et al., 2016 ; Disson et al., 2021). Ces études sont donc primordiales pour mettre en évidence une espèce très hétérogène en terme de pathogénicité, composée de clones hyper-virulents et hypo-virulents et dont le suivi est capital pour la santé humaine, dans un contexte épidémiologique (Anwar et al., 2022).

2.1 *Core-genome* et virulence

Toutes les souches de l'espèce *Lm* hébergent les principaux gènes de virulence (les *loci inlAB* et *LIPI-1)* puisqu'ils font partie du *core-genome* de *Lm.* Plusieurs études ont permis de lier l'hypo-virulence et l'hyper-virulence aux polymorphismes des gènes de virulence, spécifiquement associés à une atténuation ou une augmentation du pouvoir pathogène de *Lm* (Roche et al., 2012 ; Maury et al., 2016).

2.1.1 InlA

Plusieurs souches, notamment LO28, expriment une Internaline A tronquée (**§D.1.3 ; Figure 23)** (Jonquières et al., 1998). Des données épidémiologiques montrent que les souches associées à des cas cliniques et plus particulièrement associées à des cas de listériose materno-fœtale, expriment majoritairement une Internaline A sauvage par rapport aux souches d'origine alimentaire (Jacquet et al., 2004 ; Disson et al., 2008 ; Ragon et al., 2008 ; Orsi et al., 2011). Sur 300 isolats cliniques étudiés, 96% portaient une InlA-sauvage contre seulement 65% pour les isolats d'origine alimentaire (Maury et al., 2016), notamment les CC9 et CC121, associés à de l'hypo-virulence *in vivo* (Maury et al., 2016 ; Moura et al., 2016). InlA tronquée est également moins fréquemment retrouvée dans d'autres souches de la lignée II comme le CC331, CC199 et CC321 (Moura et al., 2016).

Plusieurs types de mutations dans InlA ont été caractérisées. La base de données BIGSdb-*Lm* de l'Institut Pasteur (https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/) référence à ce jour 32 allèles de *inlA* qui portent un codon stop prématuré (PMSC) (accès 29 novembre 2022). Ces données suggèrent également que 90% des souches CC9 et 100% des CC121 portent une mutation dans *inlA* qui conduit à un PMSC (Moura et al., 2016). La **Figure 25** représente les différents types de mutations connues retrouvées dans *inlA* qui conduisent à la production d'une protéine tronquée. La présence de InlA tronquée (InlA-Δ) conduit à la perte du motif LPXTG et donc de l'ancrage au peptidoglycane de *Lm*. L'absence d'InlA à la surface bactérienne empêche l'interaction et l'activation de son récepteur E-cad (Lecuit et al., 1999) et conduit à une internalisation réduite dans les cellules non phagocytaires (i.e. les cellules épithéliales) (Maury et al., 2016). Ces données suggèrent également un rôle crucial de l'InlA au cours de la listériose humaine et la possibilité d'utiliser InlA-sauvage comme marqueur de virulence pour les cas cliniques humains (Jacquet et al., 2004 ; Lecuit et al., 2005) et InlA-Δ comme marqueur potentiel de l'hypo-virulence, pouvant expliquer des défauts de translocation au niveau de la barrière intestinale et/ou placentaire (Disson et al., 2008 ; Disson et al., 2021). Des souches InlA-

tronquées peuvent malgré tout être rarement responsables de formes de listérioses invasives que les auteurs expliquent en partie par une charge bactérienne ingérée importante (Fravalo et al., 2017). Il est intriguant de constater que InlA, un déterminant bactérien majeur pour la colonisation de l'hôte, puisse être perdu. Ce schéma pourrait s'expliquer soit par un relâchement de la contrainte sélective visant à maintenir la fonction d'InlA, soit par un avantage sélectif fourni par la perte d'InlA dans la niche écologique occupée par ces isolats, c'est à dire une rencontre de l'hôte à trop faible fréquence (Roche et al., 2012). Il est tentant de penser que la perte d'InlA dans des souches "contre-sélectionnées" (InlA-Δ) puisse conduire à la perte d'autres gènes de virulence importants pour l'infection de l'hôte, notamment des gènes de la dissémination intracellulaire et de cellule à cellule, ou des gènes de persistance intracellulaire (biogénèse des LisCV).

A

AA position du stop codon	Isolats ou type de mutations	Nt position of mutation	Origine/SL	Lignée	Références
5	24	13 (C/T)	SL9	II	Moura et al., 2016
9	4	12 (1nt del. (frameshift)	SL9 ; SL199	II	Felicio et al., 2007
26	25	12 (1nt ins. (frameshift))	SL193 ; SL196	II	Moura et al., 2016
77	15	229 (C/T)	SL13	II	Van Stelten et al., 2010
93	26	277 (G/T)	SL7	II	Moura et al., 2016
96	20	288 (C/A)	SL13	I	Moura et al., 2016
170	16	508 (G/T)	1/2a	II	Van Stelten et al., 2010
189	5	565 (C/T)	SL31	II	Van Stelten et al., 2008
195	27	576 (1nt ins. (frameshift))	SL9	II	Moura et al., 2016
246	28	736-738 (CCA/TAG)	SL101	II	Moura et al., 2016
253	17	758 (T/A)	1/2b	I	Van Stelten et al., 2010
269	21	806 (T/A)	SL489	I	Moura et al., 2016
277	?	821 (1 nt del. (frameshift))	SL3	I	Toledo et al., 2018
326	19	976 (G/T)	SL9	II	Gelbicova et al., 2015
347	32	1041 (C/A)	SL3	I	Moura et al., 2016
404	18	1165 (1 nt. del (frameshift))	4b	I	Van Stelten et al., 2010
460	8	1380 (G/A)	SL9	II	Rousseaux et al., 2004
492	6	1474 (C/T)	SL121	II	Ragon et al., 2008
519	9	1540 (1 nt del (frameshift))	SL9	II	Rousseaux et al., 2004
527	13	1579 (A/T)	Seefood	II	Van Stelten et al., 2010
539	14	1615 (C/T)	SL9	II	Ragon et al., 2008
562	7	1684 (C/T)	?	II	Van Stelten et al., 2008
577	12	1637 (1 nt del (frameshift))	SL9 (LO28)	II	Ragon et al., 2008
577	29	1635 (1nt del. (frameshift))	SL9	II	Moura et al., 2016
581	30	1741 (C/T)	SL7	II	Moura et al., 2016
586	22	1756 (C/T)	SL2	I	Moura et al., 2016
606	1	1818 (T/A)	SL5	I	Nightingale et al., 2005
647	23	1939 (A/T)	SL3	I	Moura et al., 2016
656	2	1966 (T/A)	SL5 ; SL224	I	Nightingale et al., 2005
677	10	1961 (1 nt ins.)	Food	?	Rousseaux et al., 2004
685	11	2054 (G/A)	SL9	II	Rousseaux et al., 2004
700	3	2100 (C/G)	SL9 ; SL321	II	Nightingale et al., 2005
754	31	2208 (1nt del. (frameshift))	SL5	I	Kurpas et al., 2020
760	?	?	?	II	Hingston et al., 2017

B

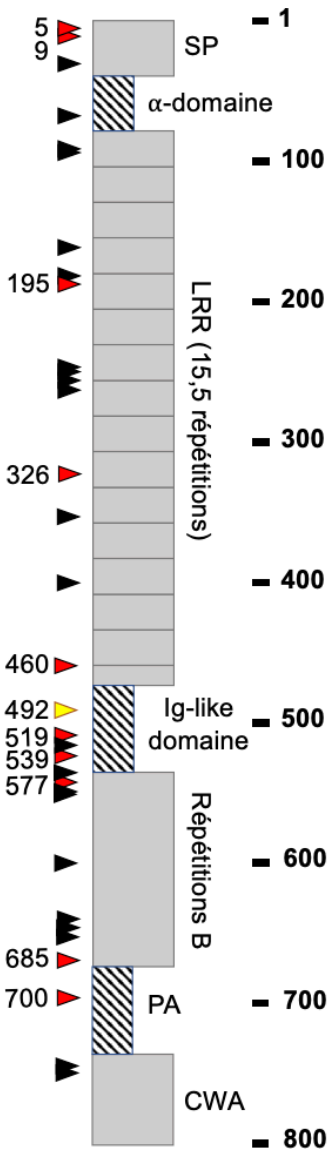


Figure 25 : Polymorphisme de *inlA* et mutations dans la protéine associée. A. Tableau récapitulatif des mutations conduisant à la formation de PMSC avec leur position sur la protéine et selon l'origine des isolats. **B.** Représentation schématique de la protéine InlA avec ses différents domaines fonctionnels : domaine associé au peptide signal (SP), répétitions riches en leucine (LRR), domaine de pré-ancrage (PA) et domaine d'ancrage au peptidoglycane/paroi cellulaire (CWA). Les triangles indiquent la position des PMSC retrouvés chez les isolats appartenant au CC9 (rouge), au CC121 (jaune) et autres clones (noir). L'échelle à droite du schéma est en aa.

2.1.2 InlB

Des analyses génomiques de la souche F2365, appartenant au CC1 et isolée après une épidémie en Californie en 1985 (liée à la consommation de fromage), ont révélé la présence d'un PMSC dans le gène *inlB* (Nelson et al., 2004). Cette mutation semble sporadique car elle n'a pas été retrouvée parmi les autres CC1, et ne semble pas affecter la virulence de la souche puisqu'elle est impliquée dans l'une des épidémies les plus mortelles du XXème siècle (Nightingale et al., 2007 ; Quereda et al., 2019).

2.1.3 PrfA

Certaines autres mutations (G145S ou PrfA*) rendent *Lm* hyper-hémolytique et provoquent l'activation constitutive des gènes contrôlés par PrfA (Ripio et al., 1997 ; Vega et al., 2004 ; Wong & Freitag, 2004 ; Vasanthakrishnan et al., 2015), décrite en **B.2.2.5**. La mutation PrfA* induit un changement conformationnel de la protéine, qui la rend plus active (Bécavin et al., 2014 ; Vega et al., 2004 ; Eiting et al., 2005). Cette mutation est d'ailleurs présente dans la protéine PrfA de la souche EGD, en plus d'une autre mutation (C229Y). Néanmoins, si EGD est plus invasive dans le modèle hépatocytaire (Bécavin et al., 2014), elle n'est pas plus virulente chez la souris pour autant, ce qui suggère que la mutation PrfA* ne confère pas un avantage particulier durant l'infection. Cette mutation est par ailleurs retrouvée chez une autre souche non pathogène M7 isolée dans du lait de vache et appartenant au sérotype 4a. L'impact de la seconde modification, située dans l'hélice αG, n'est pas connu (Bécavin et al., 2014).

Sur la base de tests d'infection cellulaire, des souches présentant des mutations dans PrfA et ayant présenté des faibles virulences ont été mises en évidence. Ces isolats présentent soit la substitution d'un seul acide aminé (PrfAK220T) soit une protéine tronquée (PrfAΔ174-237) (Roche et al., 2005 ; Velge et al., 2007 ; Temoin et al., 2008). Une autre souche (JF5171 ; lignée II, sérotype 1/2a, 3a), isolée dans un placenta bovin après avortement présente une délétion dans la région codante de *prfA* conduisant à une interruption dans la partie C-terminale de la protéine

(WEN* vs GWKLN* dans EGD-e) et une substitution K197N. Cette souche présentait une invasion et une réplication réduite ainsi qu'une dissémination altérée dans des cellules issues de cerveau bovin et un modèle de macrophages bovins (BoMac), en accord avec une baisse de l'expression des gènes PrfA-dépendants (Guldiman et al., 2015 ; Rupp et al., 2015).

Les travaux récents de Maury et al., basés sur l'activité hémolytique de plus de 50.000 souches de *Lm* de différentes origines, ont mis en évidence plusieurs mutations dans PrfA dans des souches non-hémolytiques de lignée I et II (Maury et al., 2017). Toutes les souches non hémolytiques de CC59 et CC31 présentaient une interruption de la protéine aux positions 59 et 185. De plus, plusieurs substitutions ont été décrites dans la région du brin ß d'une souche CC9 (G72D), dans le domaine helix-turn-helix (HTH) qui se lie à l'ADN d'une souche CC6 (G175C) et deux autres dans la partie C-terminale (K220T, précédemment décrite et L221F dans une souche CC1) (Velge et al., 2007 ; Maury et al., 2017). L'ensemble de ces mutations semblent affecter la liaison de PrfA avec ses promoteurs (Herler et al., 2001 ; Vega et al., 2004 ; Maury et al., 2017).
Une substitution A129P, située entre les régions du brin ß et la charnière αD, est apparue dans une souche CC224. Enfin, plusieurs souches CC155 ont montré une réversion du codon stop de *prfA* due à l'insertion de 5 nucléotides en position 712 dans la séquence du gène, conduisant à une protéine PrfA plus longue (293 aa contre 238 pour EGD-e) (Maury et al., 2017). De manière intéressante, plusieurs souches non hémolytiques avec un phénotype semblable à une souche délétée Δ*prfA* présentaient une séquence PrfA sauvage, dont une qui avait perdu le gène *gshF* (**§B.2.4.7**), ce qui pourrait expliquer l'absence d'activité PrfA dans cette souche.
Dans certaines souches de lignée III, d'autres substitutions d'aa dans PrfA ont été signalées, notamment dans la protéine PrfA des isolats non pathogènes HCC23 et L99 qui révèlent les mutations T165A et K197N ainsi que dans l'isolat SLCC2376 avec les substitutions K156E, T165A et K197N (Chatterjee et al., 2006 ; Bécavin et al., 2014).

2.1.4 LLO

Environ 0,1% des souches *Lm* des lignées I et II sont non-hémolytiques. Les travaux de Maury et coll., montrent que la majorité (93.3%) présente au moins une mutation dans *prfA* et que le reste présente une mutation dans *hly* conduisant à l'inactivation de LLO (G299V ; C484*). Dans les deux cas, ces clones sont moins virulents (Maury et al., 2017). D'autres mutations ont été caractérisées et associées à une activité hémolytique altérée ainsi qu'une réplication

intracellulaire diminuée, notamment une souche avec une unique substitution dans LLO (Q253K) incapable de former des foyers de dissémination dans un modèle fibroblastique (Roberts &Wiedmann, 2005) et une autre souche appartenant au sérotype 1/2a qui porte une mutation dans le gène *hly* à la position G1472A, qui conduit à une LLO tronquée (Δ491-529) (Kanki et al., 2018).

2.1.5 ActA

Les deux allèles majoritairement retrouvés de *actA* sont l'allèle sauvage (présenté en **§A.2.4.2**) et un allèle qui se distingue par la perte de 105 nucléotides dans la région d'*actA* codant pour la région riche en prolines (PRR) de ActA. Cette forme tronquée apparaît dans 77% des souches de sérotype 1/2b et 51% des souches de sérotype 4b (dont CLIP80459), une souche responsable d'épidémie de listériose humaine (Hain et al., 2012). S'il était d'abord établi que la forme tronquée d'ActA impactait la dissémination intercellulaire de *Lm* (Wiedmann et al., 1997), des travaux plus récents n'ont pas observé de différences dans la capacité d'invasion, de multiplication intracellulaire ou de dissémination entre les souches portant les deux différentes formes d'*actA* dans plusieurs modèles cellulaires (Roberts & Wiedmann, 2005 ; Conter et al., 2010).

On note également un effet souche avec des différences de production de ActA chez des souches de différentes lignées en culture en milieu sélectif et non-sélectif, à l'échelle transcriptionnelle et protéique (Lathrop et al., 2008).

D'autres formes d'interruptions existent notamment dans le domaine C-terminal de ActA dont certaines en lien avec une dissémination altérée *in vitro* (par exemple, trois souches présentant 3 PRRs et un résidu acide glutamique à la position 117 (Sokolovic et al., 1996 ; Wiedmann et al., 1997 ; Conter et al., 2010 ; Hain et al., 2012).

2.1.6 Exemples de mutations dans d'autres gènes, associées à la virulence

Des mutations dans le gène *iap (invasion-associated protein)* (**§B.2.3**), codant pour P60 conduisent à des défauts de division de *Lm* (filamentation). Ces variants ont une virulence atténuée d'après les travaux de Pilgrim et coll. (2003). Une étude basée sur des souches exclusivement CC9 a mis en évidence une perte de gènes associés à la virulence tels que *ami*, *inlJ* (internalisation), *lisR* (régulation de la transcription et de la translation) et *murA* (modification du peptidoglycane) chez la majorité des souches étudiées, en plus d'une Internaline A tronquée (Song et al., 2022).

2.2 Génome accessoire et virulence

2.2.1 LIPI-2

LIPI-2 est un locus spécifique de *L .ivanovii* (Vazquez-Boland et al., 2001 ; Dominguez-Bernal et al., 2006). Il code pour plusieurs internalines et une enzyme hémolytique, la sphingomyélinase, impliquée dans la perturbation du phagosome (Dominguez-Bernal et al., 2006). Des isolats responsables d'épidémies de listériose ovine en Chine, appartenant à la lignée II et au sérotype 4h, ont été caractérisés comme hyper-virulents (Yin et al., 2019) et contiennent un locus LIPI-2 hybride (seulement les gènes de la sphingomyélinase *smcL* et les gènes des internalines *i-inlF* et *i-inlE*). Le rôle spécifique du LIPI-2 partiel dans l'hyper-virulence de ces souches hybrides reste à élucider (Disson et al., 2021)

2.2.2 Les internalines

Les gènes codant pour certains membres de la famille des internalines ont une distribution spécifique selon les souches de *Lm* (Wurtzel et al., 2012). L'impact de ces variations n'a pas été rigoureusement déterminé (Bierne et al., 2007). Parmi elles, on sait aujourd'hui que InlF et InlP jouent un rôle dans la pathogénicité de *Lm*, respectivement dans le tropisme infectieux pour le cerveau et le placenta (Ghosh et al., 2018). Les gènes codant pour les internalines peuvent également être portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, comme c'est le cas pour une souche décrite par les travaux de Den Bakker et coll., 2012.

2.2.3 Listeria *Pathogenicity Island-3* (LIPI-3)

LIPI-3 est absent des souches de référence précédemment présentées mais est présent chez quelques souches de la lignée I (sérotypes 1/2b et 4b) (Cotter et al., 2008). Le locus se compose de 8 gènes disposés dans l'ordre suivant : *llsAGHXBYDP*. *llsA* code pour la listériolysine S (LLS), LlsB, Y et D sont des enzymes proposées pour effectuer les modifications post-traductionnelles, LlsGH est un ABC transporteur, LlsP est une protéase et LlsX est de fonction inconnue. Des travaux ont mis en évidence l'existence d'une souche *Listeria innocua*, généralement non-pathogène, qui possède le locus LIPI-3 et qui a été impliquée dans un cas de méningite chez l'homme (Clayton et al., 2014 ; Moura et al., 2019). Les gènes du locus LIPI-3 sont spécifiquement sur-exprimés dans le microbiote intestinal (Cotter et al., 2008). LLS fait partie des microcines modifiées au niveau post-traductionnel par des thiazoles/oxazoles (TOMM), qui incluent notamment la Streptolysine S (SLS) de *Streptococcus pyogenes,* qui présente une activité cytotoxique contre les macrophages. Il est établi qu'elle joue un rôle dans

la survie de *Lm* dans les cellules immunitaires PMN (*polymorphonuclear neutrophils*) et contribue à sa virulence dans le modèle murin (Cotter et al., 2008).

Dans un modèle de microbiote murin reconstitué, elle favorise la croissance de *Lm* spécifiquement dans l'intestin en tant que bactériocine qui cible et tue d'autres espèces de bactéries, notamment les populations d'*Alloprevotella* spp., *Allobaculum* spp. et *Streptococcus* spp. Cet avantage est également favorable à la virulence et à la persistance de *Lm* dans l'intestin, qui prend le dessus sur les autres populations bactériennes lors de sa colonisation intestinale (Querada et al., 2016 ; Radoshevich & Cossart, 2018). Des études récentes ont établi la présence de LIPI-3 dans des souches isolées de cas de listériose humaine appartenant aux CC224 et CC619, ce qui suggère un rôle potentiel dans la virulence également pour ces CC plus rares (Schiavano et al., 2022). LIPI-3 est également présent dans une souche CC217 (Gorski et al., 2022).

2.2.4 Listeria *Pathogenicity Island-4* (LIPI-4)

Un groupe de six gènes, annotés comme codant pour un système putatif de transport de sucre de la famille des PTS, a été mis en évidence parmi une analyse de 6600 souches de *Lm* et nommé LIPI-4 (Maury et al., 2016). LIPI-4, constitué des gènes *licC* (EIIC), *licB* (EIIB), *licA* (EIIA), *lm 900558-70012, lm 900558-70013* et *glvA* (maltose-60-phosphata-glucosidase), est spécifiquement présent dans certaines souches du CC4, un CC significativement associé à la listériose materno-fœtale humaine (**Figure 26**). La délétion de LIPI-4 entraîne une diminution de l'infection du placenta et du fœtus, ainsi que du cerveau, mais pas des organes maternels chez les souris KIE16P gestantes. Le mécanisme associé est encore inconnu (Maury et al., 2016 ; Charlier et al., 2020). De manière intéressante, LIPI-4 est aussi présent dans les souches CC87, prévalentes parmi les isolats cliniques et alimentaires en Asie (Disson et al., 2021).

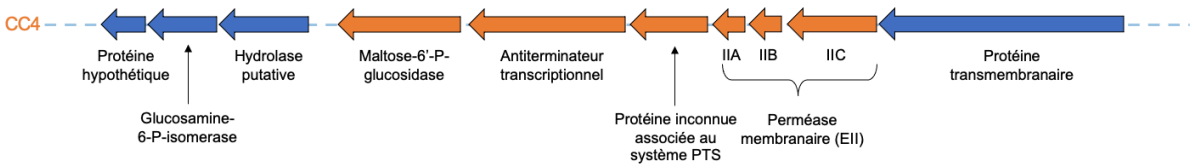


Figure 26 : Contenu génétique du cluster PTS du LIPI-4 (adapté de Maury et al., 2016). Les gènes représentés en bleu sont également présents chez d'autres CC tels que CC1, par exemple. Les gènes représentés en orange sont spécifiques du CC4 et constituent le LIPI-4.

2.2.5 Lmo2776

Lmo2776 fait partie de la famille des bactériocines et est présente chez les souches de lignée I et certaines souches de lignée II (Rolhion et al., 2019). Elle cible le genre *Prevotella in vitro*, dans un modèle de microbiote humain reconstitué, et dans le microbiote intestinal murin. Les mutants déficients pour le gène lmo2776 disséminent plus efficacement vers le foie et la rate, ce qui suggère que *Prevotella* améliore l'infection médiée par *Lm* dans l'intestin. Ainsi, la réduction sélective de l'abondance de *Prevotella* par *Lm* pourrait empêcher une inflammation excessive, et favoriser le développement d'infections persistantes par *Lm* dans l'intestin (Rolhion et al., 2019 ; Querada et al., 2021).

2.3 Les sucres associés aux acides téichoïques de la paroi bactérienne

Chez *Lm*, la composition en acide téichoïque (*cell wall teichoic acid* WTA) de la paroi cellulaire est variable selon les sérotypes. Dans le sérogroupe 1/2, le phospho-ribitol phosphate est glycosylé avec du rhamnose et de la N-acétylglucosamine alors que parmi les WTA des sérotypes 4b, 4d et 4e, la N-acétylglucosamine fait partie de l'épine dorsale et est décorée par des fragments de glucose et de galactose (Fiedler et al., 1984 ; Fiedler 1988). L'inactivation du gène *gtcA* du sérotype 4b fait perdre la décoration de galactose aux WTA et la reconnaissance par les anticorps monoclonaux spécifiques du sérogroupe 4b (Promadej et al., 1999). De plus, l'inactivation de *gtcA* réduit la virulence dans un modèle gastro-intestinal murin (Faith et al., 2009). Lorsque la rhamnosylation des WTA est altérée chez la souche EGD-e, par l'inactivation des gènes associés à la biosynthèse du rhamnose (*rmlABCD*) et à la glycosylation (*rmlT*), on observe aussi une atténuation de la virulence dans le modèle murin (baisse de la charge bactérienne dans le foie et la rate après gavage ou inoculation intraveineuse) et une sensibilité accrue aux peptides antimicrobiens (AMP) (Carvalho et al., 2015).

2.4 Cas des clones hyper-virulents

La comparaison du potentiel virulent *in vivo*, dans un modèle murin humanisé de listériose, des souches les plus épidémiologiquement associées aux cas cliniques CC1, CC4 et CC6, montre qu'elles sont hyper-virulentes par rapport à des souches modèles de laboratoire. En effet, elles provoquent une diminution du poids corporel de l'animal ainsi qu'une plus forte charge bactérienne dans le cerveau. Des données supplémentaires montrent qu'il n'y a pas de lien entre les comorbidités immunosuppressives chez les patients et l'infection aux *Lm* CC1, CC4 et CC6, ce qui suggère la présence d'un mécanisme hyper-virulent et la présence d'un potentiel

infectieux supérieur spécifique à ces souches (Maury et al., 2016). Parmi les cas de listériose materno-fœtales, on retrouve une surreprésentation des CC1, CC2, CC4 et CC6 en France, avec plus de 2/3 des cas dus à l'un de ces CC. Cette hyper-représentation parmi les cas cliniques est particulièrement vraie pour CC4 et CC1 (Gözel et al., 2019). CC4 est le plus associé aux infections materno-fœtales (Maury et al., 2016) et présente un tropisme plus important pour le placenta lors d'inoculation intraveineuse, par rapport aux souches de référence EGD-e et 10403S (Maury et al., 2016). CC1 est le complexe clonal majoritaire parmi les cas cliniques humains dans plusieurs pays et représente 20% des isolats cliniques déposé au *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Moura et al., 2021). Il est également majoritaire parmi 520 isolats d'origine alimentaire et des cas cliniques humains, prélevés en Australie entre 1995 et 2015 (Kwong et al., 2016). C'est aussi le CC le plus fréquemment associé aux cas de rhombencéphalite chez les ruminants, largement retrouvé dans les produits laitiers et dans les fèces des ruminants en bonne santé (Esteban et al., 2009 ; Maury et al., 2016 ; Maury et al., 2019). Parmi les CC1, certaines souches testées ont un tropisme pour le SNC et se montrent hyper-invasives *in vitro*, par rapport à la souche EGD-e (Dreyer et al., 2016 ; Rupp et al., 2017). Les mécanismes associés à ces hyper-virulences sont peu compris. Cependant, certains gènes spécifiquement portés par ces clones ont été mis en évidence, notamment le LIPI-4 chez certaines souches CC4 et le LIPI-3 pour certaines CC1. Ces *loci* sont présentés respectivement en **Parties 2.2.3.** et **2.2.4**. CC1 comporte ainsi le gène *lls*, et des allèles particuliers de *inlF* et *inlJ1* (Rupp et al., 2017) connus pour être retrouvés dans des isolats associés aux rhombencéphalites chez les ruminants (Balandyté et al., 2011). Néanmoins, le mécanisme associé reste à ce jour incompris. Le potentiel rôle de 4 gènes codant pour des protéines de type internaline a été recherché mais n'a pas montré de différences d'invasion, de dissémination ou de survie intracellulaire (Gözel et al., 2018).

2.5 Cas des clones hypo-virulents

Par contraste avec CC1, CC4 et CC6, l'infection par des isolats CC9 et CC121 provoque moins de perte de poids, voire un gain chez les souris infectées. De plus, les auteurs n'observent pas de différence significative de charge bactérienne par rapport à EGD-e et 10403S. CC9 et CC121 ne sont presque jamais associés à des infections à tropisme placentaire ou cérébral (Maury et al., 2016 ; Charlier et al., 2017). Des données supplémentaires indiquent que les infections par ces CC sont associées à des patients qui présentent des comorbidités (Maury et al., 2016), contrairement aux infections par les CC dits "hyper-virulents".

3. Diversité génétique de *Listeria monocytogenes* et persistance dans les ateliers agro-alimentaires

La capacité à adhérer et à former des biofilms sont les facteurs clés de la persistance de *Lm* dans les environnements industriels. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence des différences de propriétés d'adhésion aux surfaces en fonction du sérotype ou de la lignée. Certains travaux suggèrent fortement que les clones CC9 et CC121 persistent plus efficacement dans les environnements agro-alimentaires (Querada et al., 2021). Ces travaux s'appuient sur la présence de gènes impliqués dans la tolérance au chlorure de benzalkonium (CB, désinfectant communément utilisé dans les environnements de production agro-alimentaire) et sur la capacité de CC9 et CC121 à former efficacement des biofilms en présence de ce désinfectant (Ortiz et al., 2016 ; Maury et al., 2019 ; Guidi et al., 2021). Il a d'ailleurs été confirmé que plusieurs gènes de tolérance au CB, transmis par des plasmides, contribuent à l'adaptation de *Lm* dans les environnements agro-alimentaires pour des concentrations sublétales en CB (4 mg/L). Parmi eux, on retrouve notamment *qacA*, *qacC*, *qacH* et la cassette *brcABC* (Moura et al., 2016 ; Maury et al., 2019 ; Chen et al., 2022). De plus, certaines études indiquent que les CC9 et CC121 ont une adhésion accrue, forment plus de biofilms et ont une plus forte tolérance à la dessiccation (Franciosa et al., 2009 ; Piercey et al., 2016 ; Hingston et al., 2017 ; Fagerlund et al., 2022 ; Mahoney et al., 2022).

De manière intéressante, d'autres gènes associés à la résistance aux stress, comme ceux appartenant aux *survival stress islets* SSI-1 et SSI-2 sont retrouvés de manière hétérogène parmi *Lm*. Ces îlots font partie d'une région hyper-variable entre les souches de l'espèce, dans la région des gènes du *core-genome lmo0443* et *lmo0449*.

SSI-1 est une région de 8.7-kpb contenant les gènes ***lmo0444***, *lmo0445*, *pva*, *gadD1* et *gadT1*. Il n'est présent que dans un sous-ensemble limité de souches appartenant aux sérotypes 1/2c, 3b et 3c (Hain et al., 2011 ; Ryan et al., 2010) et est impliqué dans la réponse aux stress salins, acides et de l'environnement gastrique (Begley et al., 2005 ; Cotter et al., 2005 ; Begley et al., 2010).

SSI-2 est constitué de deux gènes homologues à *L. innocua*, *lin0464* qui code pour un facteur de transcription et *lin0465* qui code pour la protéase PfpI. SSI-2 est présent majoritairement chez les souches CC121, très conservé et impliqué dans la survie des bactéries soumises à des stress alcalins et oxydatifs (Harter et al., 2017 ; Rychli et al., 2017). Ces îlots sont aussi présents chez des ST plus rares tels que ST1033 ou d'autres souches isolées de la lignée I et III, donc

non-exclusifs aux CC121 (Harter et al., 2017). Ces données suggèrent l'implication de ces îlots dans la résistance sur les chaines de production et par conséquent leur possible contribution dans la persistance de ces souches dans ces environnements ainsi qu'à la large propagation de CC121 dans les environnements de production alimentaire dans plusieurs pays d'Europe (Harter et al., 2017 ; Maury et al., 2019).
Une souche ST5 été identifiée dans une usine d'aliments prêt à consommer de Shanghai et retrouvée régulièrement lors des prélèvements entre 2019 et 2020. La persistance de cette souche a été associée avec la présence des gènes *clpL*, *mdrL*, *lde*, de SSI-1 et une formation efficace de biofilm. Cette souche pouvait survivre à des concentrations sublétales de désinfectants à base de chlore, contrairement à d'autres souches retrouvées du ST120 et ST2 (Liu et al., 2022).

Les souches de la lignée I sont majoritairement plus tolérantes aux pH acides, ce qui peut constituer un avantage pour la survie dans le milieu intestinal et la persistance chez l'hôte (Hingston et al., 2017 ; Disson et al., 2021). Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Maury et coll., qui précisent que ces souches colonisent l'intestin plus efficacement que les autres (Maury et al., 2019) et par ceux de Esteban et coll., qui mettent en évidence la prévalence de ces souches dans les fèces des ruminants (Esteban et al., 2009).

Si la persistance dans les usines de transformation des aliments, loin des hôtes vertébrés, est plus associée à isolats "hypo-virulents", la persistance dans l'intestin liée au portage fécal asymptomatique est plus associée aux isolats "hyper-virulents". Cette découverte suggère que l'établissement du portage fécal, potentiellement par une invasion tissulaire cliniquement silencieuse et un réensemencement de la lumière intestinale *via* la vésicule biliaire, est une fonction de gènes de virulence parmi l'espèce *Lm* (Maury et al., 2019 ; Hafner et al., 2021). Si l'on s'intéresse à l'évolution de l'espèce *Lm*, on peut spéculer, en s'appuyant sur divers travaux, que des souches parmi l'espèce, plus associées aux usines de transformation, ont perdu ou sont en train de perdre des facteurs importants pour la virulence, contrairement à des souches qui rencontrent encore des hôtes dans leur niche écologique (Hafner et al., 2021), d'où l'importance de considérer la contribution de la niche écologique étudiée (Maury et al., 2016 ; Maury et al., 2017 ; Maury et al., 2019 ; Hafner et al., 2021).

OBJECTIFS DE LA THESE

Listeria monocytogenes est l'un des pathogènes intracellulaires le mieux caractérisé dans la littérature scientifique et responsable d'une maladie grave, la listériose. Omniprésente dans l'environnement, *Lm* est particulièrement robuste et s'adapte à une grande variété d'habitats, y compris nos propres cellules. Elle dispose d'un arsenal de facteurs de virulence essentiels pour traverser diverses barrières, dont la barrière intestinale et se disséminer dans l'organisme (Radoshevich & Cossart, 2018). En tant que contaminant majeur des aliments, *Lm* constitue un grave problème pour les industries agro-alimentaires.

Plusieurs travaux récents ont mis en évidence l'importance du portage asymptomatique de *Lm*, dans les fèces des animaux et des hommes (jusqu'à 10% d'individus porteurs asymptomatiques selon les travaux de Hafner, 2021), ce qui participe à sa propagation dans l'environnement. Malgré cette exposition et l'existence de facteurs de virulence parfaitement adaptés à l'hôte, la listériose reste relativement rare et la période d'incubation de la maladie peut parfois être longue, en particulier dans les cas associés à une grossesse, où elle peut atteindre trois mois (Goulet et al., 2013). Même si le système immunitaire est majoritairement compétent contre *Listeria,* ces données suggèrent l'existence d'une niche d'hébergement chez l'hôte de manière asymptomatique. D'autres observations relativement anciennes appuient d'ailleurs cette hypothèse, rapportant chez le lapin, des avortements spontanés chez la femelle gestante après inoculation par *Lm* mais également lors d'une seconde grossesse sans nouvelle inoculation (Gray et al., 1955). Plus récemment, l'existence de *Lm* VBNC a été évoquée dans un modèle de listériose fœto-placentaire chez le macaque (Wolfe et al. 2019).

Enfin, les travaux de l'équipe Epimic, en 2017, ont montré qu'après une infection prolongée (3 jours), *Lm* peut passer d'un mode de vie actif et réplicatif à un mode de vie ralenti au sein de vacuoles de persistance dans des trophoblastes et des hépatocytes humains. Dans ces vacuoles appelées LisCV, la majorité des *Lm* restent intactes pendant plusieurs jours, échappant à l'autophagie cellulaire. Dans certaines conditions, les bactéries pourraient atteindre un état dit VBNC dans les cellules, et devenir indétectable par les méthodes classiques de microbiologie conventionnelle, basées sur la culture. Dans certaines populations cellulaires, *Lm* s'échappe des LisCV et retourne à une phase active de prolifération et de dissémination (Kortebi et al., 2017). L'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'un portage asymptomatique de *Lm* dans les tissus, en particulier dans l'appareil reproducteur, auquel les LisCV pourraient contribuer. Les mécanismes associés à la formation des LisCV ne sont pas encore connus et il n'existe pas d'outils ou de marqueurs spécifiques permettant de les identifier.

Mon laboratoire d'accueil s'intéresse à la fois aux moyens déployés par la bactérie et la réponse de la cellule hôte, lors de l'infection par *Lm,* en particulier lors d'infections prolongées, qui ont permis de mettre en évidence des changements épigénétiques dans la cellule hôte induits par *Lm*. Le phénotype de formation des LisCV était caractérisé pour les souches de *Lm* EGD-e et 10403S. Or, il existe une grande variabilité génétique au sein de l'espèce *monocytogenes*. Si toutes les souches de *Lm* sont potentiellement pathogènes, les données épidémiologiques et expérimentales indiquent que la virulence est hétérogène. En effet, sur les 13 sérotypes qui composent l'espèce, seuls 4 sont significativement associés à la listériose symptomatique chez l'homme. Certains complexes clonaux (CC) sont surreprésentés dans les isolats cliniques et vétérinaires, d'autres sont majoritaires dans les souches isolées de l'environnement ou des aliments.

L'objectif majeur de mon travail de thèse était de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance intracellulaire de *Lm* principalement à travers deux axes : (i) **L'étude du phénotype de persistance dans les LisCV dans le modèle trophoblastique JEG-3 en exploitant la diversité génétique de *Lm*** et (ii) **L'étude du switch phénotypique entre la phase réplicative de *Lm* et la phase de formation des vacuoles de persistance, par analyses transcriptomiques.** Dans le premier volet de cette étude, nous avons cherché à déterminer si le phénotype de persistance était intrinsèque à l'espèce *Lm* et à caractériser les acteurs moléculaires impliqués dans le phénotype d'hypo- ou hyper-persistance des différentes souches. Le second volet de notre étude avait pour objectif d'identifier sans aucun à priori des marqueurs cellulaires et bactériens spécifiques de la vie dans les LisCV.

RESULTATS

Partie I

Identification de déterminants bactériens impliqués dans la phase intracellulaire de persistance de *Listeria monocytogenes*

Avant mon arrivée, l'équipe Epimic avait montré avec deux souches de laboratoire que *L. monocytogenes* entre dans une phase de persistance au sein de vacuoles nommées LisCVs (Kortebi et al., 2017). Cette partie visait à déterminer la variabilité de ce nouveau phénotype intracellulaire, selon la diversité génétique et écologique des souches (Maury et al., 2016). J'ai utilisé un modèle d'infection à long terme de cellules placentaires humaines JEG-3 disponible au laboratoire afin de caractériser un panel de souches de *Lm* pour leur capacité à (i) entrer dans les cellules ; (ii) disséminer de cellule en cellule et (iii) persister dans les LisCVs.

Le premier criblage nous a permis de tester 71 souches représentatives des 2 lignées majeures de l'espèce *monocytogenes* et couvrant 22 complexes clonaux (CCs). Aux temps précoces de l'infection, seuls les isolats produisant une InlA tronquée avaient des capacités d'entrée dans les cellules altérées, ce qui est cohérent avec les résultats publiés (Maury et al., 2016 ; Moura et al., 2016). Après 3 jours d'infection, la majorité des souches avaient une capacité de dissémination dans les cellules comparable à la souche modèle, et ce, même lorsque leur capacité à entrer dans les cellules était altérée. Nous avons établi que la majorité des souches avaient la capacité de former des LisCVs. Ainsi la formation des LisCVs est une **caractéristique intrinsèque et générale** de l'espèce *Lm*. Nous avons cependant mis en évidence une souche (V1) altérée dans sa capacité à former des LisCVs, associée à un défaut d'entrée lié à la production d'une InlA tronquée. De plus, V1 restait confiné dans sa vacuole primaire d'internalisation. Une analyse de génomique comparative a permis d'identifier une mutation conduisant à un codon stop prématuré (PMSC) dans *hly*, conduisant à la production d'une LLO tronquée et non fonctionnelle. V1 appartenait au CC121. Les CC121 et CC9 sont des CC connus pour être prévalents parmi les isolats alimentaires et peu retrouvés parmi les isolats cliniques (Maury et al., 2016 ; Charlier et al., 2017). Des données expérimentales montrent également que ces CC sont associés à de l'hypo-virulence chez la souris (Maury et al., 2016). De plus, la majorité des CC9 et CC121 présentent une InlA tronquée (InlA-Δ), essentielle pour l'invasion (Moura et al., 2016). Ce résultat suggérait que des bactéries qui ont été sélectionnées pour la vie dans certains environnements extracellulaires et contre-sélectionnées pour la vie intracellulaire, avaient perdu leur capacité à persister chez l'hôte. Nous

avons émis l'hypothèse que ces souches avaient perdu des gènes de persistance ou portaient des mutations dans ces gènes.

Nous avons donc effectué un deuxième criblage pour enrichir notre panel en souches hypo-invasives (15 CC121 et 20 CC9). Nous avons mis en évidence 3 nouveaux variants affectés dans la formation des LisCVs (V2, V3 et V4).

V2 présentait un phénotype « hyper-persistant » observé dans les phases précoces de l'infection comparé aux souches de phénotype "WT", avec des LisCVs plus larges et une plus forte proportion de bactéries associées aux LisCVs, phénotype comparable à celui obtenu pour un mutant EGDe-Δ*actA*. Par des analyses de génomique comparative, nous avons montré que ce défaut était associé à la perte du gène *gshF*, co-activateur du régulateur transcriptionnel majeur des gènes de virulence de *Lm*, PrfA (Renière et al., 2016).

V3 et V4 présentaient un phénotype « hypo-persistant » très proche et retrouvé spécifiquement lors des phases tardives de l'infection (>24 h), comparé aux souches de phénotypes "WT" avec des LisCVs plus petites, une proportion plus faible de bactéries associées aux LisCVs et plus associées à l'actine. De plus, V3 et V4 montraient plus d'ActA à leur surface, après 3 jours dans les cellules. Par analyses de génomique comparative, nous avons mis en évidence que ces 2 souches également très proches génétiquement, possédaient seulement 36 mutations qui les séparaient de l'ensemble des 18 CC9 de phénotype "WT" dont 6 (SNP/INDEL) communes aux 2 souches et uniques parmi une collection de plus de 200 souches CC9. Ces 6 mutations apparaissaient dans le gène *lmo0444* (*yueB*), gène de l'îlot de stress SS1, *lmo0224* (*folP*), gène codant pour une protéine impliquée dans la biosynthèse du folate (vitamine B9), *lmo1845* (*pBuO*), gène qui code pour une perméase guanine hypoxanthine, *lmo1915* (*maeA/mleS*) un gène qui code pour une putative malate déshydrogénase oxaloacétate-décarboxylante NAD-dépendante, *lmo2667* (*mtlF*) qui code pour une enzyme associée à un PTS de classe mannitol et *ftsA*, qui code pour un facteur bactérien du divisome. Du fait de la proximité phénotypique et génétique de V3 et V4, nous avons ciblé les 6 mutations communes pour tenter d'expliquer le phénotype dit "hypo-persistant" associé à V3 et V4.

Parmi ces gènes, nous avons écarté *lmo0444*, gène absent des souches cliniques de sérotype 4b (Ryan et al., 2010), ainsi que *lmo1845*, dont la mutation conduit à la synthèse d'un acide aminé avec des propriétés physico-chimiques proches (Met/Leu). Pour les autres mutations, nous avons généré les mutants de délétion EGDe-Δ*inlA*-Δ*folP*, EGDe-Δ*inlA*-Δ*lmo1915* dont les phénotypes sont en cours de caractérisation. Nous avons testé la souche EGDe-Δ*lmo2665* (disponible au laboratoire et dont le gène code pour la perméase du PTS de classe mannitol

auquel *lmo2667* est associé) (Kentache et al., 2016). Le phénotype intracellulaire de la souche était comparable à celui de la souche WT. *ftsA* étant un gène essentiel, nous avons donc tenté de générer la forme mutée de *ftsA* de V3/V4 dans la souche EGDe-Δ*inlA*, sans succès. Nous avons choisi une approche alternative en surexprimant par complémentation la forme WT de *ftsA* dans les variants V3 et V4. Les résultats sont en cours d'analyse. Nous n'excluons pas que le phénotype puisse être lié à une combinaison de plusieurs mutations.

Vous trouverez dans la suite de cette Partie I, le draft de l'article "A negative selection approach identifies genetic determinants of the *Listeria* intracellular persistence stage in epithelial cells" rédigé en anglais. Cet article est destiné à être prochainement soumis, une fois que nous aurons analysé le phénotype des mutants de délétion générés, sur la base des mutations observées pour V3 et V4.

A negative selection approach identifies genetic determinants of the *Listeria* intracellular persistence stage in epithelial cells

Aurélie Lotoux [1¶], Pierre-Emmanuel Douarre[2¶], Matthieu Bertrand [1], Edward M. Fox [3], Federica Palma [2], Mounia Kortebi [1], P.Scott Chandry [4], Anna Oevermann [5], Laurent Guillier [2], Sophie Roussel [2], Alessandro Pagliuso [1], Hélène Bierne [1] and Eliane Milohanic [1]

1. Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, EPIMIC Lab, Jouy-en-Josas, France.

2. Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety, Salmonella and Listeria Unit, University of Paris-Est, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Maisons-Alfort, France.

3. Department of Applied Sciences, Northumbria University, Newcastle upon Tyne, UK.

4. CSIRO Agriculture and Food, Werribee, Australia.

5. Division of Neurological Sciences, Department of Clinical Research and Veterinary Public Health, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland.

Introduction

Listeria monocytogenes (*Lm*) is an intracellular pathogen that causes listeriosis, a serious foodborne disease that results in the highest number of hospitalizations in Europe and the United States (Scallan et al., 2011; Europe Food Safety et al., 2021). It can be lethal to immunocompromised individuals, the elderly and newborns, with a high mortality rate of 30% (World Health Organization, 2018). *Lm* is ubiquitous in products intended for human consumption and in agri-food environments. Yet listeriosis remains rare, with an average of 300 cases per year in France (Santé Publique France, 2022). Although it is efficiently eliminated

by immunocompetent individuals, there is nevertheless a significant asymptomatic fecal carriage of *Lm* in humans (~10%) and animals (Hurtado et al., 2017; Hafner et al., 2021). In addition, the asymptomatic phase of invasive listeriosis can be long, especially when associated with pregnancy, up to 3 months (Goulet et al., 2013; Angelo et al., 2016).

Lm is the archetypal intracellular pathogenic bacterium and has many virulence factors, which have been extensively studied over the last 40 years. It is a bacterium that is particularly well adapted to its host. In non-phagocytic models, *Lm* induces its internalization via Internalin A (InlA), and then disrupts the primary entry vacuole membrane using Listeriolysin O (LLO), a pore-forming toxin, in collaboration with phospholipases A and B, *Lm* then exploits the host actin machinery using the motility factor ActA, promoting motility and propagation to adjacent cell in secondary vacuoles from which it escapes again. This active cytosolic lifestyle allows the pathogen to disseminate into tissues while evading the extracellular humoral immune response. Recent data highlight the ability of *Lm* to enter a slowed metabolic state within tertiary vacuoles *in vitro* (Kortebi et al., 2017; Bierne et al., 2018). After the active dissemination phase, bacteria stop producing ActA protein on their surface and are engulfed in vacuoles called LisCVs (for *Listeria*-containing vacuoles). This phase is accompanied by a phenotypic change with bacteria entering a dormant/ slow-replicative phase. Additionally, a population of vacuolar bacteria converts to a viable-non-culturable form (VBNC) (Kortebi et al., 2017; Lotoux et al., 2022). These intracellular VBNC *Lm* could be responsible for the asymptomatic carriage of this pathogen. All these data suggest the existence of an intracellular niche of quiescent bacteria in tissues, which would retain their virulent potential.

The pathogenic species *Lm* is divided into several serotypes divided into three main lineages (Wiedmann et al., 1997; Piffaretti et al., 1989) and more than 200 clonal complexes (CCs) (Ragon et al., 2008; Maury et al., 2016). Isolates belonging to lineage I, in particular CCs 1, 2, 4 and 6, serotypes 1/2b and 4b, are more frequently found among listeriosis cases and under-

represented in food. CC1 is the most common clonal group associated with human listeriosis (neuro-meningeal, feta-placental and bacteremia) (Orsi et al., 2011; Maury et al., 2019). CC6 is the second most involved CC in human pathology (Maury et al., 2016). In contrast, some lineage II strains of serotypes 1/2a and 1/2c, and CC9 and CC121 are more frequently isolated from food and rarely from clinical cases. CC121 are known to persist for months or even years in food processing plants (Holch et al., 2013; Fox et al., 2016; Ortiz et al., 2016). This genetically related subgroup of *Lm* is of particular importance to the food industry, as it is the clonal group most associated with food processing environments in France and frequently found in Australian food production systems (Maury et al., 2016). CC9 and CC121 strains are adapted to food processing environments, with a higher prevalence of stress resistance genes and tolerance to benzalkonium chloride, a surface disinfectant commonly used in the food industry, and are more efficient than their hypervirulent counterparts at forming biofilms in the presence of this disinfectant (Maury 2019; Ortiz, 2016).

Genome analysis of these clonal complexes has revealed the presence of new virulence factors that may contribute to their observed tropism (neural or placental), notably the LIPI-4 locus in CC4 or LIPI-3 in certain 4b strains (Maury et al., 2016; Moura et al., 2019; Disson et al., 2021). The majority of the so-called "hypo-virulent" strains CC9 and CC121 carry a mutation in the *inlA* gene leading to the appearance of a premature stop codon (PMSC) and thus a truncated/secreted InlA (InlA-Δ). These mutations are associated with reduced invasion of intestinal and liver cells *in vitro* and reduced virulence in a guinea pig oral infection model (Nightingale et al., 2008). Epidemiological data indicate that clinical strains, particularly those from maternal-fetal infections, express InlA-Δ less frequently than foodborne strains (Disson et al., 2008; Ragon et al., 2008) and are a marker of hypo-virulent strains for this symptom. Together, this population heterogeneity reflects a different pathogenic potential among *Lm* isolates.

The objective of our study is to exploit the genetic diversity and heterogeneity of the pathogenic *Lm* species to identify new bacterial determinants involved in the intracellular life of *Lm* and in particular in the biogenesis of LisCV. Indeed, the formation of LisCVs was characterized for two laboratory strains 10403S and EGD-e (Bécavin et al., 2014). For this purpose, we established a systematic screening protocol in a trophoblastic epithelial model (JEG-3) for the study of invasion, dissemination, intracellular replication at early and late times and the formation of LisCVs, in CFUs and immunofluorescence (IF) observations. We tested more than 70 strains representative of the two main lineages of the *Lm* species and also focused on the hypo-virulent strains CC9 and CC121 showing InlA-Δ. Our hypothesis is that the loss of functional InlA might have released the selective pressure on genes important for the intracellular life of *Lm,* thus increasing our chance to find mutant strains affected in either bacterial invasion or LisCV formation.

Results

The majority of *L. monocytogenes* strains persist in epithelial cells and generates LisCVs

We used the long-term infection model that we established in the placental JEG-3 epithelial cell line to examine the behavior of 71 *Lm* strains (Kortebi et al. 2017). In JEG-3 cells, *Lm* EGD-e and 10403S laboratory strains are internalized through the InlA- and InlB-dependent pathways (Pizarro-cerdá et al., 2012) and form LisCVs after three days of infection (Kortebi et al., 2017). Our strain collection included isolates of the two major lineages of *Lm* (lineages I and II, Ragon et al., 2008; Maury et al., 2019), including the laboratory strains EGD-e (Glaser et al., 2001; Bécavin et al., 2014), 10403S (Brundage et al., 1993; Bécavin et al., 2014), and L028, a strain producing a truncated InlA (InlA-Δ) (Jonquière et al., 1998). The remaining 68 isolates were of

diverse origin (**Supplementary Table 1**): 14 isolates from listeriosis cases (3 human and 11 animal isolates), 37 food isolates, and 17 environmental isolates (13 from animals and 4 from food processing environments). In terms of genetic distribution, 32 isolates belonged to lineage I, including 19 of the four predominant clonal complexes (CC) found in human clinical listeriosis cases (CC1, CC2, CC4, and CC6), and 39 isolates belonged to lineage II, including 13 of the two predominant CC in European food isolates (CC9 and CC121) (Ragon et al., 2008; Maury et al., 2019; Palaiodimou et al., 2021). Of note, that the laboratory strains EGD-e and L028 belong to CC9, while 10403S belongs to CC7.

JEG-3 cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of approximately 1 bacterium per 100 cells and intracellular bacterial loads were determined at 2 h and 72 h post-infection (p.i.) by quantification of Colony Forming Units (CFU) after plating lysates of infected cells on BHI agar dish. The 71 strains were tested in at least three independent experiments. After 2 h p.i, the internalization efficiency was estimated by the percentage of entry relative to the inoculum, with strain 10403S chosen as reference (i.e., % entry = 100%). Strains showed a large variability in the efficiency of entry into JEG-3 cells, particularly with a lineage-dependent effect. Thus, 87% (28/32) of lineage I strains, and 43% (17/39) of lineage II strains, had a higher percentage of entry than 10403S (**Figure 1A**). In addition, 36% (14/39) of lineage II strains, and only 6% (2/32) of lineage I strains were hypo-invasive, as the case for L028. All CC121 and CC9 strains were hypo-invasive, which is consistent with the fact that these strains have a truncation in InlA (InlA-Δ) (**Supplementary Table 1**). A scatter plot of the mean of the 3 experiments grouping the 4 CC overrepresented in clinical cases (CC1, CC2, CC4, CC6) and the two CCs overrepresented in food (CC9 and CC121) illustrates these differences (**Figure 1B**).

Despite this variability in entry efficiencies, the majority of strains (69/71) were able to multiply, disseminate and persist over 3 days of infection, as shown by the quantification of

intracellular bacterial loads at 72 h p.i., ranging from $2x10^4$ to $3x10^5$ CFU/well (**Figure 1C, Figure 1D**). Notably, most of the hypo-invasive strains, including L028, showed no notable differences in intracellular bacterial load at 72 h p.i., compared to the other strains, suggesting that the absence of a functional InlA did not impact the subsequent steps of the intracellular infection process.

However, we found two hypo-invasive strains, 2965 and 06CEB179LM, showing a strong reduction in bacterial load at 72 h p.i., of approximately 2 and 3 Log CFU, respectively (**Figure 1C and D**).

We next investigated the ability of *Lm* to colocalize wiith LisCV/LAMP1 by examining 35 strains representative of the different CC and origins. All strains studied by microscopy, including InlA-Δ, formed LisCVs at 72 h p.i. as revealed by co-localization of *Lm* with the lysosomal marker LAMP1. **Figure 1E** illustrates this phenotype for EGD-e and its isogenic mutant EGDe-Δ*inlA*, as well as four lineage I strains (CC1, CC2, CC4 and CC6 clinical strains) and four lineage II strains (L028, CC9, CC121, CC37).

Overall, these results indicate that the localization in LisCV is an intrinsic property of *Lm* during infection in epithelial cells and is not isolate- or clonal complex-specific.

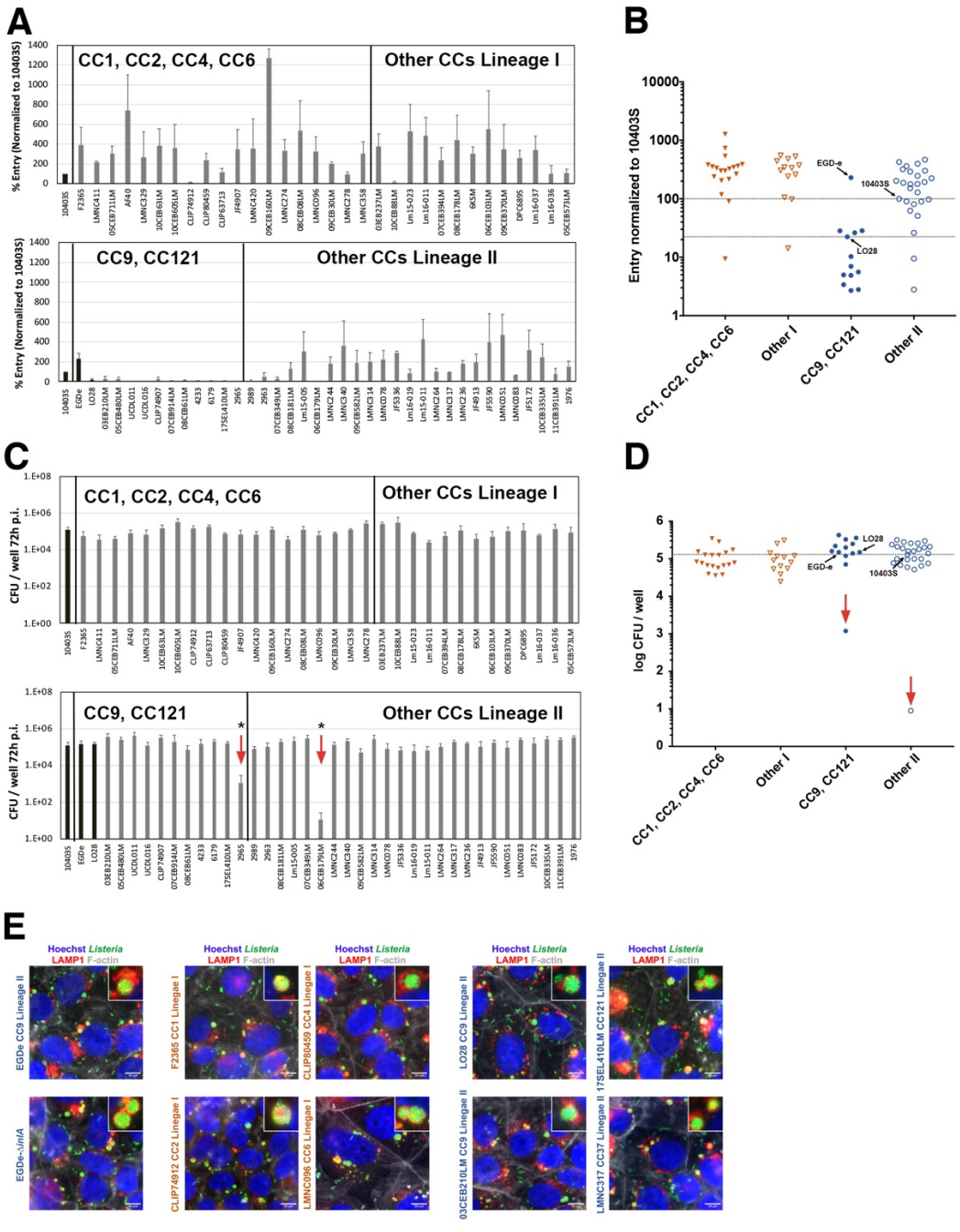


Fig. 1

Figure 1. First screen of 71 strains for intracellular phenotypes in placental JEG-3 cells. JEG-3 cells were infected with the indicated strains (MOI= 0.01). **A-B.** Entry capacities were examined after 2h of infection. % entry = (number of bacteria internalized/number of initial bacteria in the wells) was normalized to 10403S and represented by strain (**A**) and by clonal complexes (**B**). %Entry of the laboratory strains 10403S, EGD-e and LO28 are indicated by back arrows. Results represent the mean of three independent experiments. **C-D.** Multiplication capacities were examined by the quantification of the intracellular load after 72 h of infection. Results were represented by strain (**C**) and by clonal complexes (**D**). Two strains V1 (2965) and 06CEB179LM, showing a strong reduction in bacterial load, were pointed by red arrows. The CFU/well represents the mean of three independent experiments. Statistical differences assessed by Two-Sample T-test between strains and control EGD-e (*p≤0.05). **E**. Micrographs of LisCVs in JEG-3 cells infected for 72 h. EGD-e, its isogenic mutant EGDe-Δ*inlA* and eight representative strains are shown. Images are overlays of Hoechst (DNA, blue), Listeria (green), LAMP1 (red) and F-actin (white) signals. Bars: 10µm. Insets show representative LisCVs.

Identification of a InlA-Δ variant with a premature stop codon in the virulence gene *hly*.

The identification of two strains with impaired infectivity during long-term infection is in line with the existence of hypo-virulent strains, particularly among food isolates (**Figure 1C, Figure 1D)** (Maury et al., 2016; Maury et al., 2019). We first evaluated the extracellular growth of these two strains, 2965 (a CC121 strain) and 06CEB179LM (a CC193 strain). The growth was compared to the reference strain EGD-e and 17SEL410LM (CC121-WT), a CC121 strain behaving as EGD-e during intracellular infection (**Figure 1C)**. The results showed that 06CEB179LM exhibits a strong growth defect in BHI liquid medium at 37°C, whereas 2965 multiplied like the control strains (**Supplementary Figure 1**). Thus, the intracellular multiplication defect of 06CEB179LM can be explained by a general defect in bacterial growth, while 2965 (hereafter, referred to as variant V1) must have acquired mutation(s) that specifically impaired intracellular multiplication.

We investigated whether V1 presented mutations in the virulence genes of the LIPI-1 locus, which are involved in the active phases of the *Lm* intracellular life (*i.e.,* exit from the entry vacuole, actin-dependent motility and cell to cell spread) (**Table 1**). We identified a mutation in the *hly* gene coding for Listeriolysin O (LLO), the cytolysin essential for exit of bacteria from the internalizing vacuole (**Figure 2A**). This mutation generates a stop codon leading to the production of a truncated LLO-Δ473 protein. The loss of the C-terminal region, which is involved in the binding of this pore-forming toxin to cholesterol in eukaryotic membranes, inhibits the function of LLO (**Figure 2A**) (Hamon et al., 2012; Köster et al., 2014). Accordingly, V1 phenocopied the 10403S-Δ*hly* mutant, which we previously showed to be severely attenuated during long-term infection in JEG-3 epithelial cells (Kortebi et al. 2017) (**Figure 2B**). At 2 h p.i., V1 and 10403S-Δ*hly* entered JEG-3 cells as efficiently as the control strains 10403S and 17SEL410LM (**Figure 2B**). However, at 6 h and 72 h p.i., 10403S-Δ*hly* and V1 failed to multiply and spread in the cell monolayer, in contrast to control strains (**Figure**

2C) (Kortebi et al). Additionally, V1 was non-hemolytic on blood agar plates, as compared to two hemolytic (10403S and a clinical strain, CLIP80459) and two non-hemolytic (10403S Δ*hly* and *Listeria innocua*) strains (**Data not shown).**

In conclusion, the screening of 71 strains performed in JEG-3 epithelial cells during long-term infection led to the identification of a hypo-virulent variant which, in addition to a InlA deletion, has acquired a LLO truncation which severely impacted the entry and multiplication of bacteria. These results support the hypothesis that the loss of functional InlA might counter-select genes required for bacterial intracellular life and lead to the fixation of mutations in bacterial genes involved in intracellular phases subsequent to internalization, such as exit from the entry vacuole, intracellular multiplication, intercellular dissemination and persistence in LisCV.

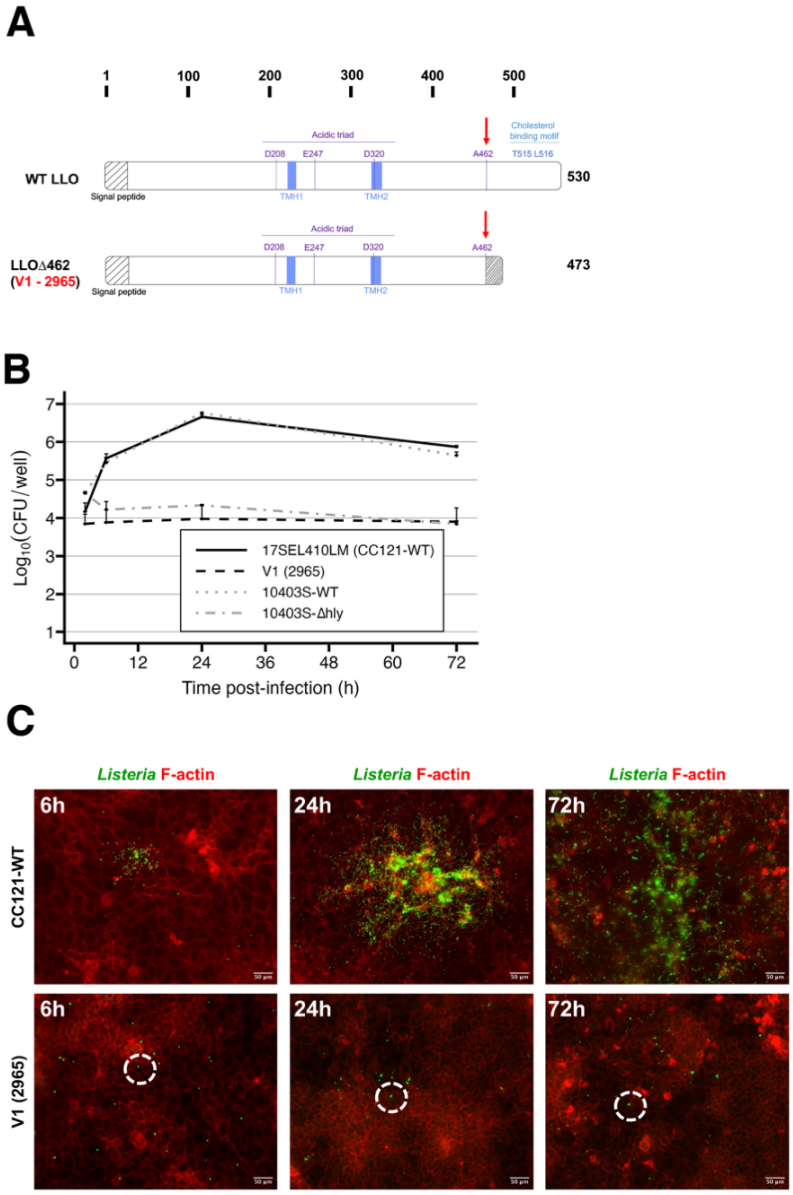


Fig. 2

Figure 2. V1 variant is impaired in vacuole escape. A. Schematic representation of Listeriolysin O (LLO) of the wild-type EGD-e (high panel) and V1 variant (low panel). Signal peptide, acidic triad, cholesterol binding motif and the important amino acids and their positions are shown. The two transmembrane β-hairpins (TMH) are shown in blue. The LLO produced by V1 carries a mutation at position 462 (red arrow), leading to the loss of the last 57 C-terminal amino acids. **B**. Kinetic of intracellular growth of the CC121-WT control strain, the V1 (2965) variant, 10403S and its isogenic mutant 10403S-Δ*hly*. **C**. Cell-to-cell spread of the CC121-WT control (17SEL410LM) and V1 (2965) variant in JEG-3 cells after 6h (left panel), 24h (middle panel) and 72 h (right panel) of infection at low magnification. Micrographs show intracellular bacteria (green) and F-actin (Phalloidin, red). Circles highlight individual bacteria. Bars: 50µm.

Identification of three *Lm* InlA-Δ variants showing altered LisCVs formation

To test this hypothesis, we performed a second screening on a group of 33 InlA-Δ strains and look at both CFU and LisCVs formation at 72 h p.i. Indeed, since LisCVs are acidic vacuoles where *Lm* enters in a slow-growing state (Kortebi et al., 2017), we reasoned that differences in LisCVs formation should also impact intracellular CFU. We included in the screening: 23 CC9 (including L028, EGDe and its isogenic mutant EGDe-Δ*inlA*) and 15 CC121 (including CC121-WT and the previously isolated V1) (**Supplementary Table 2**).

In addition to V1, we identified three strains showing a decreased bacterial load at 72 h p.i : 03EB120LM, 17SEL106LM and 14SEL860LM (hereafter referred to as variants V2, V3 and V4, respectively) (**Figure 3A and 3B**). We selected these three variants and look at their capability to form LisCVs during long-term infection. Interestingly, while EGD-e and EGDe-Δ*inlA* formed perinuclear Lamp+ LisCVs, V2, V3 and V4 presented an altered phenotype: V2 formed vacuoles more efficiently than the reference strains, while V3 and V4 had an impaired LisCVs formation (**Figure 3C**) (see below). Of note, these are the first isolated strains showing an alteration in the intracellular persistence phase. We therefore sought to identify the genetic determinants in V2, V3 and V4 responsible for these alterations.

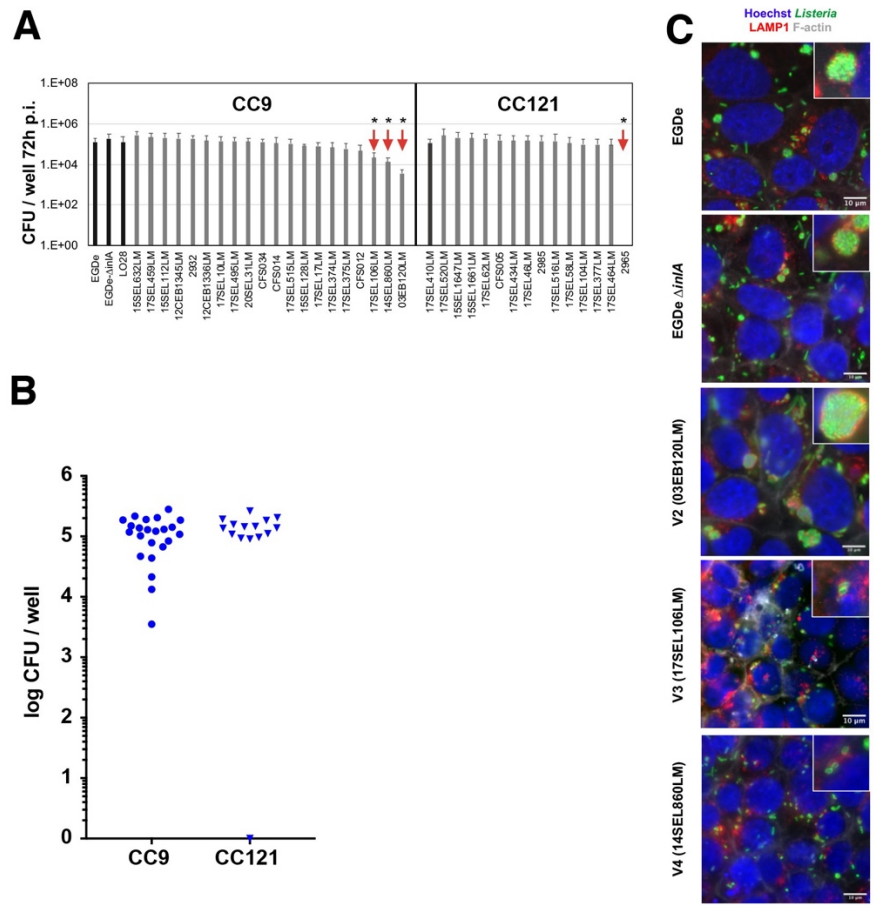


Fig. 3

Figure 3. Three *Lm* InlA-Δ variants show altered dissemination and LiCVs formation. A-B. Multiplication capacities were examined for 35 InlA-Δ variants (15 CC9 and 20 CC121) and EGD-e, EGDe-Δ*inlA* and LO28 as reference strains, by the quantification of the intracellular load after 72 h of infection. Results were represented by strain (**A**) and by clonal complexes (**B**). The CFUs/well represents the mean of three independent experiments. Statistical differences assessed by Two-Sample T-test between strains and control EGDe-Δ*inlA* ($p \leq 0.05$). **C.** Micrographs of LisCVs in JEG-3 cells infected for 72 h. EGDe-Δ*inlA* and the three strains V2, V3 and V4 are shown. Insets show representative LisCVs. Images are overlays of Hoechst (DNA, blue), *Listeria* (green), LAMP1 (red) and F-actin (white) signals. Bars: 10µm.

V2 shows a "hyper-persistent" phenotype due to a deletion of the *gshF* locus

We first quantified the percentage of vacuolar bacteria (LAMP+, Actin-) and found that V2 was more efficiently trapped in LisCVs compared to EGDe-Δ*inlA* (**Figure 4A**). Additionally, V2 formed bigger vacuoles that the reference strain EGDe-Δ*inlA,* with an area increasing from 5.25 μm^2 to 15.05 μm^2 (**Figure 4B**). Moreover, LisCVs generated by the V2 contained more bacteria than those of the EGDe-Δ*inlA* (**Figure 4C**). We noticed that these phenotypes were reminiscent of those of the -Δ*actA* mutants generated in EGD-e or 10403S laboratory strains. Like the V2, these Δ*actA* mutants form larger LisCVs containing more bacteria than those generated by their parental WT strain (Kortebi et al. 2017). We therefore tested whether V2 might have a defect in bacterial dissemination like Δ*actA*. At 2 h p.i the intracellular V2 load was similar to that of the EGDe-Δ*inlA* control strain, indicating that this variant was not affected in vacuolar lysis, nor in the early step of multiplication in the cytosol (**Figure 4D**). However, we observed a decline in intracellular CFUs starting from 6 h p.i., a phenotype compatible with a spreading defect. Microscopic observation of infection foci confirmed that V2 was strongly impaired in intercellular dissemination: at 6 h p.i. while EGDe-Δ*inlA* has already disseminated, V2 bacteria remained essentially confined to the first infected cell (**Figure 4E and Supplementary Figure 2**). At 24 h p.i., V2 formed foci of dissemination significantly smaller than those of EGDe-Δ*inlA* (**Figure 4E).** By examining F-actin-associated bacteria, we found that V2 was deficient in actin polymerization (**Figure 4F and 4G**). Collectively, these observations led us to investigate whether V2 may have acquired mutations in the *actA* gene or other genes of the LIPI-1 locus, such as *prfA* a master regulator of *actA* expression (Freitag et al., 2009). However, all genes in the V2 LIPI-1 locus, including *actA* and *prfA*, encoded proteins that were 100% identical to those produced by the LIPI-1 locus of the WT EGD-e strain (**Supplementary Table 3**). We therefore employed a comparative genomics approach to find genetic mutations unique to V2. We selected 13 CC9 sequenced InlA-Δ strains (**Supplementary Table 2**) that behave as

the WT EGD-e or EGDe-Δ*inlA* strains in our initial screening (*i.e.,* Actin polymerization at 6 h p.i., CFU count at 72 h p.i and LisCVs formation; **Supplementary Figure 3**). To find V2-specific genetic alterations, we used two complementary softwares that allowed the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) (SNIPPY, (https://github.com/tseemann/snippy) or the absence/presence of genes (ROARY) (Page et al., 2015; Tonkin-Hill et al., 2020). SNIPPY analysis identified few V2-specific SNPs (4 genes, **Table 2A**). In contrast, ROARY analysis revealed the loss of 22 genes, distributed in 4 deleted regions on the EGD-e genome (**Table 2B**): deletion 1, from *lmo0082* to *lmo0087*, an operon of unknown function; deletion 2, from *lmo0088* to *lmo0094* encoding subunits of an ATP synthase (Xu et al., 2011); deletion 3, from *lmo0226* to *lmo0228*, an operon of unknown function; deletion 4 encoding Lmo1656, a virulence factor not expressed *in vitro* (David et al., 2018); deletion 5, from *lmo2767* to *lmo2775*, a region including *gshF (lmo2770)* which encodes a glutathione synthase required for PrfA activation (Renière et al., 2015) (**Supplementary Figure 4**).

The glutathione synthesized by GshF is involved in the late activation of PrfA in the intracellular environment, which in turn activates several genes involved in bacterial dissemination such as *actA* (Renière et al., 2015; Renière et al., 2016). We therefore hypothesize that the reduced actin association of the V2 (**Figure 4F and 4G**) might be dependent on an impaired PrfA activation and a decreased expression of ActA at the bacterial surface. Indeed, ActA immunostaining showed that at 6 h p.i., V2 bacteria produced less ActA on their surface than EGDe-Δ*inlA* control bacteria (**Figure 4H and 4I**). Re-expression of *gshF* in V2, after chromosomal integration of the *gshF* gene complemented this defect, with ActA again present on the bacterial surface, as shown by quantification of the ActA signal (**Figure 4H and 4I**). Furthermore, the size of LisCVs, which was increased in the V2, returned to a WT size by re-expression of *gshF* (**Supplementary Figure 5**). Indeed, V2 and 10403S-Δ*gshF* strains have

vacuoles size of around 14 µm^2 while 10403S-WT, V2 complemented and 10403S-Δ*gshF* complemented strains show all a similar vacuolar size of 6.5 µm^2 (**Supplementary Figure 5**).

Taken together, these results identify GshF as a negative regulator of LisCVs formation, through its positive control of ActA synthesis.

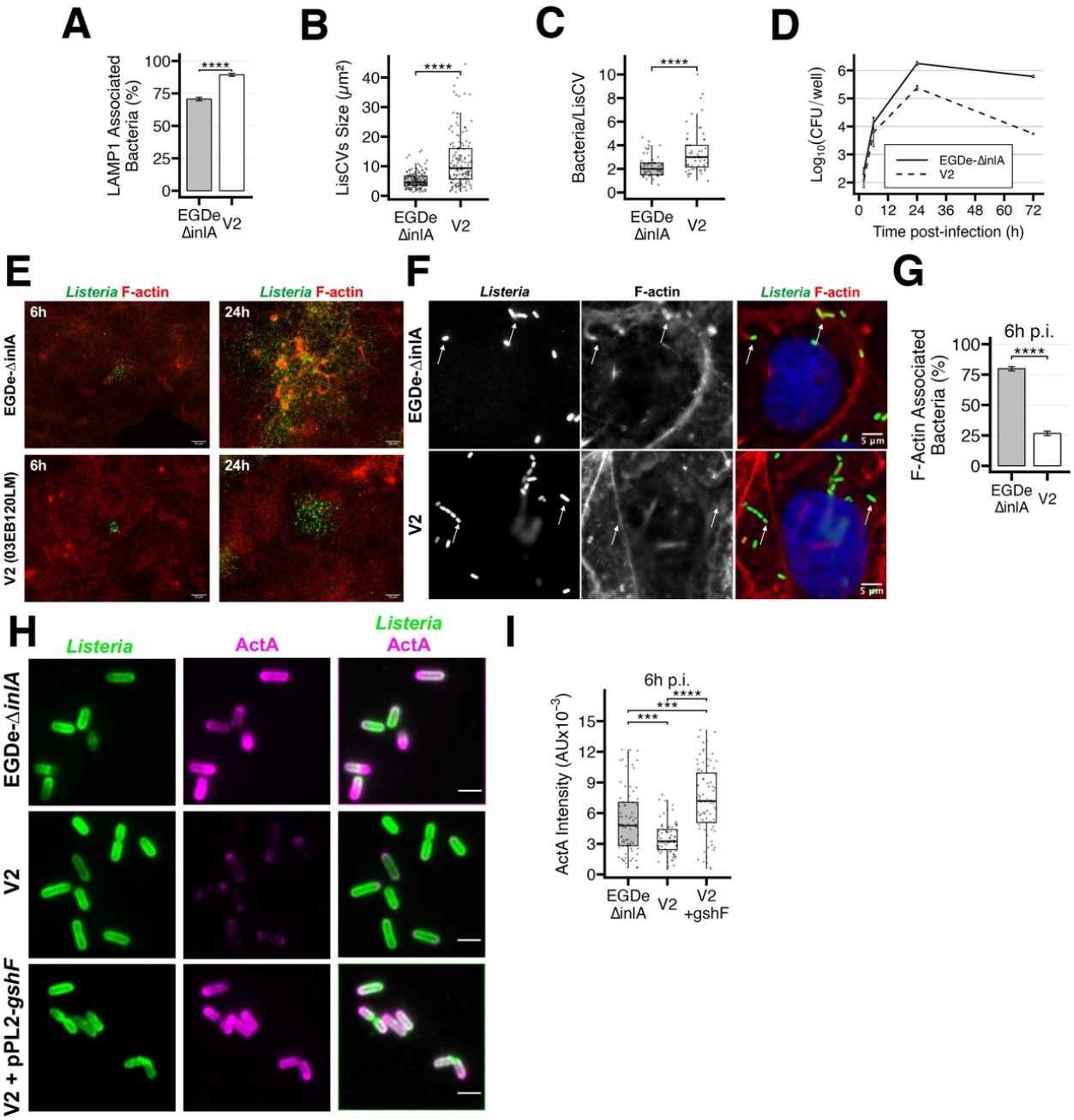

A
LAMP1 Associated Bacteria (%)
EGDe ΔinlA
V2
B
LisCVs Size (µm²)
C
Bacteria/LisCV
D
Log10(CFU/well)
EGDe-ΔinlA
V2
Time post-infection (h)
E
Listeria F-actin
6h
24h
EGDe-ΔinlA
V2 (03EB120LM)
F
Listeria
F-actin
G
6h p.i.
F-Actin Associated Bacteria (%)
H
Listeria
ActA
EGDe-ΔinlA
V2
V2 + pPL2-gshF
I
ActA Intensity (AUx10⁻³)
V2 +gshF

Fig. 4

Figure 4 - V2 has an intracellular "hyper-persistent" phenotype associated with the loss of the *gshF* gene. A. Proportion of LAMP1-associated bacteria at 72 h p.i. in JEG-3 cells for EGDe-Δ*inlA* (n = 1189 bacteria) and V2 (n = 698 bacteria). Results are from two independent experiments. Error bars represent the standard deviations for proportions. **B.** Average number of bacteria per LisCV at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA* and V2 from two independent experiments (n=60). **C.** LisCVs size measured in surface unit (µm²) at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA* and V2. Each group consists in the measure of the area of 150 vacuoles (represented by dots) from two independent experiments. **D.** Infection time-course of V2 in JEG3 cells (MOI = 0.001) compared to EGDe-Δ*inlA* strain. Each dot corresponds to the mean of CFUs recovered from two wells and the results are representative of two independent experiments. Error bars represent the standard deviation. **E.** Cell-to-cell spread in JEG-3 cells after 6 h (left panel) and 24h (right panel) of infection at low magnification. Micrographs show intracellular bacteria (green) and F-actin (Phalloidin, red). Bars: 50µm. **F.** Micrographs of JEG-3 cells infected for 6 h at high magnification. Images are overlays of *Listeria* (green) and F-actin (red) signals. Arrows point representative bacteria. Bars: 5 µm. **G.** Proportion of F-actin associated bacteria at 6 h p.i. calculated out of the total of intracellular bacteria for EGDe-Δ*inlA* (n = 525) and V2 (n = 571). Results are from two independent experiments. Error bars represent the standard deviation for proportion. **H.** Micrographs of *Listeria* (green) EGDe-Δ*inl*A, V2 and V2 complemented strain during a 6 h infection in JEG-3 cells (ActA in pink). **I.** Average ActA fluorescence intensity at the surface of bacteria for EGDe-ΔinlA and V2 and V2 complemented strain at 6 h p.i. Each group consists in the measure of the average ActA fluorescence intensity of 80 bacteria (represented by dots) from two independent experiments.

Phenotypic characterization of V3 and V4

We next analyzed in more details the V3 and V4 strains. Unlike V2, V3 and V4 appeared to form less LisCVs during long-term infection (**Figure 5A**). Quantification of LAMP1-associated bacteria confirmed that V3 and V4 mostly resided in the cytoplasm at 72 h p.i. (**Figure 5B**). Additionally, V3 and V4 formed smaller LisCVs compared to EGDe-Δ*inlA,* with an area decreasing from 5.25 µm^2 to 3.34 µm^2 and 3.56 µm^2, respectively (**Figure 5C**).

Since bacterial localization within LisCVs requires an arrest of ActA-mediated actin polymerization at the bacterial surface, we sought to verify whether the impaired vacuolar localization of V3 and V4 might depend on an altered association of these variants with actin. Quantification of actin+ bacteria at 72 h p.i revealed that V3 and V4 were more frequently associated with actin than EGDe-Δ*inlA* (**Figure 5D**).

This result led us to test whether the different association of V3 and V4 with actin could impact bacterial multiplication and dissemination at early time points of infection. At 2 h and 6 h p.i the intracellular bacterial loads of V3 and V4 were similar to that of the EGDe-Δ*inlA* (**Figure 5E**). Surprisingly, at 24 h p.i, the number of intracellular bacteria decreased in V3 and V4 by almost half log compared to the reference strain. Microscopic observation of infection foci confirmed that V3 and V4 had a spreading defect compared to EGDe-Δ*inlA* and EGD-e

WT strains. (**Figure 5F)**. Thus, although V3 and V4 are more associated with actin, they seem to have a defect in actin-dependent dissemination. Immunostaining and quantification of ActA at the bacterial surface showed that at 72 h p.i., V3 and V4 cytosolic bacteria produce more ActA than EGDe-Δ*inlA* bacteria (**Figure 5G and 5H**). Moreover, while in EGDe-Δ*inlA* ActA was mainly present at the bacterial poles, it looked more evenly distributed over the bacterial surface in V3 and V4 (**Figure 5I**). Impaired V3 and V4 dissemination might therefore be dependent on a misslocalization of ActA at the bacterial surface which in turn would affect actin-dependent bacterial movement. In agreement with this hypothesis, we observed that at 24 h p.i., V3 and V4 formed significantly less comet tails than EGDe-Δ*inlA* (**Figure 5J**).

Altogether, these results led to the identification of V3 and V4 as two hypo-persistent strains (e.g less associated to LisCVs) that show a deregulation in the host actin polymerization. Moreover, our data highlight that the V3 and V4 strains were phenotypically very closed according to our infection protocol.

1

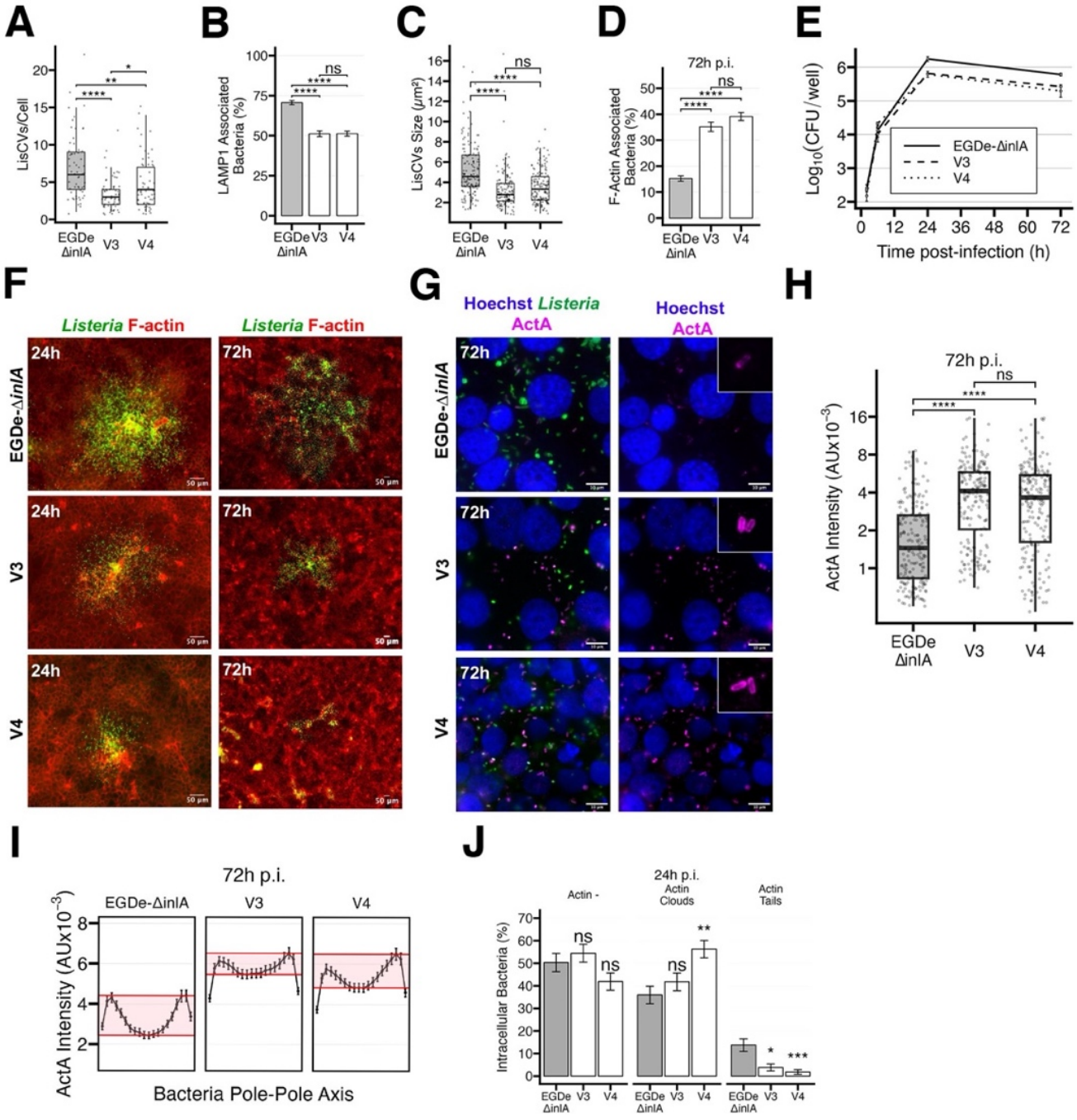

A
LisCVs/Cell
EGDe ΔinlA
V3
V4
B
LAMP1 Associated Bacteria (%)
C
LisCVs Size (μm²)
D
72h p.i.
F-Actin Associated Bacteria (%)
E
Log10(CFU/well)
EGDe-ΔinlA
V3
V4
Time post-infection (h)
F
Listeria F-actin
24h
72h
EGDe-ΔinlA
V3
V4
G
Hoechst Listeria ActA
Hoechst ActA
H
72h p.i.
ActA Intensity (AUx10⁻³)
I
72h p.i.
ActA Intensity (AUx10⁻³)
Bacteria Pole-Pole Axis
J
Actin -
24h p.i.
Actin Clouds
Actin Tails
Intracellular Bacteria (%)

Fig. 5

Figure 5. V3 and V4 have a similar "hypo-persistent" phenotype. A. Average number of LisCVs per cell at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA*, V3 and V4. For each strain, the number of LisCVs was counted in 60 infected cells from two independent experiments. **B.** Proportion of LAMP1-associated bacteria at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA* (n = 1189 bacteria), V3 (n = 725 bacteria) and V4 (n = 956 bacteria). Results are from two independent experiments. Error bars represent the standard deviation. **C.** LisCVs size measured in surface unit (µm²) at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA*, V3 and V4. Each group consists in the measure of the area of 150 vacuoles (represented by dots) from two independent experiments. **D.** Proportion of F-actin associated bacteria at 72 h p.i. calculated out of the total of intracellular bacteria for EGDe-Δ*inlA* (n = 1189), V3 (n = 725) and V4 (n = 956). Results are from two independent experiments. Error bars represent the standard deviation. **E.** Infection time-course of V3 and V4 in JEG3 cells (MOI = 0.002) compared to EGDe-Δ*inlA* strain. Each dot corresponds to the mean of CFU recovered from two wells and the results are representative of two independent experiments. Error bars represent the standard deviation. **F.** Cell-to-cell spread in JEG-3 cells after 24h (left panel) and 72 h (right panel) of infection at low magnification. Micrographs show intracellular bacteria (green) and F-actin (Phalloidin, red). Bars: 50µm. **G.** Micrographs of *Listeria* (green) EGDe-Δ*inlA*, V3 and V4 during the infection process at 72 h p.i. in JEG-3 cells. Images are overlay of *Listeria* (green), Hoechst (blue) and ActA (pink). Bars: 10 µm. **H.** Average ActA fluorescence intensity at the surface of bacteria for EGDe-Δ*inlA*, V3 and V4 at 72 h p.i. Each group consists in the measure of the average ActA fluorescence intensity of 200 bacteria (represented by dots) from two independent experiments. **I.** Average ActA profiles along bacterial cell at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA*, V3 and V4. The x-axis represents the normalized length of the bacterial cell from one pole to the other. For each strain, a single dot is the mean of the ActA fluorescence intensity of 250 bacteria at a given relative position. The red area represents the minimum-maximum range of the fluorescence intensity, by excluding the extremities. Error bars represent standard error of the mean. **J.** Proportion of intracellular bacteria associated with F-Actin by forming clouds (Actin Clouds), tails (Actin Tails) or not associated with F-Actin (Actin -) at 24h p.i. for EGDe-Δ*inlA* (n = 153), V3 (n = 158) and V4 (n = 167). Results are from a single experiment. Bars represent the standard deviation for proportion.

Identification of the genetic variations responsible for the "hypo-persistent" phenotype of V3 and V4

We then sought to identify the genetic variations responsible for the hypo-persitent phenotype of V3 and V4. We followed the same approach used for V2 and first examined the LIPI-1 locus (**Supplementary Table 3**). No mutation in the virulence genes were found, except for a deletion in *actA* leading to a 35 aminoacid truncated ActA isoform. However, this allele of *actA* has been previously described as having no effect on virulence. Indeed, it is present in many clinical isolates, as well as in several strains included in our screening that showed no effect both in bacterial dissemination and LisCVs formation (**Figure 1C and 1E**) (Franciosa et al. 2005; Conter et al. 2010).

We next employed the same comparative genomics approach used for V2 and compared the V3 and V4 genomes to a panel of *Lm* strains showing a WT phenotype in terms of CFUs count at 72 h p.i. and LisCVs biogenesis (14 *Lm* strains; **supplementary Table 2 and supplementary Figure 3**). ROARY analysis did not reveal any missing gene in V3 and V4 compared to the WT phenotype strains. On the other hand, SNIPPY analysis identified 24 V3-

specific SNPs (21 missense mutations, 2 stop codons, 1 insertion; **Table 3A**) and 24 V4-specific SNPs (21 missense mutations, 2 frameshifts and 1 stop codon; **Table 3B**). We then crossed theV3- and V4-specific SNPs and strikingly found only 7 SNPs shared by both strains (**Table 3C**). This result indicates that only 7 genetic polymorphisms are responsible for the V3 and V4 phenotypes (more association with actin and impaired LisCVs formation). We wondered whether these 7 genetic polymorphisms were also present in additional *Lm* strains from the CC9. By analyzing the genome of 222 CC9 strains, we couldn't find any of these mutations, except for *lmo0078*. The phylogenetic tree of these 222 CC9 strains, indeed highlighted that V3 and V4 were genetically closely related, thus explaining the similar phenotype during long-term infection (**Supplementary Table 4**, **Figure 6**).

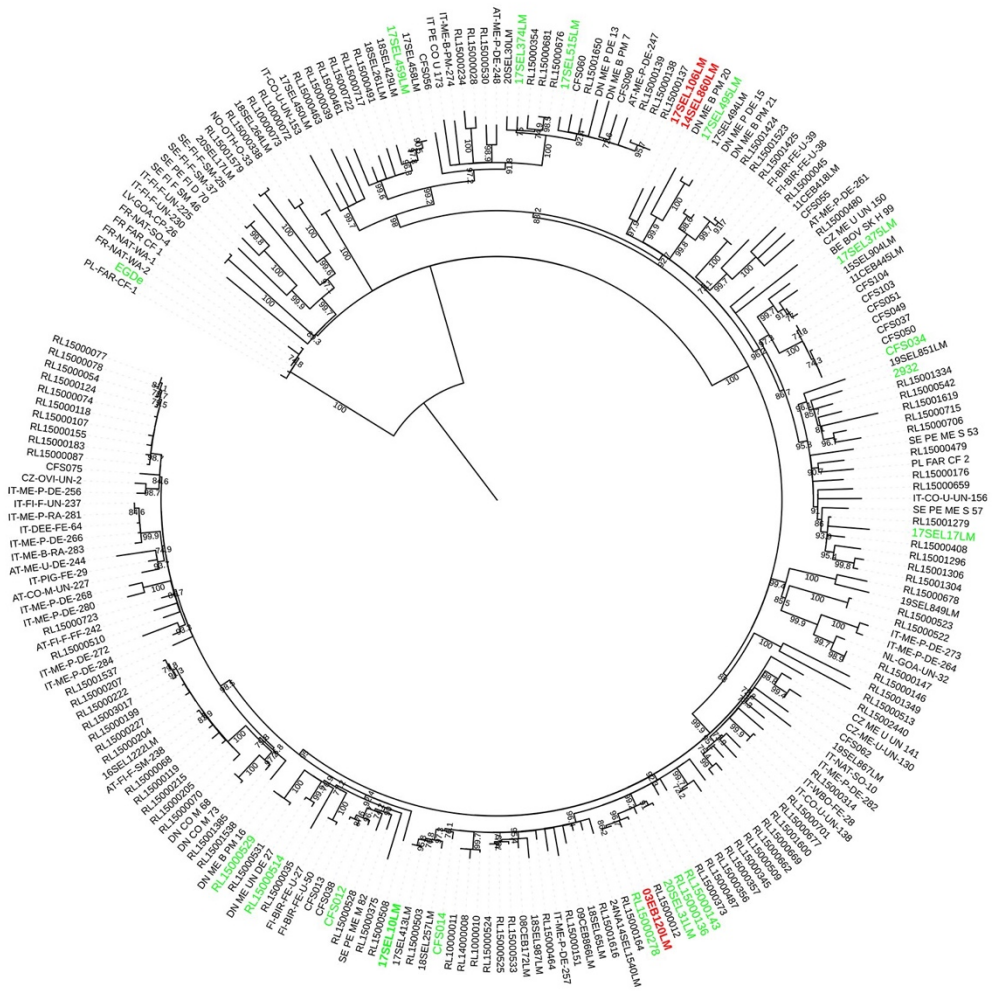


Fig. 6

Figure 6. Maximum-likehood tree created by IQ-tree from 222 CC9 strains. The tree was generated as described in Material and Methods. Variants strains are represented in red and strains with WT-phenotype for actin polymerization and LisCV formation are represented in green (including EGD-e reference strain).

We next investigated the functions of the mutated genes. One SNP was a stop codon present in the *lmo0444* (yueB) gene, which is part of the stress island SSI-1. However, SSI-1 is only present in a limited subset of strains (strains 1/2c, 3b and 3c; Ryan et al., 2010). Yet, as shown above, LisCV formation is a general phenomenon of the *Lm* species. *lmo0444* therefore did not appear to be a good candidate for a role in LisCV formation. Four SNPs were missense mutations in genes involved in metabolic pathways: *lmo0224* (*folP*), involved in folate (vitamin B9) biosynthesis; *lmo1845* (*pBuO*) encoding a guanine hypoxanthine permease; *lmo1915* (*maeA/mleS*), encoding a putative NAD-dependent oxaloacetate-decarboxylating malate dehydrogenase; and *lmo2667* (*mtlF*) encoding an enzyme associated to a mannitol-specific PTS. Finally, one SNP was a missense mutation in *lmo2033* (*ftsA*), encoding a major bacterial division factor.

We are currently in the process of generating deletion mutants to understand the contribution of each gene in the observed phenotype.

Conclusions

In this study by using a long-term infection model in JEG-3 trophoblastic cells, we investigated whether persistence in LisCVs is a general property of the *Listeria monocytogenes* species. By screening 106 strains from 22 different clonal complexes we observed that the majority of the *Lm* strains (96%) was able to persist and form LisCVs. Our data are consistent with the persistence in LisCVs being a widespread property among *Listeria monocytogenes* isolates. Nonetheless, by using a robust screening which allows the identifications of bacterial factors involved in intracellular dissemination and formation of LisCV, we could identify four *Listeria* variants showing altered LisCVs biogenesis. Interestingly, these variants were all hypo-virulent strains (CC9 and CC121) bearing a mutated *inlA* allele which resulted in the production of a

truncated or secreted protein. This suggests that genes playing a role in virulence and persistence might have been counter-selected in hypo-virulent strains (i.e strains that have lost the capability to enter in cells). In the future, we plan to broaden our screening and include additional CC9 and CC121 strains to find additional factors involved in the vacuolar phase of *Lm*.

Two of the four isolated mutants (V1 and V2) presented mutations in genes already described as involved in *Lm* infectivity (*hly* and *gshF*), thus validating our experimental approach. Additionally, we found two variants (V3 and V4) affected in the late phases of the infection, with a defect in vacuole formation. Indeed, there is less vacuoles per cell and the vacuoles generated by V3 and V4 appeared smaller. Additionally, V3 and V4 bacteria were also more associated with actin and still presented ActA on their surface at 72 h p.i,. Surprisingly, V3 and V4 showed a dissemination defect which correlates with an altered distribution of ActA at the surface as early as 24 h.

In order to find the genetic determinant(s) of the phenotypic alterations leading to hypo-persistent phenotype (e.g less association to LisCVs), we employed a genomic comparative approach. By comparing V3 and V4 with 14 strains showing a WT phenotype in respect to LisCVs biogenesis, we identified 6 mutations shared by these two variants and unique among a collection of 222 CC9 strains. We are currently studying the contribution of each of those genes in the hypo-persistent phenotype of V3 and V4 by introducing the identified mutations in the WT strain or by restoring the mutation in the variants strains.

Materials and Methods

Human cell lines and bacterial strains

JEG-3 cells (ATCC HBT-3) were cultured at 37°C under an atmosphere of 5% CO_2, in media recommended by ATCC (Manassas, VA). The culture media (GIBCO) was supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma). *L. monocytogenes* and *Escherichia coli* strains were grown in Brain-Heart Infusion (BHI) medium or Luria-Bertani (LB) medium (Difco, BD), respectively, with antibiotics in the presence of plasmids.

A total of 106 *L. monocytogenes* isolates of lineages I or II were used in this study and are listed in **Supplementary Table 1** (screen 1) and **Supplementary Table 3** (screen 2). The laboratory *L. monocytogenes* strains and mutants used in this study, *Listeria innocua* CLIP 74915, as well as plasmids, are listed in **Supplementary Table 5**. The complemented strain V2-pPL2-*gshF* was obtained by electroporating the integrative plasmid pPL2-*gshF* (a kind gift from D. Portnoy's laboratory) into variant V2.

Test of hemolytic activity of variant V2

Hemolytic activity was tested on Columbia horse blood agar plates (BioMérieux, France), as described in (Maury et al., 2017). *Lm* 10403S, CLIP80459 (HBSC078) and *Listeria innocua* CLIP 74915 and 10403S-Δ*hly* were used as positive and negative controls of hemolysis, respectively.

Antibodies reagents and epifluorescence microscopy

The primary antibodies and fluorescent secondary antibodies used in this study are described in Kortebi et al., 2017. Infected cells were processed for immunofluorescence as previously described (Kortebi et al., 2017).

Growth curves of bacterial strains

Growth curves in BHI broth for the indicated strains were obtained from 5 mL of cultures placed at 37°C with agitation. Overnight cultures were diluted to obtain the same number of bacteria at the onset of the assay (1/1000th, i.e., approximately $4x10^6$ bacteria per mL) and 200 microliters of the suspension was used to inoculate each well of the microplates (96-well). The microplates containing diluted strains were incubated for 24h at 37°C in a microplate Spark spectrophotometer (Tecan). Optical density at 600 nm (OD_{600nm}) was measured every 20 min, after 30 seconds of shaking of amplitude 4 mm.

Bacterial infections

The long-term infection protocol in JEG-3 cells was performed as previously described in Kortebi et al., 2017 with modifications.

Screen 1. 2 to 4 days before infection, JEG-3 cells were seeded in 24-well plates, at a concentration in the range of 7×10^3 to 5×10^4 cells/mL, in order to achieve a confluence of 90-100% the day of infection. The day before infection, bacteria were cultured in liquid BHI medium and incubated overnight at 37°C under agitation (200 rpm). JEG-3 cells were washed and then infected with 1 mL of bacterial suspension at a multiplicity of infection (MOI) value of ~ 0.01. The plates were centrifuged at 300 x g for 2 min to synchronize the entry of bacteria. After 1 h of infection, complete medium containing gentamicin (SIGMA) at 25μg/mL was added to cells to kill extracellular bacteria. Entry assays were performed at a comparable MOI of about 1 bacterium per 100 cells (MOI ~ 0.01). After 2 hours of infection, cells were lysed in cold water and the intracellular bacteria counted on BHI agar plates. The percentage of entry of each strain was determined by relating the number of intracellular bacteria to the number of bacteria in the inoculum from 3 independent experiments and compared to the laboratory strain

10403S, used as a reference (% entry = 100). The total bacterial load per well at 72 h p.i. was determined by CFU/well.

Screen 2. The MOI was adjusted to reach a similar number of intracellular bacteria (about 20 to 90) at 2 h *p.i.*, and monitor bacterial dissemination from isolated infected cells to individual infection foci at 72 h *p.i*. We adjusted the MOI of hypo-invasive CC9 and CC121 (*inlA*-Δ) strains and mutant EGDe-Δ*inlA* to 0.005-0.01 and of control strains EGD-e or 10403S (*inlA*-WT) strains to 0.0005-0.0001, to obtain a normalized entry. After 2 h and 72 h of infection, the cells were either lysed in cold water for bacterial enumeration on BHI agar and data were or fixed for immunofluorescence experiments. The total bacterial load per well at 72 h *p.i*. was determined by CFU/well and are from 3 independent experiments.

Kinetics of infections

JEG-3 monolayer was infected with bacteria at MOI of 0.001 or 0.01 and centrifuged 2 min at 300g to synchronize the bacterial uptake. After 1 h, cells were incubated in complete medium with 25 μg/mL gentamicin. Cells were processed for immunofluorescence or lysed at various time points (2 h, 6 h, 24 h and 72 h) using cold distilled water. Viable bacteria count of intracellular bacteria were determined by plating serial dilutions in PBS and numbering CFUs on BHI agar-plates.

Quantification foci area

Foci area quantification was obtained by using ImageJ software. Tiles of 6x6 images acquired with 20X objective were analyzed. The contour of foci dissemination was manually extracted by using "*Contour*" in ROI Manager. The signal is then binarized using the "Threshold" function with dark background. We then proceed to the detection of all the particles inside and

outside our ROI "*Contour*" (Analysis>Particle analysis) by checking "Includes Holes". We combine all the selected particles except "*Contour*", which allows to remove the particles outside our coarse selection and thus to visualize only the particles specific to the dissemination foci. (Selection of All the particles except "*Contour*" in ROI Manager>More>Combine). Once our final selection obtained, we calculate the area of dissemination via the function "Convec hull" which makes it possible to obtain the maximum area between each particle of a selection (Convec Hull>Add to ROI Manager (t)>Measure).

Construction of ActA distribution profiles

To obtain the average ActA distribution profiles along the bacteria, JEG-3 cells were infected by EGDe-*ΔinlA*, V3 and V4 up to time 72 h, fixed, and bacteria and the ActA protein were labeled as previously described. Images were acquired with 63X objective and analyzed with ImageJ. For each bacterium, the Feret diameter has been obtained and the intensity of ActA fluorescence has been calculated at different position along this axis. Feret diameters was assumed to correspond to the length of the bacteria, from one pole of the bacillus to the other. The bacteria have been oriented with an algorithm on RStudio, in order to match the maximum intensity of each bacterium on the same pole. The profiles have been normalized by the bacteria length. Using the profiles of 250 bacteria per strain from two independent experiments, an average ActA distribution profile was obtained by calculating the mean of ActA intensity at the different relative positions.

Statistical analysis

The graphs and the statistical analysis were realized in RStudio (R Core Team, 2022) with ggplot2 and rstatix packages in addition to base packages. For continuous parameter, statistical differences have been assessed with non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney tests or non-

parametric ANOVA (Kruskal-Wallis tests) following by Dunn's pairwise comparisons post-hoc tests. The statistical differences between proportions were evaluated with Chi-square tests of independence. Where 3 groups or more were compared, p-values were corrected following Holm's procedure. Differences were statistically significant if the adjusted p-values were below 0.05. Significance levels are indicated as following: NS : p-value > 0.05 ; * : p-value < 0.05 ; ** : p-value < 0.01 ; *** : p-value < 0.001 ; **** : p-value < 0.0001

Genomic Methods

Genome Sequencing

The raw reads produced by paired-end illumina sequencing were processed using the *in-house* workflow ARTWork (github.com/afelten-Anses/ARtWORK). This pipeline performs various analyses (assembly, annotation, quality control, read contamination) that have been described in detail in previous studies (Vila Nova et al., 2019; Palma et al., 2020). Briefly, *de novo* assembly was performed with SPAdes v3.9 assembler and contigs were annotated with Prokka v1.13.4. Sequence type (ST) and CC were also predicted based on the Listeria Multilocus sequence typing (MLST) scheme provided by the Institut Pasteur (Moura et al., 2016). The accession numbers, the typing data, the sequencing coverage and the metrics of the genome assemblies are provided in **Supplementary Table 2**. All the reads passed the quality check steps defined in ARTwork and contamination was not detected by Confindr.

In silico detection of virulence markers, SNP calling, pangenome analysis and genome wide association study were carried out to explain the hypovirulence observed in the two CC9 and the CC121 strains.

Virulence markers

The identification of virulence LIPI-1 genes was done using the BIGSdb-*Lm* platform (https://bigsdb.pasteur.fr). The reads of the 36 genomes (35 InlA-Δ strains and EGD-e) were mapped against all the alleles of the 59 virulence genes using the KMA alignment method. The BIGSdb alleles and detection of truncated genes are presented in **Table 1 and Supplementary Table 3**.

Variant calling

Variant calling was perform using the bacterial SNP-calling pipeline Snippy (v4.6.0) with default parameters (https://github.com/tseemann/snippy). To identify mutations (SNPs leading to missense mutation, small deletion-insertion or frameshifts) specific to the CC9 variants, the reads of the 15 wildtypes were aligned against the assemblies of 03EB120LM, 17SEL106LM and 14SEL860LM. Variant calling was also performed using EGD-e as the reference genome. Recombination events (including potential mobile genetic elements) were detected by Gubbins v 2.4.1.

Pangenome

Pangenome was analysed using Panaroo v 1.2.7 with strict stringency mode (Tonkin-Hill et al., 2020) to search the presence-absence of genes associated with the hypovirulence of our three variants within the CC9 genomes. Differences observed in the gene content between hypo-virulent and wildtypes strains were manually characterized with a BLAST analysis.

CC9 Phylogeny

To examine the genetic relationship of our CC9 strains with other publicly available genomes belonging to CC9, a maximum-likelihood tree was created from the recombination-purged

alignments using IQ-tree v.1.6.9 (Nguyen et al., 2014) under the determined best-fit determined by ModelFinder and ultrafast bootstrapping of 1000 replicates. The tree was rooted with midpoint rooting and visualized and annotated with iTol v6 (Letunic and Bork, 2021). Read accession and bioproject of the 222 genomes used for the phylogeny are available in **Supplementary Table 4.**

References

Angelo, K. M., Jackson, K. A., Wong, K. K., Hoekstra, R. M. & Jackson, B. R. Assessment of the Incubation Period for Invasive Listeriosis: Table 1. *Clin Infect Dis.* **63**, 1487–1489 (2016).

Bécavin, C. *et al.* Comparison of Widely Used *Listeria monocytogenes* Strains EGD, 10403S, and EGD-e Highlights Genomic Differences Underlying Variations in Pathogenicity. *mBio* **5**, e00969-14 (2014).

Bierne, H., Milohanic, E. & Kortebi, M. To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double Life of Listeria monocytogenes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 136 (2018).

Brundage, R. A., Smith, G. A., Camilli, A., Theriot, J. A. & Portnoy, D. A. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11890–11894 (1993).

Conter, M. *et al.* Polymorphism of actA gene is not related to in vitro virulence of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **137**, 100–105 (2010).

David, D. J., Pagliuso, A., Radoshevich, L., Nahori, M.-A. & Cossart, P. Lmo1656 is a secreted virulence factor of *Listeria monocytogenes* that interacts with the sorting nexin 6–BAR complex. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 9265–9276 (2018).

Disson, O. *et al.* Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455**, 1114–1118 (2008).

Disson, O., Moura, A. & Lecuit, M. Making Sense of the Biodiversity and Virulence *of Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology* **29**, 811–822 (2021).

Fox, E. M., Allnutt, T., Bradbury, M. I., Fanning, S. & Chandry, P. S. Comparative Genomics of the *Listeria monocytogenes* ST204 Subgroup. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).

Franciosa, G., Maugliani, A., Floridi, F. & Aureli, P. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **43**, 431–439 (2005).

Freitag, N. E., Port, G. C. & Miner, M. D. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**, 623–628 (2009).

Glaser, P. *et al.* Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* **294**, 849–852 (2001).

Goulet, V., King, L. A., Vaillant, V. & de Valk, H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* **13**, 11 (2013).

Hafner, L. *et al.* Listeria monocytogenes faecal carriage is common and depends on the gut microbiota. *Nat Commun* **12**, 6826 (2021).

Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F. & Cossart, P. Listeriolysin O: the Swiss army knife of Listeria. *Trends in Microbiology* **20**, 360–368 (2012).

Holch, A., Ingmer, H., Licht, T. R. & Gram, L. Listeria monocytogenes strains encoding premature stop codons in inlA invade mice and guinea pig fetuses in orally dosed dams. *Journal of Medical Microbiology* **62**, 1799–1806 (2013).

Hurtado, A., Ocejo, M. & Oporto, B. Salmonella spp. and Listeria monocytogenes shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. *Veterinary Microbiology* **210**, 71–76 (2017).

Jonquières, R., Bierne, H., Mengaud, J. & Cossart, P. The inlA Gene of Listeria monocytogenes LO28 Harbors a Nonsense Mutation Resulting in Release of Internalin. *Infect Immun* **66**, 3420–3422 (1998).

Kortebi, M. *et al.* Listeria monocytogenes switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Pathog* **13**, e1006734 (2017).

Köster, S. *et al.* Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation. *Nat Commun* **5**, 3690 (2014).

1.

Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* **49**, W293–W296 (2021).

Lotoux, A., Milohanic, E. & Bierne, H. The Viable But Non-Culturable State of Listeria monocytogenes in the One-Health Continuum. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 849915 (2022).

Maury, M. M. *et al.* Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* **48**, 308–313 (2016).

Maury, M. M. *et al.* Hypervirulent Listeria monocytogenes clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun* **10**, 2488 (2019).

Moura, A. *et al.* Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **87**, e00758-18 (2019).

Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **32**, 268–274 (2015).

Nightingale, K. K. *et al. inlA* Premature Stop Codons Are Common among *Listeria monocytogenes* Isolates from Foods and Yield Virulence-Attenuated Strains That Confer Protection against Fully Virulent Strains. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6570–6583 (2008).

Orsi, R. H., Bakker, H. C. den & Wiedmann, M. Listeria monocytogenes lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* **301**, 79–96 (2011).

Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P. & Martínez-Suárez, J. V. The Connection between Persistent, Disinfectant-Resistant Listeria monocytogenes Strains from Two Geographically Separate Iberian Pork Processing Plants: Evidence from Comparative Genome Analysis. *Appl Environ Microbiol* **82**, 308–317 (2016).

Page, A. J. *et al.* Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* **31**, 3691–3693 (2015).

Palaiodimou, L., Fanning, S. & Fox, E. M. Genomic insights into persistence of Listeria species in the food processing environment. *Journal of Applied Microbiology* **131**, 2082–2094 (2021).

Piffaretti, J. C. *et al.* Genetic characterization of clones of the bacterium Listeria monocytogenes causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3818–3822 (1989).

Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A. & Cossart, P. Entry of Listeria monocytogenes in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, a010009–a010009 (2012).

Ragon, M. *et al.* A New Perspective on Listeria monocytogenes Evolution. *PLoS Pathog* **4**, e1000146 (2008).

Reniere, M. L. *et al.* Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. *Nature* **517**, 170–173 (2015).

Reniere, M. L., Whiteley, A. T. & Portnoy, D. A. An In Vivo Selection Identifies Listeria monocytogenes Genes Required to Sense the Intracellular Environment and Activate Virulence Factor Expression. *PLoS Pathog* **12**, e1005741 (2016).

Ryan, S., Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. G. M. A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of Listeria monocytogenes in suboptimal conditions: Stress survival islet in L. monocytogenes. *Journal of Applied Microbiology* **109**, 984–995 (2010).

Scallan, E. *et al.* Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 7–15 (2011).

Tonkin-Hill, G. *et al.* Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol* **21**, 180 (2020).

Wiedmann, M. *et al.* Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct Listeria monocytogenes lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* **65**, 2707–2716 (1997).

Zhu, X. *et al.* Phenotypic, Proteomic, and Genomic Characterization of a Putative ABC-Transporter Permease Involved in *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Foodborne Pathogens and Disease* **8**, 495–501 (2011).

1 Listeriosis Annual Epidemiological Report for 2021. (2021).

Table 1. Comparison of the LIPI-1 virulence locus between EGD-e strain, CC121-WT (17SEL410LM) and V1 (2965).

Genome	LOCI	CC	*prfA*	PrfA	*plcA*	PlcA	*hly*	LLO	*mpl*	Mpl	*actA*	ActA	*plcB*	PlcB
EGD-e	57	CC9	prfA_16°	237	plcA_1	317	hly_1	530	mpl_1	510	actA_1	640	plcB_1	289
CC121-WT (17SEL410LM)	55	CC121	prfA_8	237	plcA_18	317	hly_13	530	mpl_17	510	actA_121	604	plcB_9	289
V1 (2965)	55	CC121	prfA_8	237	plcA_18	317	**hly_13°**	**473**	mpl_17	510	actA_121	604	plcB_9	289

Table 2A. SNIPPY Analysis between 15 CC9-WT strains and V2 (03EB120LM).

CHROM	POSITION	TYPE	REF (aa)	VAR (aa)	FTYPE	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	LOCS_TAG	GENE	PRODUCT
NC_003210	1323636	SNP	A	G	CDS	+	187/234	63/77	missense_variant c.187A>G p.Thr63Ala	lmo1295	NA	host factor-1 protein
NC_003210	2202104	SNP	G	T	CDS	-	1877/2262	626/753	missense_variant c.1877C>A p.Pro626Gln	lmo2121	NA	maltose phosphorylase
NC_003210	2652674	SNP	T	C	CDS	-	412/912	138/303	missense_variant c.412A>G p.Asn138Asp	lmo2575	NA	cation transporter
NC_003210	2709672	SNP	A	T	CDS	-	750/900	250/299	synonymous_variant c.750T>A p.Val250Val	lmo2637	NA	hypothetical protein

Table 2B. ROARY Analysis between 15 CC9-WT strains and V2 (03EB120LM).

VARIANT	PRES/ABS	ANNOTATION	No.ISOLATEs	V2 (03EB120LM)	LOCUSTAG	
group_973	Present in 03EB120LM only	hypothetical protein	1	03EB120LM_00153	-	
group_920	Present in 03EB120LM only	hypothetical protein	1	03EB120LM_02909	-	
group_870	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	**lmo0082**	
adhR_4	Present in ALL except 03EB120LM	HTH-type transcriptional regulator AdhR	20	-	lmo0083	
iolS	Present in ALL except 03EB120LM	Aldo-keto reductase IolS	20	-	lmo0084	
group_1226	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo0085	**Deletion 1**
group_1306	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo0086	
group_25	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo0087	
atpE_2	Present in ALL except 03EB120LM	ATP synthase subunit c	20	-	lmo0088	
atpD_2	Present in ALL except 03EB120LM	ATP synthase subunit delta	20	-	lmo0089	
atpA_2	Present in ALL except 03EB120LM	ATP synthase subunit alpha	20	-	lmo0090	
atpG_2	Present in ALL except 03EB120LM	ATP synthase gamma chain sodium ion specific	20	-	lmo0091	**Deletion 2**
atpD_2;atpD_3	Present in ALL except 03EB120LM	ATP synthase subunit beta;ATP synthase subunit beta sodium ion specific	20	-	lmo0092	
atpC_2	Present in ALL except 03EB120LM	ATP synthase epsilon chain	20	-	lmo0093	
group_522	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	**lmo0094**	
folK	Present in ALL except 03EB120LM	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine pyrophosphokinase	20	-	lmo0226	
dusB	Present in ALL except 03EB120LM	tRNA-dihydrouridine synthase B	20	-	lmo0227	**Deletion 3**
lysS	Present in ALL except 03EB120LM	Lysine--tRNA ligase	20	-	lmo0228	
group_1424	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo1655	**Deletion 4**
group_689	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo1656	
group_432	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo2767	
group_175	Present in ALL except 03EB120LM	hypothetical protein	20	-	lmo2768	
ytrB_3;btuD_5;ytrB_4	Present in ALL except 03EB120LM	ABC transporter ATP-binding protein YtrB;Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD	20	-	lmo2769	**Deletion 5**
gshAB	**Present in ALL except 03EB120LM**	**Glutathione biosynthesis bifunctional protein GshAB**	**20**	**-**	**lmo2770**	
bglF_3	Present in ALL except 03EB120LM	PTS system beta-glucoside-specific EIIBCA component	20	-	lmo2772	
licT_2	Present in ALL except 03EB120LM	Transcription antiterminator LicT	20	-	lmo2773	

Table 3A. SNIPPY Analysis between V3 (17SEL106LM) and 15 CC9-WT.

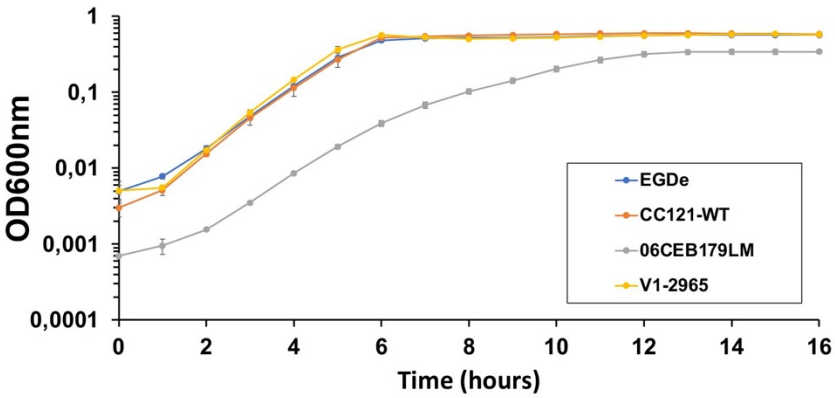
POSITION	TYPE	REF (aa)	VAR (aa)	FTYPE	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	LOCUS_TAG	GENE	PRODUCT
1820324	snp	A	G	CDS	+	1030/1644	344/547	missense_variant c.1030A>G p.Arg344Gly	lmo1915	maeA	putative NAD-dependent malic enzyme 2
2558818	snp	C	T	CDS	-	119/465	40/154	missense_variant c.119G>A p.Gly40Asp	lmo2667	mtlF	Mannitol-specific phosphotransferase enzyme IIA component
1752119	snp	T	A	CDS	-	1261/1284	421/427	missense_variant c.1261A>T p.Met421Leu	lmo1845	pbuO_1	Guanine/hypoxanthine permease PbuO
2328223	snp	A	C	CDS	-	215/858	72/285	missense_variant c.215T>G p.Leu72Arg	lmo2436	licT_1	Transcription antiterminator LicT
1058326	snp	A	G	CDS	+	2203/2358	735/785	missense_variant c.2203A>G p.Arg735Gly	lmo1232	mutS2	Endonuclease MutS2
1855683	snp	A	G	CDS	-	227/735	76/244	missense_variant c.227T>C p.Ile76Thr	lmo1949	rluB	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B
1443841	snp	C	T	CDS	-	235/822	79/273	missense_variant c.235G>A p.Glu79Lys	lmo1564	mutM	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
2088566	snp	A	G	CDS	-	299/1074	100/357	missense_variant c.299T>C p.Phe100Ser	lmo2174	pleD	Response regulator PleD
1037296	snp	G	A	CDS	+	331/1080	111/359	missense_variant c.331G>A p.Ala111Thr	lmo1217	ysdC_2	Putative aminopeptidase YsdC
654699	snp	T	C	CDS	-	380/471	127/156	missense_variant c.380A>G p.Lys127Arg	lmo0804	NA	hypothetical protein
2403590	snp	G	A	CDS	-	38/1449	13/482	missense_variant c.38C>T p.Thr13Ile	lmo2503	clsA_1	Major cardiolipin synthase ClsA
315918	snp	A	G	CDS	+	419/1551	140/516	missense_variant c.419A>G p.Asn140Ser	lmo0458	apc1	Acetophenone carboxylase alpha subunit
60014	snp	C	T	CDS	+	533/786	178/261	missense_variant c.533C>T p.Ser178Leu	lmo0224	folP	Dihydropteroate synthase
2855563	snp	G	A	CDS	+	536/957	179/318	missense_variant c.536G>A p.Arg179Gln	lmo0078	NA	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase
2051013	snp	C	T	CDS	-	5/855	2/284	missense_variant c.5G>A p.Cys2Tyr	lmo2134	gatY_3	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY
1507491	snp	T	C	CDS	+	638/831	213/276	missense_variant c.638T>C p.Met213Thr	lmo1622	nnrD	ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase
991276	snp	A	G	CDS	+	696/1410	232/469	missense_variant c.696A>G p.Ile232Met	lmo1165	sucD	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating)
2938541	snp	T	C	CDS	+	737/774	246/257	missense_variant c.737T>C p.Leu246Pro	-	NA	hypothetical protein
2378280	snp	T	C	CDS	-	928/1476	310/491	missense_variant c.928A>G p.Thr310Ala	lmo2479	NA	hypothetical protein
1918962	snp	A	C	CDS	-	944/1305	315/434	missense_variant c.944T>G p.Phe315Cys	lmo2013	NA	hypothetical protein
1945171	snp	A	G	CDS	-	956/1281	319/426	missense_variant c.956T>C p.Leu319Pro	lmo2033	ftsA	Cell division protein FtsA
1853322	ins	T	TCTG	CDS	-	853/1788	285/595	conservative_inframe_insertion c.851_853dupCAG p.Pro284_Glu285insAla	lmo1947	resE_2	Sensor histidine kinase ResE
1378787	snp	A	C	CDS	-	1141/1143	381/380	**stop_lost&splice_region_variant c.1141T>G p.Ter381Gluext*?**	lmo1506	NA	hypothetical protein
297312	snp	T	G	CDS	+	1888/1890	630/629	**stop_lost&splice_region_variant c.1888T>G p.Ter630Gluext*?**	lmo0444	yueB_1	ESX secretion system protein YueB

Table 3B. SNIPPY Analysis between V4 (14SEL860LM) 15 CC9-WT.

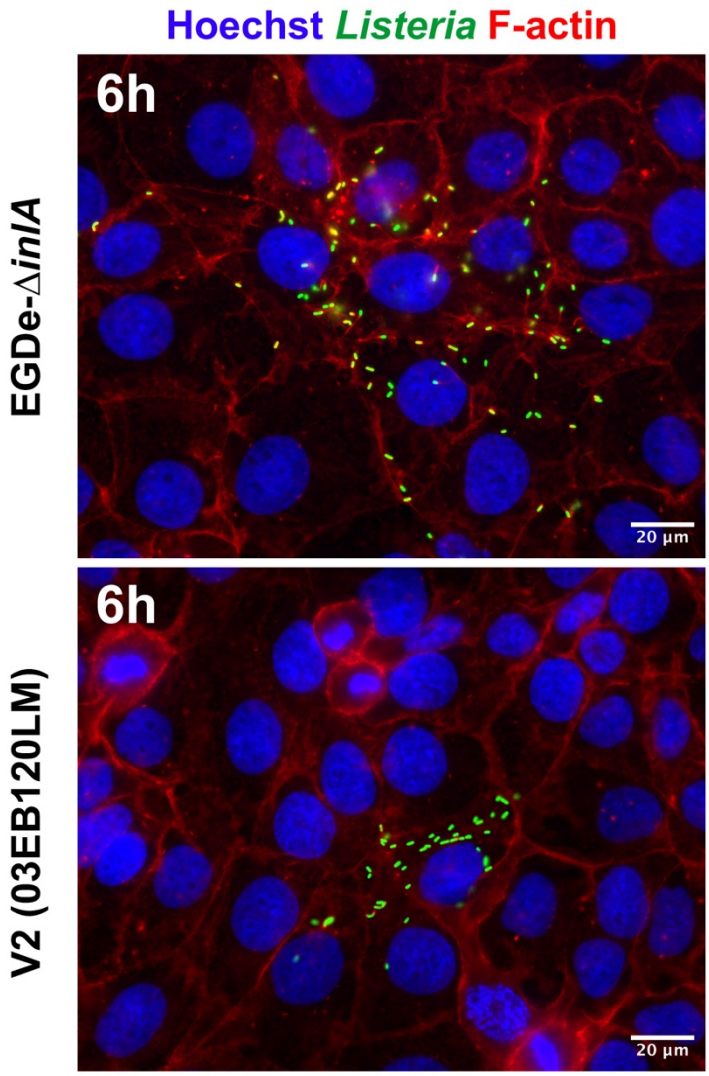
POSITION	TYPE	REF (aa)	VAR (aa)	FTYPE	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	LOCUS_TAG	GENE	PRODUCT
1820324	snp	A	G	CDS	+	1030/1644	344/547	missense_variant c.1030A>G p.Arg344Gly	lmo1915	maeA	putative NAD-dependent malic enzyme 2
1657431	snp	G	A	CDS	-	1136/1362	379/453	missense_variant c.1136C>T p.Ala379Val	lmo1751	rlmCD_2	23S rRNA (uracil-C(5))-methyltransferase RlmCD
2520869	snp	C	T	CDS	-	119/465	40/154	missense_variant c.119G>A p.Gly40Asp	lmo2667	mtlF	Mannitol-specific phosphotransferase enzyme IIA component
1752139	snp	T	A	CDS	-	1261/1284	421/427	missense_variant c.1261A>T p.Met421Leu	lmo1845	pbuO_1	Guanine/hypoxanthine permease PbuO
346690	snp	T	C	CDS	+	1405/1995	469/664	missense_variant c.1405T>C p.Ser469Pro	lmo0489	NA	NADH oxidase
1855706	snp	A	G	CDS	-	227/735	76/244	missense_variant c.227T>C p.Ile76Thr	lmo1949	rluB	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B
2420313	snp	A	C	CDS	+	239/2754	80/917	missense_variant c.239A>C p.Lys80Thr	lmo2558	inlB_5	Internalin B precursor
538301	snp	T	G	CDS	+	285/1224	95/407	missense_variant c.285T>G p.Ile95Met	lmo0681	flhF	Flagellar biosynthesis protein FlhF
2296308	snp	G	A	CDS	-	2897/3936	966/1311	missense_variant c.2897C>T p.Pro966Leu	lmo2444	yicI_3	Alpha-xylosidase
1209874	snp	T	C	CDS	+	292/1092	98/363	missense_variant c.292T>C p.Ser98Pro	lmo1340	NA	hypothetical protein
1380155	snp	A	C	CDS	+	317/687	106/228	missense_variant c.317A>C p.Asn106Thr	lmo1507	srrA_1	Transcriptional regulatory protein SrrA
61265	snp	C	T	CDS	+	533/786	178/261	missense_variant c.533C>T p.Ser178Leu	lmo0224	folP	Dihydropteroate synthase
2817613	snp	G	A	CDS	+	536/957	179/318	missense_variant c.536G>A p.Arg179Gln	lmo0078	NA	Putative 2-hydroxyacid dehydrogenase
2467255	snp	T	G	CDS	-	596/867	199/288	missense_variant c.596A>C p.Lys199Thr	lmo2600	ecfA2	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA2
394531	snp	T	C	CDS	-	607/969	203/322	missense_variant c.607A>G p.Lys203Glu	lmo0535	ccpB_1	Catabolite control protein B
2713472	snp	A	G	CDS	-	641/795	214/264	missense_variant c.641T>C p.Leu214Pro	lmo2835	NA	D-tagatose 3-epimerase
2566231	snp	T	C	CDS	+	658/840	220/279	missense_variant c.658T>C p.Tyr220His	lmo2699	yidA_3	Sugar phosphatase YidA
1030619	snp	A	G	CDS	+	757/1536	253/511	missense_variant c.757A>G p.Asn253Asp	lmo1208	cobQ	Cobyric acid synthase
2877885	snp	T	G	CDS	+	767/1305	256/434	missense_variant c.767T>G p.Val256Gly	lmo0140	NA	Ribonuclease
76083	snp	A	C	CDS	+	79/1374	27/457	missense_variant c.79A>C p.Thr27Pro	lmo0233	NA	hypothetical protein
1945194	snp	A	G	CDS	-	956/1281	319/426	missense_variant c.956T>C p.Leu319Pro	lmo2033	ftsA	Cell division protein FtsA
750574	ins	A	AG	CDS	+	197/249	66/82	frameshift_variant c.196dupG p.Glu66fs	lmo0893	rsbV	Anti-sigma-B factor antagonist
2640995	ins	C	CA	CDS	-	344/357	115/118	frameshift_variant c.344dupT p.Leu115fs	lmo2769	ytrB_4	ABC transporter ATP-binding protein YtrB
297390	snp	T	G	CDS	+	1888/1890	630/629	**stop_lost&splice_region_variant c.1888T>G p.Ter630Gluext*?**	lmo0444	NA	chromosome segregation protein

Table 3C. Common genes between V3 (17SEL106LM) and V4 (14SEL860LM) from SNIPPY Analysis.

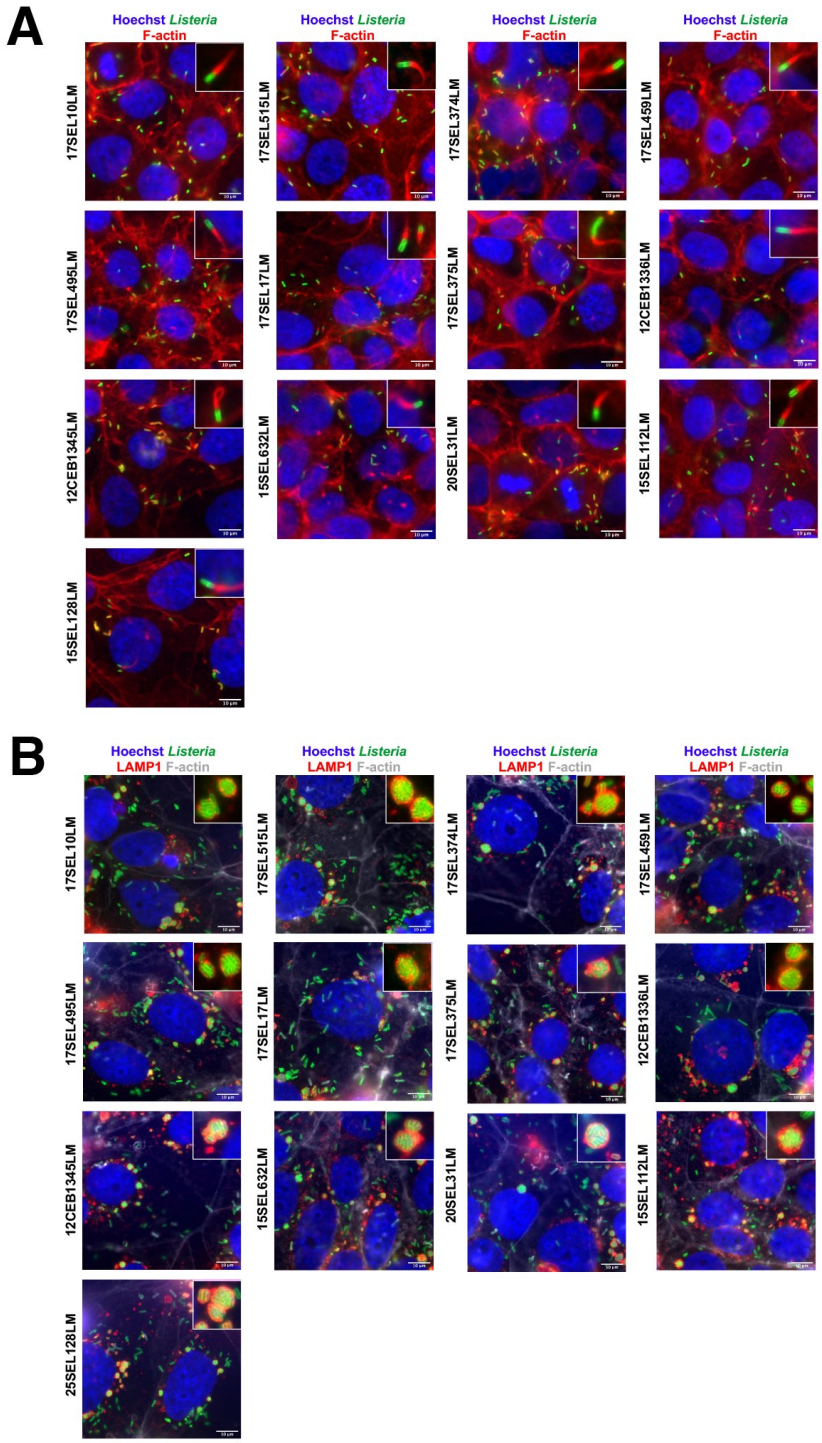
POSITION	TYPE	REF (a:	VAR (aa)	FTYPE	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	LOCUS_TAG	GENE	PRODUCT
61265	snp	C	T	CDS	+	533/786	178/261	missense_variant c.533C>T p.Ser178Leu	lmo0224	folP	Dihydropteroate synthase
1752139	snp	T	A	CDS	-	1261/1284	421/427	missense_variant c.1261A>T p.Met421Leu	lmo1845	pbuO_1	Guanine/hypoxanthine permease PbuO
1820324	snp	A	G	CDS	+	1030/1644	344/547	missense_variant c.1030A>G p.Arg344Gly	lmo1915	maeA	putative NAD-dependent malic enzyme 2
1945194	snp	A	G	CDS	-	956/1281	319/426	missense_variant c.956T>C p.Leu319Pro	lmo2033	ftsA	Cell division protein FtsA
2520869	snp	C	T	CDS	-	119/465	40/154	missense_variant c.119G>A p.Gly40Asp	lmo2667	mtlF	Mannitol-specific phosphotransferase enzyme IIA component
297390	snp	T	G	CDS	+	1888/1890	630/629	**stop_lost&splice_region_variant c.1888T>G p.Ter630Gluext*?**	lmo0444	NA	chromosome segregation protein



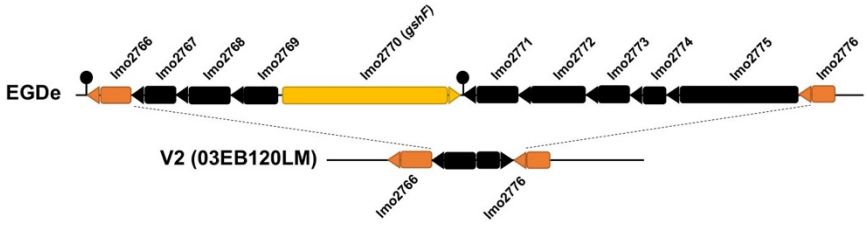
Supplementary Figure 1. Growth curves of 06CEB179LM and V1 (2965) variants. Growth curves of 06CEB179LM and V1 (2965) strains were compared with reference strains EGD-e and CC121-WT (17SEL410LM). The scale is in $Log_{10}(OD_{600nm})$ versus time (hours).



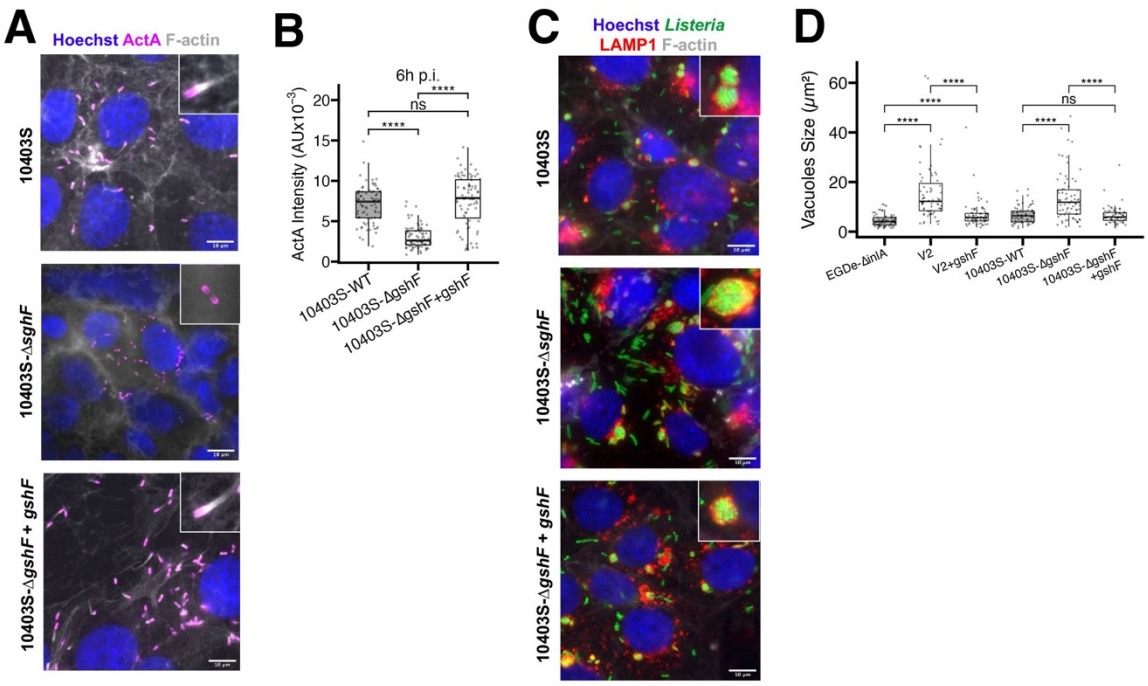
Supplementary Figure 2. V2 remains confined to the first infected cell after 6 h of infection. High magnification micrographs of JEG-3 cells infected for 6 h with EGDe-Δ*inlA* (high panel) and V2 (03EB120LM, low panel). Images are overlays of Hoechst (blue), *Listeria* (green) and F-actin (red) signals. Bars: 20 µm.



Supplementary Figure 3. 13 CC9 InlA-Δ strains that behave like the wild type strain in actin polymerization (6 h p.i.) and in LisCVs formation (72 h p.i.) were used for comparative genomic analyses. A. Micrographs of JEG-3 cells infected for 6 h with the indicated strains. Images are overlay of intracellular bacteria (green) and F-actin (Phalloidin, red). Bars: 10µm. A representative bacterium forming actin comets is shown at a higher magnification in the upper right corner. **B.** Micrographs of JEG-3 cells infected for 72 h with the indicated strain. Images are overlays of Hoechst (blue), *Listeria* (green), LAMP1 (red) and F-actin (white) signals. Bars: 10µm. Insets show representative LisCVs.



Supplementary Figure 4. Schematic representation of the *lmo2766-lmo2776* region, including the *gshF* gene of V2 (03EB120LM) compared with EGD-e wild type strain.



Supplementary Figure 5. The 10403S-Δ*gshF* deletion mutant has a "hyper-persistent" phenotype similar to V2. A. Cell-to-cell spread and ActA immunostaining of 10403S, 10403S-Δ*gshF* and 10403S-Δ*gshF*+*gshF* strains in JEG-3 cells after 6 h of infection at high magnification. Micrographs show cells (nucleus in blue), ActA (pink) and F-actin (Phalloidin, white). Bars: 10µm. A representative bacterium forming actin comets is shown at a higher magnification in the upper right corner. **B.** Micrographs of *Listeria* (green) 10403S, 10403S-Δ*gshF* and 10403S-Δ*gshF*+*gshF* during the infection process at 72 h p.i. in JEG-3 cells. Images are overlay of *Listeria*, Hoechst (blue), LAMP1 (red) and F-actin (Phalloidin, white). Bars: 10 µm**. C.** Average ActA fluorescence intensity at the surface of bacteria for 10403S-WT, 10403S-Δ*gshF* and 10403S-Δ*gshF*+*gshF* at 72 h p.i. Each group consists in the measure of the average ActA fluorescence intensity of 80 bacteria (represented by dots) from two independent experiments. **D.** LisCVs size measured in surface unit (µm²) at 72 h p.i. for EGDe-Δ*inlA*, V2, V2+*gshF*, 10403S-WT, 10403S-Δ*gshF* and 10403S-Δ*gshF*+*gshF*. Each group consists in the measure of the area of 75 vacuoles (represented by dots) from a single experiment.

Supplementary Table 1. Characteristics of isolates used in the first screen.

Lineage	Strain	CC	Source	Origin			
Lineage I	F2365	CC1	Human clinic	ANSES			
	LMNC411	CC1	Animal clinic	A. Oevermann			
	05CEB711LM	CC1	Food	ANSES			
	AF40	CC1	Food	ANSES			
	LMNC329	CC1	Environmental farm	A. Oevermann			
	10CEB63LM	CC2	Food	ANSES			
	10CEB605LM	CC2	Food	ANSES			
	CLIP74912	CC2	Animal environment /ref strain for serovar	ANSES			
	CLIP80459	CC4	Human clinic	ANSES			
	CLIP63713	CC4	Human clinic	Jonquières et al.,1998			
	JF4907	CC4	Animal clinic	A. Oevermann			
	LMNC420	CC4	Animal clinic	A. Oevermann			
	09CEB160LM	CC4	Food	ANSES			
	LMNC274	CC4	Animal environment	A. Oevermann			
	08CEB08LM	CC4	FPE	ANSES			
	LMNC096	CC6	Animal clinic	A. Oevermann			
	09CEB30LM	CC6	Food	ANSES			
	LMNC278	CC6	Environmental farm	A. Oevermann			
	LMNC358	CC6	Environmental farm	A. Oevermann			
	03EB237LM	CC3	Food	ANSES			
	10CEB88LM	CC3	Food	ANSES			
	Lm15-023	CC3	Food	CSIRO			
	Lm16-011	CC3	Food	CSIRO			
	07CEB394LM	CC5	Food	ANSES			
	08CEB178LM	CC5	Food	ANSES			
	6KSM	CC5	FPE	CSIRO			
	06CEB103LM	CC191	Food	ANSES			
	09CEB370LM	CC54	Food	ANSES			
	DPC6895	CC59	Animal clinic	CSIRO			
	Lm16-037	CC59	Food	CSIRO			
	Lm16-036	CC202	Food	CSIRO			
	05CEB573LM	CC220	Food	ANSES	***inlA*_Nuc (pb)**	**InlA-truncation (aa)**	**InlA (aa)**
Lineage II	10403S	CC7	Human clinic/laboratory strain	Bishop and Hinrichs, 1987			
	EGDe	CC9	laboratory strain	Glaser 2001	2403	Full length	800
	LO28	CC9	laboratory strain	Vincente et al.,1985	1731	S577*	576
	03EB210LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684
	05CEB480LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684
	UCDL011	CC9	Food	CSIRO	978	E326*	325
	UCDL016	CC9	Food	CSIRO	978	E326*	325
	CLIP74907	CC9	Animal environment /ref strain for serovar	ANSES	?	?	?
	07CEB914LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491
	08CEB61LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491
	4233	CC121	Food	CSIRO	1476	Q492*	491
	6179	CC121	Food	CSIRO	1476	Q492*	491
	17SEL410LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491
	2965	CC121	Food	CSIRO	1476	Q492*	491
	2989	CC31	Food	CSIRO			
	06CEB179LM	CC193	Food	ANSES			
	07CEB349LM	CC155	Food	ANSES			
	08CEB181LM	CC155	Food	ANSES			
	Lm15-005	CC155	Food	CSIRO			
	2963	CC31	Food	CSIRO			
	LMNC244	CC14	Environmental farm	A. Oevermann			
	LMNC340	CC14	Environmental farm	A. Oevermann			
	09CEB582LM	CC18	FPE	ANSES			
	LMNC314	CC18	Environmental farm	A. Oevermann			
	LMNC078	CC18	Animal clinic	A. Oevermann			
	JF5336	CC18	Animal clinic	A. Oevermann			
	Lm16-019	CC204	Food	CSIRO			
	Lm15-011	CC204	Food	CSIRO			
	LMNC264	CC37	Environmental farm	A. Oevermann			
	LMNC317	CC37	Environmental farm	A. Oevermann			
	LMNC236	CC37	Environmental farm	A. Oevermann			
	JF4913	CC412	Animal clinic	A. Oevermann			
	JF5590	CC412	Environmental farm	A. Oevermann			
	LMNC051	CC412	Animal clinic	A. Oevermann			
	LMNC083	CC8	Animal clinic	A. Oevermann			
	JF5172	CC8	Animal clinic	A. Oevermann			
	10CEB335LM	CC8	Food	ANSES			
	11CEB391LM	CC8	Food	ANSES			
	1976	CC8	FPE	CSIRO			

Supplementary Table 2. Characteristics of InlA-Δ isolates used in the second screen.

Lineage	Strain	CC	Source	Origin	*inlA* _Nuc (pb)	InlA-truncation (aa)	InlA (aa)	GenBankAccession	ReadsAccession	Bioproject	Depthcoverage	N50	Référence
Lineage II	EGDe	CC9	Reference strain	Glaser et al.,2001	2403	Full length	800	NC_003210,1	-		-	-	Glaser et al., 2001
	LO28	CC9	Healthy human feces	Vincente et al., 1985	1731	S577*	576	-	-		-	-	Vincente et al., 1985
	EGDe-Δ*inlA*	CC9	Reference strain inlA-deletion mutant	-	-	-	-	NZ_CP061814.1	-		-	-	This Study
	17SEL410LM	CC121	FPE	ANSES	1476	Q492*	491	-	-	N/A	141.8238	3027123	-
	17SEL46LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284443	PRJEB38828	121.7430	3150408	Félix et al., 2022
	17SEL520LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284415	PRJEB38828	299.9544	3033852	Félix et al., 2022
	17SEL377LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284472	PRJEB38828	315.6093	3005254	Félix et al., 2022
	17SEL464LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284453	PRJEB38828	98.7846	3105919	Félix et al., 2022
	17SEL62LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284564	PRJEB38828	58.0130	3092697	Félix et al., 2022
	17SEL104LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284466	PRJEB38828	324.2419	3059959	Félix et al., 2022
	17SEL58LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	-	N/A	47.5554	2963529	-
	17SEL516LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284462	PRJEB38828	139.9697	2952366	Félix et al., 2022
	17SEL434LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	ERR4284365	PRJEB38828	375.1405	2932719	Félix et al., 2022
	CFS005	CC121	Environmental	CSIRO	1476	Q492*	491	-	SRR6457840	PRJNA422580	66.8108	3026078	-
	2965	CC121	Food	CSIRO	1476	Q492*	491	-	-	N/A	143.9952	2995396	-
	2985	CC121	Food	CSIRO	1476	Q492*	491	-	-	PRJNA422580	236.2935	3035496	-
	15SEL1647LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	-	N/A	343.1281	3093410	-
	15SEL1661LM	CC121	Food	ANSES	1476	Q492*	491	-	SRR6457840	PRJNA422580	66.8108	3026078	-
	17SEL10LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	ERR4284499	PRJEB38828	201.0394	2950568	Félix et al., 2022
	17SEL515LM	CC9	Food	ANSES	978	E326*	325	-	ERR4284452	PRJEB38828	159.6808	2958508	Félix et al., 2022
	17SEL374LM	CC9	Food	ANSES	978	E326*	325	-	ERR4284470	PRJEB38828	167.5690	2963456	Félix et al., 2022
	17SEL459LM	CC9	Food	ANSES	1617	Q539*	538	-	ERR4284479	PRJEB38828	126.4726	2946639	Félix et al., 2022
	17SEL495LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684	-	-	N/A	213.0176	2949093	-
	17SEL17LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684	-	ERR4284471	PRJEB38828	226.5432	2961357	Félix et al., 2022
	17SEL106LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684	-	ERR4284477	PRJEB38828	114.3636	2945188	Félix et al., 2022
	17SEL375LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684	-	ERR4284469	PRJEB38828	303.0120	2958485	Félix et al., 2022
	CFS012	CC9	Food	CSIRO	1731	S577*	576	-	SRR6457815	PRJNA422580	108.4848	2983002	-
	CFS014	CC9	Food	CSIRO	1731	S577*	576	-	SRR6457813	PRJNA422580	86.8015	2955332	-
	CFS034	CC9	Food	CSIRO	2055	W685*	684	-	SRR6457828	PRJNA422580	67.6019	3001256	-
	2932	CC9	Food	CSIRO	2055	W685*	684	-	-	N/A	101.9254	3005290	Casey et al., 2016
	15SEL632LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	SRR7440928	PRJNA475189	123.2286	2928424	Nielsen et al., 2017 ; Pains et al., 2019
	12CEB1336LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	SRR7440550	PRJNA475189	66.9244	2910539	Nielsen et al., 2017 ; Pains et al., 2019
	12CEB1345LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	SRR7441006	PRJNA475189	140.1393	2840275	Nielsen et al., 2017 ; Pains et al., 2019
	20SEL31LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	-	N/A	302.3834	2928109	-
	03EB120LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	ERR1738665	PRJEB38828	72.2271	2894176	Félix et al., 2022
	15SEL112LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	SRR7440876	PRJNA475189	71.9989	2950523	Nielsen et al., 2017 ; Pains et al., 2019
	15SEL128LM	CC9	Food	ANSES	1731	S577*	576	-	SRR7440664	PRJNA475189	144.3181	2944367	Nielsen et al., 2017 ; Pains et al., 2019
	14SEL860LM	CC9	Food	ANSES	2055	W685*	684	-	ERR2728045	PRJEB38828	326.7772	2907238	Félix et al., 2022

Supplementary Table 3. Comparison of the LIPI-1 virulence locus between EGD-e strain, V2, V3 and V4 (03EB120LM, 17SEL106LM and 14SEL860LM).

Genome	LOCI	CC	*prfA*	PrfA	*plcA*	PlcA	*hly*	LLO	*mpl*	Mpl	*actA*	ActA	*plcB*	PlcB
EGD-e	57	CC9	prfA_16°	237	plcA_1	317	hly_1	530	mpl_1	510	actA_1	640	plcB_1	289
V2 (03EB120LM)	57	CC9	prfA_16°	237	plcA_1	317	hly_1	530	mpl_1	510	actA_1	640	plcB_1	289
V3 (17SEL106LM)	57	CC9	prfA_16°	237	plcA_1	317	hly_1	530	mpl_1	510	**actA_1°**	**605**	plcB_1	289
V4 (14SEL860LM)	57	CC9	prfA_16°	237	plcA_1	317	hly_1	530	mpl_1	510	actA_1	640	plcB_1	289

Supplementary Table 4. Phylogenetic tree of 222 CC9 strains, based on publicly available genomes, including 20 CC9 strains from screen 2.

SAMPLE	ORIGIN	BIOSAMPLE	BIOPROJECT	READ	ST	CC
2932	Food Processing Environment	N/A	N/A	N/A	9	CC9
03EB120LM	Food	SAMEA4475763	PRJEB38828	ERR1738665	9	CC9
08CEB172LM	Food	SAMEA4475825	PRJEB38828	ERR1738725	9	CC9
09CEB866LM	Food	SAMEA4475875	PRJEB38828	ERR1738659	9	CC9
11CEB418LM	Food	SAMEA4475910	PRJEB38828	ERR1738787	9	CC9
11CEB445LM	Food	SAMEA4475912	PRJEB38828	ERR1738789	9	CC9
14SEL860LM	Food	SAMEA4819883	PRJEB38828	ERR2728045	9	CC9
15SEL904LM	Food	SAMEA7006581	PRJEB38828	ERS4774410	9	CC9
16SEL1222LM	Food	SAMEA7006597	PRJEB38828	ERS4774426	9	CC9
17SEL106LM	Food	SAMEA7006629	PRJEB38828	ERS4774458	9	CC9
17SEL10LM	Food	SAMEA7006651	PRJEB38828	ERS4774480	9	CC9
17SEL17LM	Food	SAMEA7006623	PRJEB38828	ERS4774452	9	CC9
17SEL374LM	Food	SAMEA7006622	PRJEB38828	ERS4774451	9	CC9
17SEL375LM	Food	SAMEA7006621	PRJEB38828	ERS4774450	622	CC9
17SEL413LM	Food	SAMEA7006648	PRJEB38828	ERS4774477	9	CC9
17SEL450LM	Food	SAMEA7006616	PRJEB38828	ERS4774445	9	CC9
17SEL458LM	Food	SAMEA7006632	PRJEB38828	ERS4774461	9	CC9
17SEL459LM	Food	SAMEA7006631	PRJEB38828	ERS4774460	9	CC9
17SEL494LM	Food	SAMEA7006484	PRJEB38828	ERS4774313	580	CC9
17SEL495LM	Food	N/A	N/A	N/A	580	CC9
17SEL515LM	Food	SAMEA7006604	PRJEB38828	ERS4774433	9	CC9
18SEL257LM	Food	SAMEA7006566	PRJEB38828	ERS4774395	9	CC9
18SEL261LM	Food	SAMEA7006644	PRJEB38828	ERS4774473	9	CC9
18SEL264LM	Food	SAMEA7006564	PRJEB38828	ERS4774393	9	CC9
18SEL429LM	Food	SAMEA7006626	PRJEB38828	ERS4774455	9	CC9
18SEL65LM	Food	SAMEA7006662	PRJEB38828	ERS4774491	9	CC9
18SEL987LM	Food	SAMEA7006603	PRJEB38828	ERS4774432	9	CC9
19SEL849LM	Food	SAMEA7006611	PRJEB38828	ERS4774440	9	CC9
19SEL851LM	Food	SAMEA7006635	PRJEB38828	ERS4774464	9	CC9
19SEL867LM	Food	SAMEA7006634	PRJEB38828	ERS4774463	9	CC9
20SEL17LM	Food	SAMEA7006701	PRJEB38828	ERS4774530	9	CC9
20SEL30LM	Food	SAMEA7006471	PRJEB38828	ERS4774300	9	CC9
20SEL31LM	Food	N/A	N/A	N/A	9	CC9
24NA14SEL1540LM	Food	SAMEA7006488	PRJEB38828	ERS4774317	9	CC9
AT-CO-M-UN-227	Food	SAMEA7005835	PRJEB38828	ERS4773665	9	CC9
AT-FI-F-FF-242	Food	SAMEA7005858	PRJEB38828	ERS4773688	9	CC9
AT-FI-F-SM-238	Food	SAMEA7005867	PRJEB38828	ERS4773697	9	CC9
AT-ME-P-DE-247	Food	SAMEA7005873	PRJEB38828	ERS4773703	9	CC9
AT-ME-P-DE-248	Food	SAMEA7005874	PRJEB38828	ERS4773704	9	CC9
AT-ME-P-DE-261	Food	SAMEA7005875	PRJEB38828	ERS4773705	9	CC9
AT-ME-U-DE-244	Food	SAMEA7005877	PRJEB38828	ERS4773707	9	CC9
BE_BOV_SK_H_95	Animal	SAMEA7006002	PRJEB38828	ERS4773832	9	CC9
CFS012	Food	SAMN08341394	PRJNA422580	SRR6457815	9	CC9
CFS013	Food	SAMN08341395	PRJNA422580	SRR6457814	9	CC9
CFS014	Food	SAMN08341396	PRJNA422580	SRR6457813	9	CC9
CFS034	Food	SAMN08341415	PRJNA422580	SRR6457828	9	CC9
CFS037	Food	SAMN08341418	PRJNA422580	SRR6457821	9	CC9
CFS038	Food processing environment	SAMN08341419	PRJNA422580	SRR6457824	9	CC9
CFS049	Food processing environment	SAMN08341429	PRJNA422580	SRR6457861	9	CC9
CFS050	Food processing environment	SAMN08341430	PRJNA422580	SRR6457862	9	CC9
CFS051	Food	SAMN08341431	PRJNA422580	SRR6457867	9	CC9
CFS055	Food processing environment	SAMN08341435	PRJNA422580	SRR6457852	9	CC9
CFS056	Food processing environment	SAMN08341436	PRJNA422580	SRR6457851	9	CC9
CFS060	Food processing environment	SAMN08341440	PRJNA422580	SRR6457855	9	CC9
CFS062	Food processing environment	SAMN08341442	PRJNA422580	SRR6457849	9	CC9
CFS075	Food processing environment	SAMN08341454	PRJNA422580	SRR6457869	9	CC9
CFS090	Food	SAMN08341467	PRJNA422580	SRR6457805	9	CC9
CFS103	Food	SAMN08341480	PRJNA422580	SRR6457781	9	CC9
CFS104	Food	SAMN08341481	PRJNA422580	SRR6457780	9	CC9
CZ_ME_U_UN_141	Food	SAMEA7006078	PRJEB38828	ERS4773908	9	CC9
CZ_ME_U_UN_150	Food	SAMEA7006087	PRJEB38828	ERS4773917	9	CC9
CZ-ME-U-UN-130	Food	SAMEA7006072	PRJEB38828	ERS4773902	9	CC9
CZ-OVI-UN-2	Animal	SAMEA7006128	PRJEB38828	ERS4773958	9	CC9
DN_CO_M_68	Food	SAMEA7006201	PRJEB38828	ERS4774030	9	CC9
DN_CO_M_73	Food	SAMEA7006203	PRJEB38828	ERS4774032	9	CC9
DN_ME_B_PM_16	Food	SAMEA7006221	PRJEB38828	ERS4774050	9	CC9
DN_ME_B_PM_20	Food	SAMEA7006222	PRJEB38828	ERS4774051	580	CC9
DN_ME_B_PM_21	Food	SAMEA7006223	PRJEB38828	ERS4774052	9	CC9
DN_ME_B_PM_7	Food	SAMEA7006226	PRJEB38828	ERS4774055	9	CC9
DN_ME_P_DE_13	Food	SAMEA7006228	PRJEB38828	ERS4774057	9	CC9
DN_ME_P_DE_15	Food	SAMEA7006230	PRJEB38828	ERS4774059	9	CC9
DN_ME_UN_DE_2	Food	SAMEA7006248	PRJEB38828	ERS4774077	9	CC9
FI-BIR-FE-U-27	Animal	SAMEA7006352	PRJEB38828	ERS4774181	9	CC9
FI-BIR-FE-U-38	Animal	SAMEA7007313	PRJEB38828	ERS4775141	9	CC9

FI-BIR-FE-U-39	Animal	SAMEA7006362	PRJEB38828	ERS4774191	9	CC9
FI-BIR-FE-U-50	Animal	SAMEA7007315	PRJEB38828	ERS4775143	9	CC9
FR_FAR_CF_1	Soil & farm environment	SAMEA7006552	PRJEB38828	ERS4774381	2818	CC9
FR-NAT-SO-4	Soil & farm environment	SAMEA7007317	PRJEB38828	ERS4775145	2818	CC9
FR-NAT-WA-1	Soil & farm environment	SAMEA7006695	PRJEB38828	ERS4774524	2818	CC9
FR-NAT-WA-2	Soil & farm environment	SAMEA7006696	PRJEB38828	ERS4774525	2818	CC9
IT_PE_CO_U_173	Food	SAMEA7006940	PRJEB38828	ERS4774768	9	CC9
IT-CO-U-UN-138	Food	SAMEA7006767	PRJEB38828	ERS4774596	9	CC9
IT-CO-U-UN-153	Food	SAMEA7006772	PRJEB38828	ERS4774601	9	CC9
IT-CO-U-UN-156	Food	SAMEA7006774	PRJEB38828	ERS4774603	9	CC9
IT-DEE-FE-64	Animal	SAMEA7006801	PRJEB38828	ERS4774630	9	CC9
IT-FI-F-UN-225	Food	SAMEA7006817	PRJEB38828	ERS4774646	9	CC9
IT-FI-F-UN-230	Food	SAMEA7006821	PRJEB38828	ERS4774650	9	CC9
IT-FI-F-UN-237	Food	SAMEA7006827	PRJEB38828	ERS4774656	9	CC9
IT-ME-B-PM-274	Food	SAMEA7006854	PRJEB38828	ERS4774683	9	CC9
IT-ME-B-RA-283	Food	SAMEA7006860	PRJEB38828	ERS4774689	9	CC9
IT-ME-P-DE-256	Food	SAMEA7006865	PRJEB38828	ERS4774694	9	CC9
IT-ME-P-DE-257	Food	SAMEA7006866	PRJEB38828	ERS4774695	9	CC9
IT-ME-P-DE-264	Food	SAMEA7006869	PRJEB38828	ERS4774698	9	CC9
IT-ME-P-DE-266	Food	SAMEA7006871	PRJEB38828	ERS4774700	9	CC9
IT-ME-P-DE-268	Food	SAMEA7006873	PRJEB38828	ERS4774702	9	CC9
IT-ME-P-DE-272	Food	SAMEA7006876	PRJEB38828	ERS4774705	9	CC9
IT-ME-P-DE-273	Food	SAMEA7006877	PRJEB38828	ERS4774706	9	CC9
IT-ME-P-DE-280	Food	SAMEA7006879	PRJEB38828	ERS4774708	9	CC9
IT-ME-P-DE-282	Food	SAMEA7006880	PRJEB38828	ERS4774709	9	CC9
IT-ME-P-DE-284	Food	SAMEA7006881	PRJEB38828	ERS4774710	9	CC9
IT-ME-P-RA-281	Food	SAMEA7006891	PRJEB38828	ERS4774720	9	CC9
IT-NAT-SO-10	Soil & farm environment	SAMEA7006893	PRJEB38828	ERS4774722	9	CC9
IT-PIG-FE-29	Animal	SAMEA7006962	PRJEB38828	ERS4774790	9	CC9
IT-WBO-FE-28	Animal	SAMEA7006961	PRJEB38828	ERS4774789	9	CC9
LV-GOA-CP-26	Animal	SAMEA7006979	PRJEB38828	ERS4774807	9	CC9
NL-GOA-UN-32	Animal	SAMEA7007006	PRJEB38828	ERS4774834	9	CC9
NO-OTH-O-33	Animal	SAMEA7007053	PRJEB38828	ERS4774881	9	CC9
PL_FAR_CF_2	Soil & farm environment	SAMEA7007309	PRJEB38828	ERS4775137	9	CC9
PL-FAR-CF-1	Soil & farm environment	SAMEA7007059	PRJEB38828	ERS4774887	510	CC9
RL10000011	Food processing environment	SAMN09499896	PRJNA475189	SRR7440956	9	CC9
RL10000072	Food processing environment	SAMN09499961	PRJNA475189	SRR7440806	9	CC9
RL10000073	Food processing environment	SAMN09499962	PRJNA475189	SRR7441155	9	CC9
RL1000010	Food processing environment	SAMN09499989	PRJNA475189	SRR7440979	9	CC9
RL14000008	Food processing environment	SAMN09499991	PRJNA475189	SRR7441223	9	CC9
RL15000012	Food	SAMN09500002	PRJNA475189	SRR7440647	9	CC9
RL15000028	Food	SAMN09500018	PRJNA475189	SRR7441024	9	CC9
RL15000035	Food	SAMN09500025	PRJNA475189	SRR7440716	9	CC9
RL15000039	Food	SAMN09500029	PRJNA475189	SRR7440587	9	CC9
RL15000045	Food	SAMN09500035	PRJNA475189	SRR7440577	9	CC9
RL15000054	Food	SAMN09500044	PRJNA475189	SRR7440816	9	CC9
RL15000068	Food	SAMN09500058	PRJNA475189	SRR7441112	9	CC9
RL15000070	Food	SAMN09500060	PRJNA475189	SRR7441118	9	CC9
RL15000074	Food	SAMN09500064	PRJNA475189	SRR7441121	9	CC9
RL15000077	Food	SAMN09500066	PRJNA475189	SRR7440676	9	CC9
RL15000078	Food	SAMN09500067	PRJNA475189	SRR7440675	9	CC9
RL15000087	Food	SAMN09500076	PRJNA475189	SRR7441125	9	CC9
RL15000107	Food	SAMN09500096	PRJNA475189	SRR7441261	9	CC9
RL15000118	Food	SAMN09500107	PRJNA475189	SRR7440700	9	CC9
RL15000119	Food	SAMN09500108	PRJNA475189	SRR7440701	9	CC9
RL15000124	Food	SAMN09500113	PRJNA475189	SRR7440706	9	CC9
RL15000136	Food	SAMN09500125	PRJNA475189	SRR7440550	9	CC9
RL15000137	Food	SAMN09500126	PRJNA475189	SRR7441004	9	CC9
RL15000138	Food	SAMN09500127	PRJNA475189	SRR7441005	9	CC9
RL15000139	Food	SAMN09500128	PRJNA475189	SRR7441002	9	CC9
RL15000143	Food	SAMN09500132	PRJNA475189	SRR7441006	9	CC9
RL15000146	Food	SAMN09500135	PRJNA475189	SRR7440997	9	CC9
RL15000147	Food	SAMN09500136	PRJNA475189	SRR7440844	9	CC9
RL15000151	Food	SAMN09500140	PRJNA475189	SRR7440848	9	CC9
RL15000155	Food	SAMN09500144	PRJNA475189	SRR7440836	9	CC9
RL15000164	Food	SAMN09500153	PRJNA475189	SRR7440601	9	CC9
RL15000176	Food	SAMN09500165	PRJNA475189	SRR7441151	9	CC9
RL15000183	Food	SAMN09500172	PRJNA475189	SRR7440930	9	CC9
RL15000199	Food	SAMN09500188	PRJNA475189	SRR7441285	9	CC9
RL15000204	Food	SAMN09500193	PRJNA475189	SRR7441290	9	CC9
RL15000205	Food	SAMN09500194	PRJNA475189	SRR7441275	9	CC9
RL15000207	Food	SAMN09500196	PRJNA475189	SRR7441036	9	CC9
RL15000215	Food	SAMN09500204	PRJNA475189	SRR7441039	9	CC9
RL15000222	Food	SAMN09500211	PRJNA475189	SRR7440590	9	CC9

RL15000227	Food	SAMN09500216	PRJNA475189	SRR7440751	9	CC9
RL15000234	Food	SAMN09500223	PRJNA475189	SRR7440750	9	CC9
RL15000278	Food	SAMN09500267	PRJNA475189	SRR7440928	9	CC9
RL15000314	Human	SAMN09487807	PRJNA475189	SRR7429656	9	CC9
RL15000338	Food	SAMN09500302	PRJNA475189	SRR7440964	9	CC9
RL15000345	Food	SAMN09500309	PRJNA475189	SRR7440534	9	CC9
RL15000354	Food	SAMN09500318	PRJNA475189	SRR7440766	9	CC9
RL15000356	Food	SAMN09500320	PRJNA475189	SRR7440814	9	CC9
RL15000357	Food	SAMN09500321	PRJNA475189	SRR7440813	9	CC9
RL15000373	Food	SAMN09500336	PRJNA475189	SRR7440897	9	CC9
RL15000375	Food	SAMN09500338	PRJNA475189	SRR7440902	9	CC9
RL15000408	Food	SAMN09500363	PRJNA475189	SRR7441093	9	CC9
RL15000461	Food	SAMN09500416	PRJNA475189	SRR7441183	9	CC9
RL15000463	Food	SAMN09500418	PRJNA475189	SRR7441181	9	CC9
RL15000464	Food	SAMN09500419	PRJNA475189	SRR7441182	9	CC9
RL15000479	Food	SAMN09500434	PRJNA475189	SRR7440900	9	CC9
RL15000480	Food	SAMN09500435	PRJNA475189	SRR7440898	9	CC9
RL15000487	Food	SAMN09500442	PRJNA475189	SRR7441291	9	CC9
RL15000491	Food	SAMN09500446	PRJNA475189	SRR7440690	9	CC9
RL15000503	Food	SAMN09500458	PRJNA475189	SRR7440797	9	CC9
RL15000508	Food	SAMN09500463	PRJNA475189	SRR7440794	9	CC9
RL15000509	Food	SAMN09500464	PRJNA475189	SRR7440801	9	CC9
RL15000510	Food	SAMN09500465	PRJNA475189	SRR7440802	9	CC9
RL15000513	Food	SAMN09500468	PRJNA475189	SRR7440877	9	CC9
RL15000514	Food	SAMN09500469	PRJNA475189	SRR7440876	9	CC9
RL15000522	Food	SAMN09500477	PRJNA475189	SRR7440668	9	CC9
RL15000523	Food	SAMN09500478	PRJNA475189	SRR7440669	9	CC9
RL15000524	Food	SAMN09500479	PRJNA475189	SRR7440670	9	CC9
RL15000525	Food	SAMN09500480	PRJNA475189	SRR7440671	9	CC9
RL15000528	Food	SAMN09500483	PRJNA475189	SRR7440674	9	CC9
RL15000529	Food	SAMN09500484	PRJNA475189	SRR7440664	9	CC9
RL15000530	Food	SAMN09500485	PRJNA475189	SRR7440665	9	CC9
RL15000531	Food	SAMN09500486	PRJNA475189	SRR7441232	9	CC9
RL15000533	Food	SAMN09500488	PRJNA475189	SRR7441230	9	CC9
RL15000542	Food processing environment	SAMN09500497	PRJNA475189	SRR7440623	9	CC9
RL15000659	Food	SAMN09500539	PRJNA475189	SRR7440663	9	CC9
RL15000662	Food	SAMN09500542	PRJNA475189	SRR7440626	9	CC9
RL15000669	Food	SAMN09500549	PRJNA475189	SRR7440660	9	CC9
RL15000676	Food	SAMN09500556	PRJNA475189	SRR7441172	9	CC9
RL15000677	Food	SAMN09500557	PRJNA475189	SRR7441171	9	CC9
RL15000678	Food	SAMN09500558	PRJNA475189	SRR7441174	9	CC9
RL15000681	Food	SAMN09500561	PRJNA475189	SRR7441175	9	CC9
RL15000701	Food	SAMN09500581	PRJNA475189	SRR7441281	9	CC9
RL15000706	Food	SAMN09500586	PRJNA475189	SRR7440760	9	CC9
RL15000715	Food	SAMN09500595	PRJNA475189	SRR7440768	9	CC9
RL15000717	Food	SAMN09500597	PRJNA475189	SRR7441337	9	CC9
RL15000722	Food	SAMN09500602	PRJNA475189	SRR7440864	9	CC9
RL15000723	Food	SAMN09500603	PRJNA475189	SRR7440865	9	CC9
RL15001279	Human	SAMN09487823	PRJNA475189	SRR7429540	9	CC9
RL15001296	Food processing environment	SAMN09500620	PRJNA475189	SRR7440546	9	CC9
RL15001304	Food processing environment	SAMN09500628	PRJNA475189	SRR7440787	9	CC9
RL15001306	Food processing environment	SAMN09500630	PRJNA475189	SRR7440785	9	CC9
RL15001334	Food	SAMN09500653	PRJNA475189	SRR7440988	9	CC9
RL15001349	Food	SAMN09500659	PRJNA475189	SRR7441057	9	CC9
RL15001385	Food	SAMN09500677	PRJNA475189	SRR7440774	9	CC9
RL15001424	Human	SAMN09487888	PRJNA475189	SRR7429790	9	CC9
RL15001425	Human	SAMN09487889	PRJNA475189	SRR7429833	9	CC9
RL15001523	Human	SAMN09487893	PRJNA475189	SRR7429665	9	CC9
RL15001537	Human	SAMN09487907	PRJNA475189	SRR7429571	9	CC9
RL15001538	Human	SAMN09487908	PRJNA475189	SRR7429572	9	CC9
RL15001579	Human	SAMN09487949	PRJNA475189	SRR7429783	9	CC9
RL15001600	Human	SAMN09487970	PRJNA475189	SRR7429530	9	CC9
RL15001616	Human	SAMN09487986	PRJNA475189	SRR7429637	9	CC9
RL15001619	Human	SAMN09487989	PRJNA475189	SRR7429675	9	CC9
RL15001650	Human	SAMN09488020	PRJNA475189	SRR7429846	9	CC9
RL15002440	Human	SAMN09488062	PRJNA475189	SRR7429557	9	CC9
RL15003017	Human	SAMN09488118	PRJNA475189	SRR7429629	9	CC9
SE_FI_F_SM_46	Food	SAMEA7007162	PRJEB38828	ERS4774990	9	CC9
SE_PE_FI_D_70	Food	SAMEA7007166	PRJEB38828	ERS4774994	9	CC9
SE_PE_ME_M_82	Food	SAMEA7007188	PRJEB38828	ERS4775016	9	CC9
SE_PE_ME_S_53	Food	SAMEA7007195	PRJEB38828	ERS4775023	9	CC9
SE_PE_ME_S_57	Food	SAMEA7007199	PRJEB38828	ERS4775027	9	CC9
SE-FI-F-SM-25	Food	SAMEA7007146	PRJEB38828	ERS4774974	9	CC9
SE-FI-F-SM-37	Food	SAMEA7007153	PRJEB38828	ERS4774981	9	CC9

Supplementary Table 5. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain	Description	Number	Selection (µg/mL)	Reference
10403S	Wild type (wt), serovar 1/2a, Clonal Complex 7	BUG1341	-	Bécavin et al., 2014
10403S-Δ*gshF*	Deletion mutant for *gshF* from D. Portnoy Lab	DP-L6188	-	Renière et al., 2015
10403S-Δ*gshF*+*gshF*	Complementation of *gshF* with its native promotor in 10403S-ΔgshF	DP-L6189	Cm7	Renière et al., 2015
10403S-Δ*hly*	Deletion mutant for *hly* from D. Portnoy Lab	DP-L2161	-	Jones & Portnoy, 1994
Listeria innocua	CLIP11262	BUG499	-	Roche et al., 2003
EGDe-Δ*lmo2665*	Deletion mutant for *lmo2665* from J. Deutscher Lab	-	-	Kentache et al., 2016

Plasmid	Characteristics	Hosts	Selection (µg/mL)	Reference
pPL2-*gshF*	Integrative plasmid pPL2 carrying *gshF* gene with its native promotor	*E.Coli/Lm*	Cm30/Cm7	Renière et al., 2015

Partie II

Étude de la reprogrammation transcriptionnelle de *Listeria monocytogenes* dans les vacuoles LisCVs

Lm est une bactérie intracellulaire facultative capable d'envahir et de coloniser divers types de cellules hôtes. Son entrée dans les cellules et sa phase de dissémination active intracellulaire, lors de temps précoces d'infection (< 24h) ont fait l'objet de nombreuses études durant les 40 dernières années. Elle dispose d'un arsenal de facteurs de virulence particulièrement bien caractérisés qui fait de *Lm* un modèle d'organisme intracellulaire. Après avoir induit son internalisation dans des cellules non phagocytaires, *Lm* s'échappe de sa vacuole d'entrée puis polymérise l'actine de l'hôte grâce à sa protéine de surface ActA qui lui confère sa mobilité intra et inter-cellulaire. En 2017, mon équipe a mis en évidence une nouvelle phase observée après une infection long terme (entre 48 h et 72 h d'infection) dans des trophoblastes et des hépatocytes humains. Après sa phase de dissémination active, *Lm* cesse d'exposer ActA à sa surface et se fait piéger dans des vacuoles acides de nature lysosomale nommées LisCV (pour Listeria-*Containing Vacuole*) dont la biogénèse reste à caractériser. Au sein des LisCV, *Lm* rentre dans un état métabolique ralenti et, malgré les propriétés acides de ces vacuoles, conserve son intégrité membranaire durant plusieurs jours. Un mutant déficient pour le gène *actA* (EGDe-Δ*actA*) se localise plus efficacement dans les LisCV, jusqu'à atteindre un état dit VBNC (*Viable but Not Cultivable*). Nous faisons l'hypothèse qu'il existe un "switch" phénotypique qui permet à *Lm* de persister dans les cellules et qui met en jeu des changements d'expression de facteurs de virulence vers des facteurs de persistance et une reprogrammation du métabolisme bactérien, permettant à la bactérie de rester à l'état quiescent. Cet état de dormance au sein des LisCV pourrait contribuer au portage asymptomatique de *Lm* ainsi qu'à la persistance dans les tissus des organismes sur le long terme.

Pour répondre à ces interrogations, nous avons utilisé une approche transcriptomique entre (i) des bactéries extracellulaires en croissance exponentielle (BHI), (ii) des bactéries en phase d'infection cellulaire précoce, réplicatives dans le cytosol (6 h post-infection, *p.i.*) et (iii) des bactéries en phase d'infection cellulaire tardive, en état de persistance dans les vacuoles (72 h *p.i.*). Cette partie présente les analyses des données générées ainsi que deux approches de validation et de tests phénotypiques de mutants de délétion de gènes cibles. Cette partie ne présente pas de paragraphe "Matériel et Méthodes" du fait de la génération des données et de la

mise en place des méthodes expérimentales avant mon arrivée au laboratoire. Néanmoins cette partie figurera dans l'article de valorisation de ces données.

Nous avons utilisé les propriétés du mutant EGDe-Δ*actA*. Bien que ce mutant présente une dissémination fortement réduite, il se réplique activement lors des temps d'infection précoces et entre très efficacement dans les LisCV. Après 72h d'infection, les *Lm* EGDe-Δ*actA* sont retrouvées presque exclusivement dans les vacuoles LisCV contre 70% pour la souche EGDe-WT (**Figure 27,** Kortebi et al., 2017), ce qui permet d'avoir deux phénotypes plus homogènes que ceux observés avec la souche sauvage. De plus, ce mutant est incapable de se réactiver vers un état actif motile.

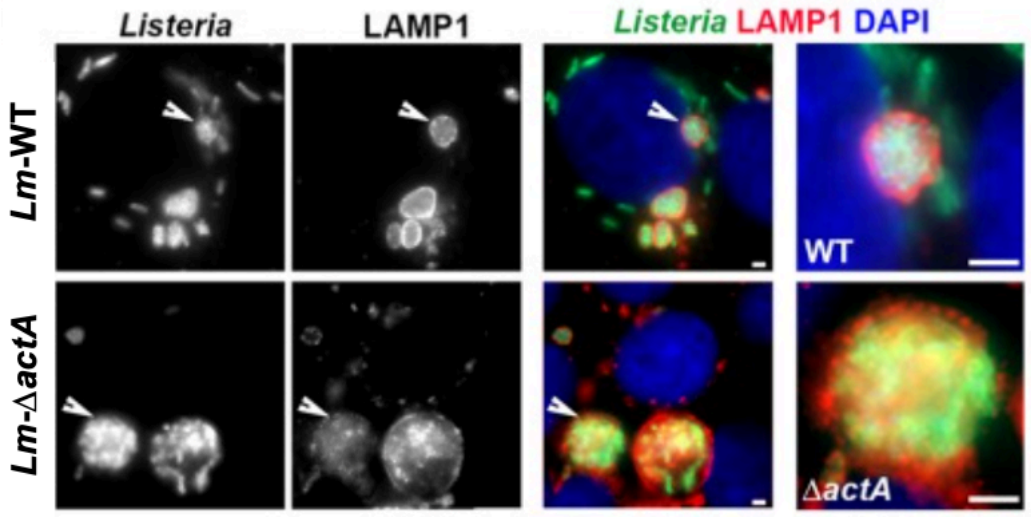


Figure 27 : Images de microscopie à immunofluorescence des souches *Lm*-WT et *Lm*-Δ*actA* après 72 h d'infection dans les cellules JEG-3 (d'après Kortebi et al., 2017). Après 72 h d'infection, les bactéries de la souche WT sont majoritairement dans les LisCVs, marquées par le marquage LAMP-1 mais une petite proportion d'environ 30% reste dans le cytosol. Chez la souche *Lm*-Δ*actA*, la quasi-totalité des bactéries sont dans les LisCVs. Les vacuoles sont également plus larges.

Avant mon arrivée au laboratoire, Mounia Kortebi, au sein de l'équipe Epimic, a mis au point un protocole d'extraction des ARNs messagers (ARNm) à différents temps d'infection (6 h et 72 h *p.i.*). En parallèle, une extraction classique des ARNs des bactéries cultivées en BHI en phase exponentielle a aussi été réalisée. (**Figure 28**).

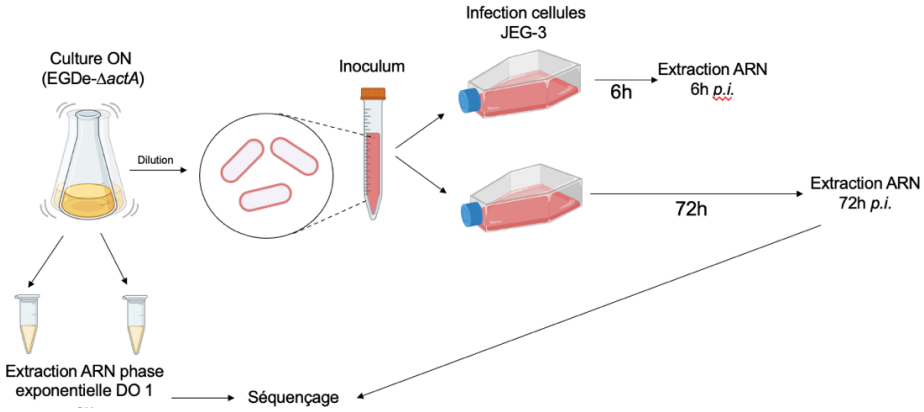


Figure 28 : Expérience et traitement des échantillons pour le RNA-seq.

Extraction d'ARN de *Lm* intracellulaire

Le protocole d'extraction des ARNs procaryotes intracellulaires a été établi à partir des travaux de Chatterjee et coll. (2006) et Toledo-Arana et coll. (2009). Les cellules épithéliales trophoblastiques JEG-3 sont infectées selon le protocole publié par Kortebi et al. (2017) avec le mutant EGDe-Δ*actA*.

Nous invitons les lecteurs à prendre connaissance du protocole détaillé, établi par Mounia Kortebi au sein de l'équipe Epimic, en **Annexe III**. 3 expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition. La qualité des ARNs a été évaluée à l'aide de la puce Bioanalyzer RNA 6000 pico (Agilent Technologies).

Séquençage des extraits d'ARNs (RNA-seq)

Les extraits ont d'abord été traités à la DNase pour éliminer la contamination par l'ADN génomique procaryote. Puis, les ARN ribosomaux ont été éliminés en utilisant le kit magnétique RiboZero rRNA Removal Kit (Illumina), adapté pour les organismes procaryotes. Le séquençage a été réalisé par la technique Illumina et la librairie de séquence construite grâce au kit Illumina Stranded. Les bibliothèques ont été regroupées en proportions équimolaires et séquencées (Paired-end 2x75 bp) sur un instrument Illumina NextSeq500, en utilisant un kit NextSeq 500 Mid Output 150 cycles. Cette partie a bénéficié des installations et de l'expertise du centre de séquençage à haut débit de l'I2BC (Centre de Recherche de Gif - http://www.i2bc.paris-saclay.fr/).

Analyses du RNAseq

L'analyse des données du RNAseq a été réalisée par Pierre Nicolas de l'unité MAIAGE, INRAE Jouy-en-Josas. Brièvement, les lectures de séquençage ont été mappées avec BWA 0.6.2-r126 contre le génome EGD-e de *Lm* (NCBI RefSeq NC_003210.1). Les expressions des gènes ont été normalisées selon la taille du gène et la profondeur du séquençage. Cette normalisation s'exprime en log2fpkm et se rapproche du "niveau d'expression" du gène. L'expression moyenne des gènes entre les 3 échantillons s'exprime en "mean log2fpkm" (**Figure 29**). Le package DESeq2 (de Bioconductor version 3.9) a été utilisé pour analyser l'expression différentielle des gènes entre BHI, 6 h *p.i.* et 72 h *p.i.*. Nous avons retenu un seuil de log2 *FoldChange* (log2FC) >1 ou <-1 pour les gènes exprimés de manière différentielle (DEG), avec un taux de faux positif (*False Discovery Rate*, FDR) < 0,05. D'autres études transcriptomiques publiées (microarray et RNAseq) et obtenues à partir des bactéries *Lm* intracellulaires à des temps précoces d'infection, ont été comparées à notre jeu de données (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Transcriptomes des *Listeria* intracellulaires dans différentes conditions d'infection. Les jeux de données disponibles dans les banques de données sont indiqués en beige. Les autres jeux de données mentionnés font référence à d'autres données transcriptomiques intracellulaires générées au cours de ces dernières années et utiles pour l'analyse de nos données.

Souche *Lm*	Modèle cellulaire	Conditions	Comparaison	Technique	Références
EGD-e et EGDe-Δ*sigB*	BHI	2, 4, 8, 16h	EGD-e et EGDe-Δ*sigB*	Microarray hybridization	Hain et al., 2008
EGD-e	Macrophage souris P388D1	4h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	RNAseq (optimisé sRNA)	Mraheil et al., 2011
EGD-e ; CLIP80459 ; F2365 ; L99	Macrophage souris P388D1	4h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	Microarray hybridization	Hain et al., 2012
EGD-e	Macrophage souris P388D1	4h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	RNA-seq	Behrens et al., 2014
EGD-e	Macrophage souris P388D1	1,4 et 8h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	RNAseq	Wehner et al., 2014
EGD-e	Cellules épithéliales Caco-2	1h p.i.	Phase exponentielle DO 0.5 et DO 1 BHI	Microarray hybridization	Joseph et al., 2008
EGD-e	Cellules épithéliales Caco-2 et macrophage de souris J774A.1	1h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	Microarray hybridization	Stoll & Goebel, 2010
EGD-e	Macrophage souris P388D1	4h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	RNAseq	Schultze et al., 2015
EGD-e	Macrophage souris P388D1	4h et 8h p.i.	Phase exponentielle DO 1 BHI	DNA microarray	Chatterjee et al., 2006
EGD-e	Rate de souris (*in vivo*)	24, 48 et 72h post injection intraveineuse	Phase exponentielle DO 0.6 BHI ou phase stationnaire DO 1.5	Macroarray	Camejo et al., 2009
EGD-e	Intestin grêle, cecum et colon	1, 6 et 24h post injection intra-gastrique	Phase exponentielle DO 1 BHI ou phase stationnaire DO 2.5	Microarray hybridization	Toledo-Arana et al., 2009

Nous avons également intégré dans notre jeu de données, les gènes de *Listeria innocua* CLIP11262 homologues à EGD-e ainsi que l'annotation des gènes de virulence selon Wurtzel et al., (2012). Enfin, nous avons réannoter le génome de EGD-e dont la dernière annotation datait de 2016. Nous avons réannoté et rajouté la fonction de plus de 300 gènes, à la main,

d'après les données récentes de la littérature. Ce jeu de données est toujours régulièrement mis-à-jour et comprend aujourd'hui plus de 2000 gènes codants. La fonction de chaque gène est renseignée selon les bases de données COG (*Clusters of Orthologous Genes*) et KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

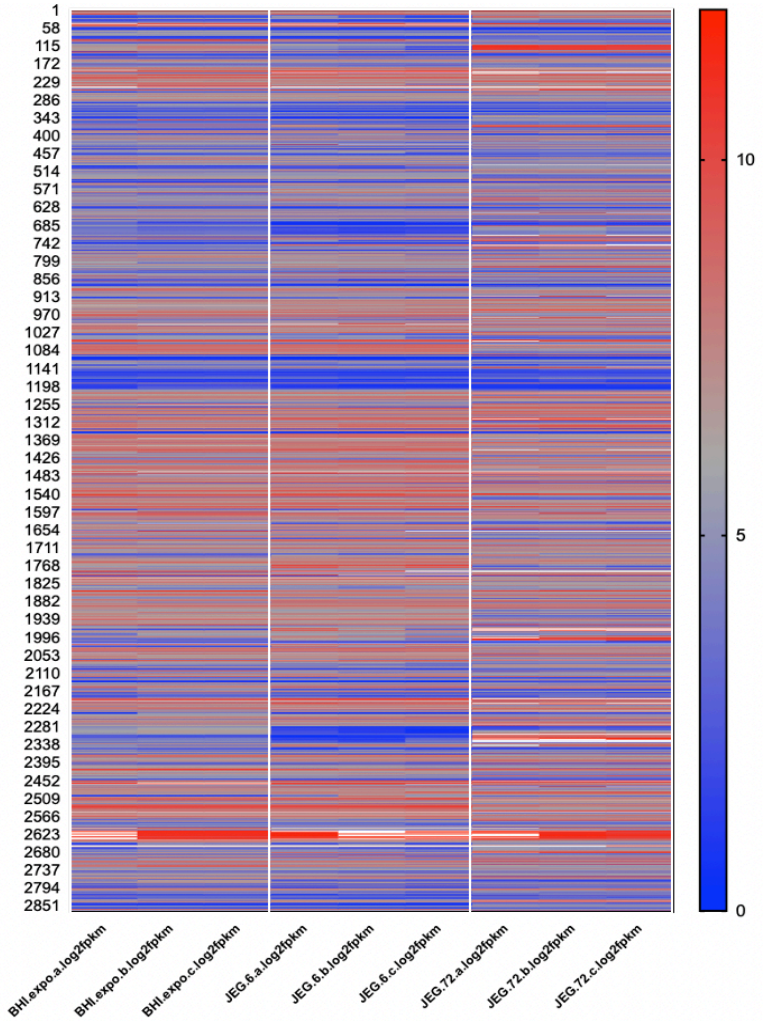


Figure 29 : Heatmap des expressions normalisées, exprimées en log2fpkm, de l'ensemble des gènes, pour les 3 échantillons de chaque condition testée. Les données en ordonnées représentent les gènes en fonction du *lmo*. Les données en abscisse représentent les conditions testées. Le code couleur est rouge pour une expression forte log2pkm >10, gris pour une expression moyenne (log2fpkm ~ 5) et bleu pour une expression faible log2fpkm ~ 0.

La **Figure 29** nous montre que les échantillons sont homogènes parmi les triplicats. De plus, on observe davantage de similarités entre la condition BHI DO 1 et la condition intracellulaire 6 h *p.i.*, comparé à la condition 72 h *p.i.,* ce qui atteste d'une reprogrammation massive des

gènes entre les deux conditions intracellulaires. Les gènes de ménage tels que *rpoB*, *bglA*, *rplD* et *gyrA* ont une expression forte qui reste stable entre les conditions testées. Ces données nous confortent pour l'analyse plus poussée du RNAseq.

Gènes différentiellement régulés durant la phase cytosolique active (comparé au BHI)

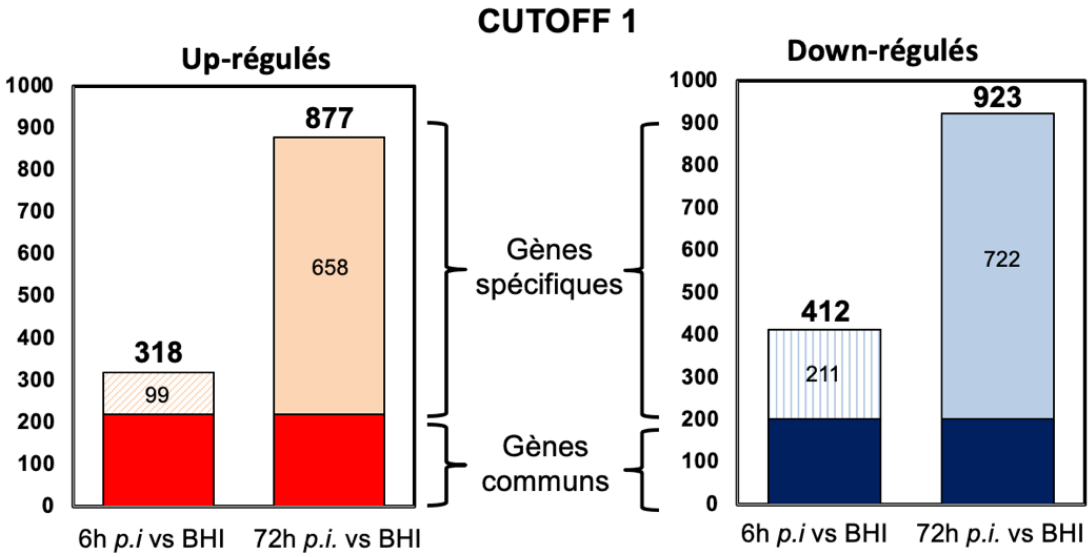


Figure 30 : Représentations des gènes dérégulés à 6 h et 72 h *p.i.*, comparés à la condition BHI DO 1. FDR < 0.05 et log 2FC < -1 (réprimés) ou log2FC>1 (surexprimés) (CUTOFF 1). Gènes induits à gauche (rouge) et gènes réprimés à droite (bleu). Les gènes communs entre 6 h vs BHI et 72 h vs BHI sont représentés en couleur foncée. Les gènes spécifiques aux conditions 6 h vs BHI et 72 h vs BHI sont représentés en couleur claire.

La première étape de notre analyse visait à étudier les gènes différentiellement exprimés de EGDe-Δ*actA* entre la condition cytosolique active (6 h *p.i.*) et la condition extracellulaire (BHI DO 1). Sur 2868 gènes significativement exprimés (p-value FDR <0.05) (**Figure 30**), 318 gènes sont up-régulés et 412 gènes sont down-régulés à 6 h comparé au BHI phase exponentielle (BHI DO 1) (**Figure 30**). Parmi les gènes induits on retrouve les gènes du locus de virulence LIPI-1 (*hly*, *plcA, plcB, prfA, orfX, orfZ* et *mpl*), les gènes du locus *inlAB*, ainsi que des gènes liés au transport et au métabolisme des hexoses-6-phosphate de l'hôte (*hpt)* et du glycérol (glycérol kinase *glpK*). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature déjà obtenus lors des temps précoces d'infection (Chatterjee et al., 2006 ; Joseph & Goebel, 2007). En effet, ils

font partie des 24 gènes communs aux autres jeux de données transcriptomiques, représentés en **Figure 31** (Chatterjee et al., 2006 ; Schultze et al., 2015). Ces données nous ont donc permis de valider notre transcriptome.

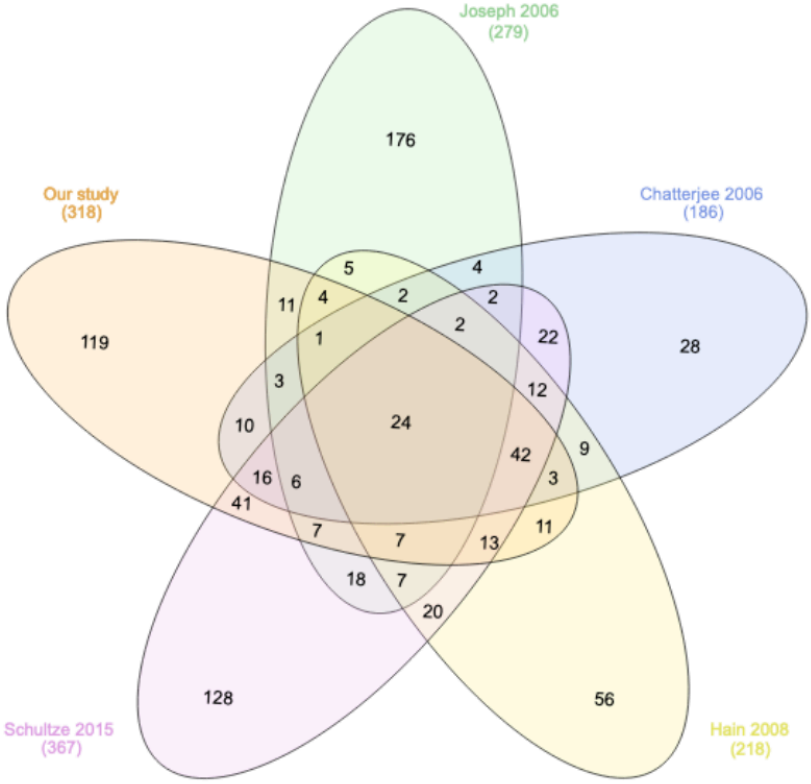


Figure 31 : Ensemble des gènes sur-exprimés en conditions intracellulaires réplicatives (6 h à 8 h *p.i.*) comparé à une condition extracellulaire (BHI DO 1) selon 4 autres jeux de données transcriptomiques publiés. Les modèles utilisés et les détails associés à ces différents travaux sont résumés en **Tableau 5**.

Gènes différentiellement régulés durant la phase vacuolaire dormante

Lorsque l'on compare les conditions intracellulaires (6 h *p.i.* et 72 h *p.i.*) à la condition extracellulaire (BHI DO 1), on remarque qu'un nombre plus important de gènes sont dérégulés à 72 h *p.i.*, lors de la phase vacuolaire (877 gènes sur-exprimés et 923 gènes réprimés) (**Figure 30**). Parmi ces gènes, certains sont communs aux deux conditions intracellulaires (6 h et 72 h *p.i.*) et correspondent aux gènes dérégulés durant la phase intracellulaire. Les gènes spécifiquement dérégulés lors de la phase dormante vacuolaire sont parmi les 658 et 722 gènes, respectivement induits et réprimés (**Figure 30**). Ce nombre important de gènes est cohérent avec les données de la heatmap (**Figure 29**), et soutient notre hypothèse d'un "switch"

phénotypique avec reprogrammation massive de l'expression des gènes lors de la transition entre phase cytosolique et phase vacuolaire.

Afin de mieux comprendre l'adaptation des *Listeria* lors de l'établissement de l'état de persistance, nous nous sommes focalisés sur les gènes régulés différentiellement entre la phase de dissémination cytosolique (6 h) et la phase de persistance vacuolaire (72 h), en excluant la condition extracellulaire.

Parmi ces gènes dérégulés, trois différents seuils de significativité ont été établis (**Figure 32**). Le seuil de significativité le plus bas a été retenu pour l'analyse des gènes selon leur COG respective (CUTOFF 1) (**voir Figure 33**). Pour l'approche de la construction de gènes senseurs (**voir Approche 2**), le seuil de significativité le plus élevé a été utilisé afin de mettre en évidence les gènes les plus fortement dérégulés.

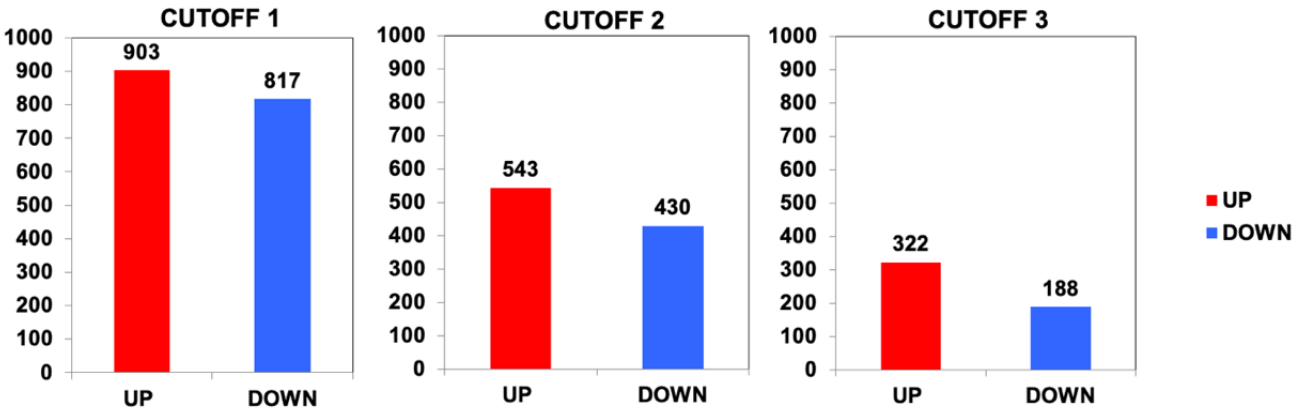


Figure 32 : Nombre gènes différentiellement exprimés à 72h *p.i,* comparé à et 6h *p.i.* selon différents seuils de log2FC. CUTOFF 1 (log2FC<-1 et log2FC>1).

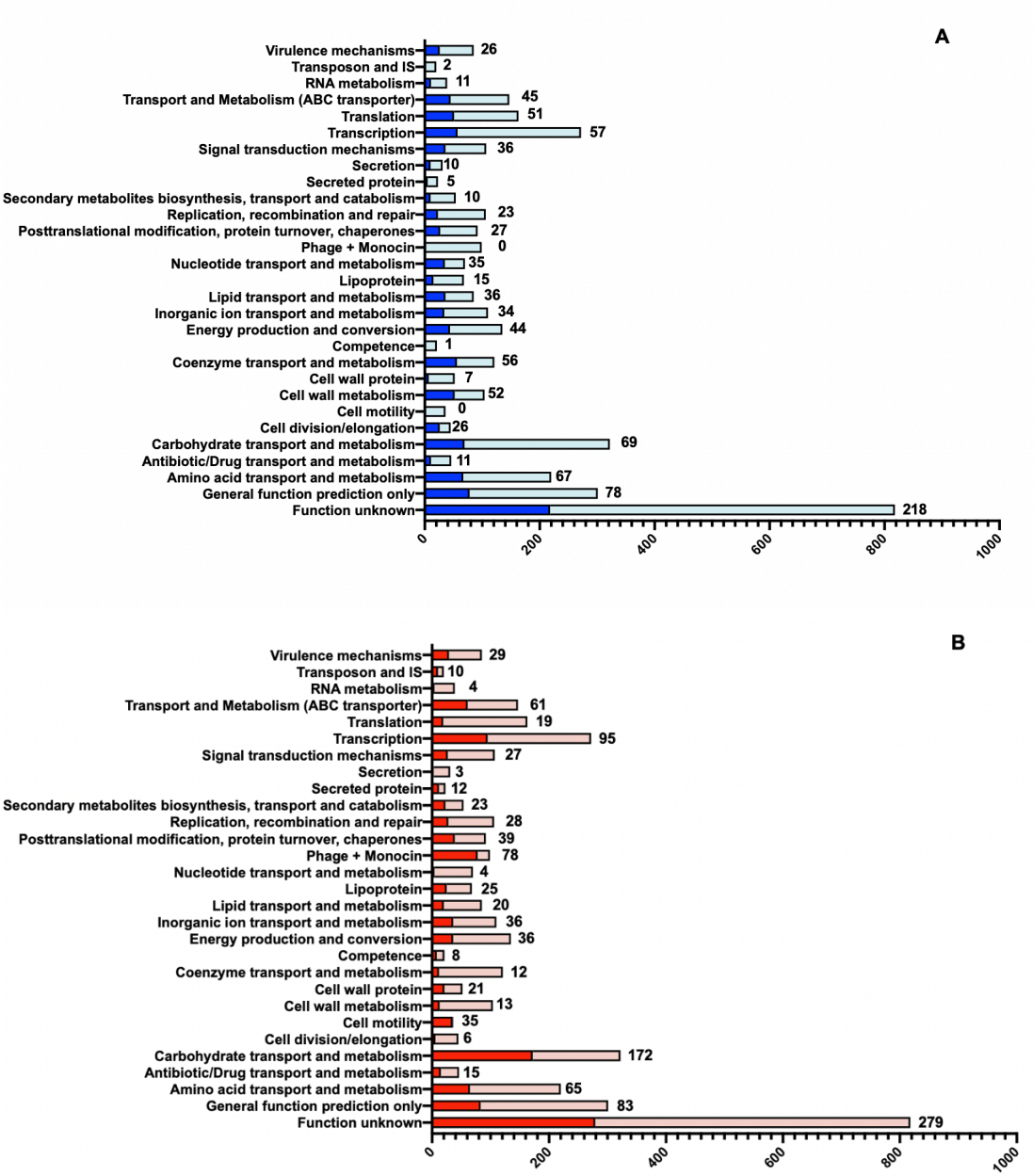


Figure 33 : Représentation des gènes dérégulés à 72 h *p.i.*, comparé à 6 h *p.i.* selon leur(s) catégorie(s) fonctionnelle(s) (COG), avec un CUTOFF de 1. A. Gènes réprimés à 72 h, comparé à 6 h *p.i.*. **B.** Gènes induits entre 72 h et 6 h *p.i.*. Les barres claires représentent le nombre total de gènes annotés comme appartenant à la catégorie fonctionnelle correspondante. Les barres foncées représentent le nombre de gènes dérégulés au CUTOFF de 1 dans la catégorie fonctionnelle correspondante.

Nous avons identifié 1720 gènes régulés différentiellement entre la phase de dissémination cytosolique (6 h) et la phase de persistance vacuolaire (72 h). Parmi les gènes réprimés on retrouve des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, dans la division cellulaire et la traduction, comme attendu pour des bactéries dans un état non-réplicatif. Parmi les gènes induits, plusieurs sont impliqués dans la réponse au stress acide qui correspond à

l'environnement retrouvé dans le compartiment vacuolaire. Nous nous sommes également intéressés à l'expression des gènes de virulence déjà caractérisés qui incluent les gènes du LIPI-1 et les gènes codants pour des composants moléculaires de surface (protéines de surface, enzyme du métabolisme de la paroi cellulaire, transporteurs, récepteurs de signalisation, etc).

Expression des gènes de virulence dans la phase vacuolaire dormante

Concernant la catégorie des gènes de virulence déjà connus, beaucoup de gènes du LIPI-1 restent fortement induits puisque les niveaux d'expression de *prfA*, *hly* et *mpl* sont comparables entre 6 h et 72 h *p.i.*. Le gène *plcA* est même légèrement sur-exprimé spécifiquement après 72 h d'infection (**Tableau 6**). Seul le locus *inlAB*, impliqué dans l'invasion de *Lm* dans la cellule hôte est spécifiquement réprimé à 72 h *p.i.*. Le gène *actA* n'est pas détecté puisque nous sommes dans le modèle EGDe-Δ*actA*.

Tableau 6 : Différence d'expression des gènes de virulence de EGDe-Δ*actA* appartenant au locus LIPI-1 (A) et *inlAB* (B) entre 6 h et BHI et 72h comparé à 6 h *p.i.*.

A

Locustag (updated)	Name (updated)	Product (Updated)	LOG2 FC 6h vs BHI	LOG2 FC 72h vs 6h
lmo0200	*prfA*	listeriolysin positive regulatory protein	3,89	0,85
lmo0201	*plcA*	phosphatidylinositol-specific phospholipase c	4,40	1,23
lmo0202	*hly*	listeriolysin O precursor	4,29	0,41
lmo0203	*mpl*	Zinc metalloproteinase precursor	6,60	0,83
lmo0204	*actA*	actin-assembly inducing protein precursor	NA	NA
lmo0205	*plcB*	phospholipase C	7,05	-0,51
lmo0206	*orfX*	nucleomodulin	6,66	-0,06
lmo0207	*orfZ*	hypothetical protein	6,70	0,19

B

Locustag (updated)	Name (updated)	Product (updated)	LOG 2 FC 6h vs BHI	LOG 2 FC 72h vs 6h
lmo0433	inlA	internalin A ; LPXTG protein	5,49	-3,77
lmo0434	inlB	internalin B ; class II	5,71	-2,22

Tableau 7 : Tableau des gènes dérégulés appartenant au COG des gènes de virulence. Les gènes dérégulés sont représentés selon leur niveau d'expression : les gènes sur-exprimés en jaune pour un CUTOFF compris entre 1 et 3 et en orange pour un CUTOFF > 3. Les gènes réprimés sont représentés en bleu clair pour un CUTOFF compris entre -1 et -3 en bleu foncé pour CUTOFF<-3.

A

Locustag (updated)	Name (updated)	Product (Updated)	LOG2 FC 6h vs BHI	LOG2 FC 72h vs 6h
lmo2637	*pplA*	peptide pheromone-encoding lipoprotein A	-4,02	1,04
lmo1422	*bilEB*	glycine/betaine ABC transporter permease	0,93	1,05
lmo0943	*fri*	non-heme iron-binding ferritin	-2,34	1,15
lmo0201	*plcA*	phosphatidylinositol-specific phospholipase c	4,40	1,23
lmo1280	*codY*	transcriptional repressor CodY	-0,04	1,24
lmo2363	*gadD2*	glutamate decarboxylase	0,52	1,24
lmo1786	*inlC*	internalin C; class III	7,45	1,30
lmo1421	*bilEA*	glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein	1,80	1,38
lmo0320	*vip*	pepdidoglycan bound protein; LPXTG protein; Virulence protein	-0,58	1,64
lmo2181	*srtB*	sortase B	-1,43	1,66
lmo1656	*lmo1656*	Lmo1656	0,69	1,83
lmo1634	*lap*	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase; Listeria adhesion protein	-10,30	1,85
lmo0409	*inlF*	internalin F; class I LPXTG	0,88	1,86
lmo0017	*capA*	capsule biosynthesis protein CapA	0,28	1,91
lmo1956	*fur*	Fur family transcriptional regulator	-1,84	1,95
lmo2686	*Zea*	RNA-binding protein Zea	-2,72	2,29
lmo0229	*ctsR*	CtsR family transcriptional regulator	0,66	2,40
lmo1426	*opuCC*	glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	-0,30	2,45
lmo0264	*inlE*	internalin E; class I LPXTG	0,46	2,74
lmo0438	*lntA*	listeria nuclear targeting protein A	-1,00	3,34
lmo2067	*bsh*	bile acid hydrolase	0,80	3,75
lmo0754	*btlB*	bile tolerance locus protein B	2,18	3,82
lmo0674	*mogR*	Motility gene repressor	-0,97	3,90
lmo0691	*cheY*	chemotaxis response regulator CheY	-1,31	4,20
lmo0447	*gadA*	glutamate decarboxylase	-0,66	4,29
lmo0692	*cheA*	two-component sensor histidine kinase CheA	-0,84	4,66
lmo1883	*chiA*	chitinase A	1,09	4,95
lmo0263	*inlH*	internalin H; class I LPXTG	-0,37	5,34
lmo0690	*flaA*	flagellin	-0,10	5,36

B

Locustag (updated)	Name (updated)	Product (Updated)	LOG2 FC 6h vs BHI	LOG2 FC 72h vs 6h
lmo2770	*gshF*	bifunctional glutamate--cysteine ligase/glutathione synthetase	0,31	-1,06
lmo0514	*NA*	internalin; class I LPXTG	5,39	-1,14
lmo1271	*sipZ*	type I signal peptidase	-0,05	-1,20
lmo2185	*hbp2*	Hemoglobin binding protein 2, Hbp2	0,49	-1,24
lmo1291	*oatA*	acyltransferase	0,59	-1,28
lmo2429	*hupC*	ferrichrome ABC transporter ATP-binding protein	0,06	-1,35
lmo0931	*lplA1*	lipoate protein ligase A	-0,48	-1,50
lmo0848	*glnQ*	amino acid ABC transporter ATP-binding protein;	-0,03	-1,56
lmo1269	*sipX*	type I signal peptidase	0,70	-1,68
lmo1695	*mprF*	Phosphatidylglycerol lysyltransferase	-0,04	-1,70
lmo2219	*prsA2*	foldase	2,66	-1,78
lmo1864	*NA*	Hemolysins and related proteins containing CBS domains	0,53	-2,02
lmo0847	*GlnP*	glutamine ABC transporter	-0,45	-2,06
lmo0434	*inlB*	internalin B; class II	5,71	-2,22
lmo1439	*sod*	superoxide dismutase	-0,38	-2,60
lmo2196	*oppA*	Oligopeptide-binding protein OppA	-0,82	-2,82
lmo2854	*oxaA2*	Membrane insertase; sporulation protein SpoJ	0,00	-2,97
lmo0974	*dltA*	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	-0,37	-3,57
lmo0433	*inlA*	internalin A; LPXTG protein	5,49	-3,77
lmo1088	*tagB*	teichoic acid biosynthesis protein B	-0,09	-3,90
lmo2549	*gtcA*	wall teichoic acid glycosylation protein GtcA	0,44	-4,00
lmo0582	*iap*	invasion associated secreted endopeptidase p60; γ-d-Glutamyl-l-m-Dpm peptidase	-0,12	-4,05
lmo0051	*agrA*	response regulator	-0,59	-4,11
lmo0050	*agrC*	histidine kinase	-0,40	-5,41
lmo1769	*purQ*	phosphoribosylformylglycinamidine synthase II	3,17	-5,56
lmo0049	*agrD*	hypothetical protein	-0,30	-9,08

Parmi les autres gènes annotés comme étant associés à la virulence de *Lm* (**Tableau 7**), on retrouve 29 gènes sur-exprimés et 24 gènes réprimés. Parmi les gènes sur-exprimés on trouve notamment le gène qui code pour le régulateur transcriptionnel CodY (Lobel et al., 2015), les gènes de réponse au stress acide *gadA*, *gadD2* (Cotter et al., 2001), *bsh* et *btlB* (Dussurget et al., 2002 ; Begley et al., 2005), des gènes impliqués dans la mobilité cellulaire *flaA* et *mogR* (Gründling et al., 2004) et enfin plusieurs protéines LPXTG dont *vip*, *inlF*, *inlE* et *inlH*.

Parmi les gènes de virulence réprimés, on trouve quelques gènes qui codent pour des protéines de surface comme *iap* et Lmo0514, et des gènes du système Agr impliqué dans la formation des biofilms sur les surfaces abiotiques avec *agrA*, *agrC*, *agrD* (Rieu et al., 2007). On retrouve aussi des gènes impliqués dans le métabolisme des bases puriques et des protéines de la paroi (*gtcA* et *tagB*), certains ABC transporteurs (*hupC* et *glnQ*) (Carvalho et al., 2014) et enfin le gène qui code pour le co-activateur de PrfA, *gshF*.

Gènes réprimés dans la vacuole

En lien avec l'état métabolique ralenti dans la vacuole, on retrouve parmi les gènes réprimés dans la phase vacuolaire, beaucoup de gènes en lien avec la division cellulaire et le métabolisme. Dans la catégorie "*Cell division/elongation*", on trouve notamment *ftsZ*, *ftsA, ftsE, ftsX, ftsL, rodA2, rodA1, mreB, mreC, mreD, minC* et *minD*. Dans les catégories dédiées au métabolisme, on retrouve les gènes de synthèse des acides téichoïques (*tagB, tagD, rmlD, rmlB, rmlC, rmlT*), lipotéichoïques (*dltBCD*), de modification du peptidoglycane (*pbpD1, pbpC2*), de synthèse des bases puriques avec *purE, purK, purB, purC, purL, purF, purM, purN, purH, purD, purA, guaA* et *gmK* et les gènes associés à la production d'énergie qui code pour la pompe ATP synthase F0F1 (*atpA,B,C,D,E,F,G,H,I,*) (**Figure 33.A**). L'ensemble de ces données sont cohérentes avec la baisse globale de l'activité de *Lm* dans la vacuole, en lien avec un état métabolique ralenti dit de "dormance". Ces données seront validées par RT-qPCR en utilisant la souche EGDe-Δ*actA* ainsi que la souche WT EGD-e.

Gènes induits dans la vacuole

Parmi les gènes sur-exprimés dans la vacuole (**Figure 33.B**), on retrouve notamment les gènes appartenant à la biosynthèse du flagelle, les gènes appartenant au locus du phage A118 retrouvé spécifiquement dans la souche EGD-e (Loessner et al., 2000), les gènes qui codent pour les protéines de surface notamment les protéines LPXTG ainsi que certains gènes associés au métabolisme carboné et à la synthèse des ABC transporteurs (**Figure 33.B**)

On observe également beaucoup de gènes dérégulés appartenant au régulon Sigma B et associés à la réponse au stress de classe II (Chatterjee et al., 2006). Plus de la moitié des gènes du régulon semble être induits dans les conditions vacuolaires (51,58%) (**Figure 34**).

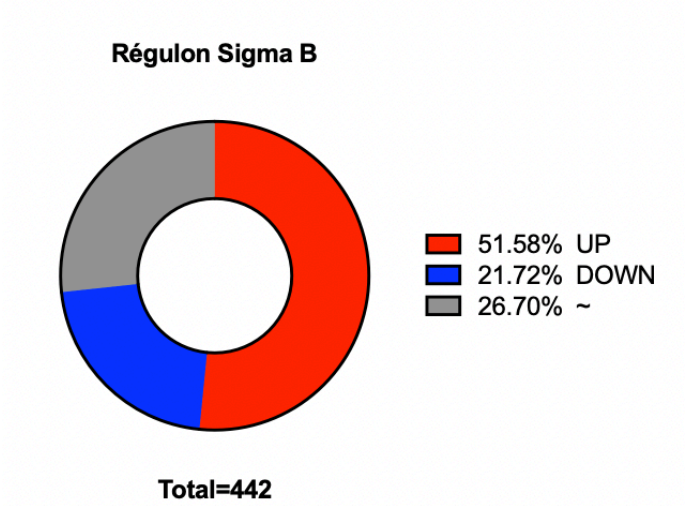


Figure 34 : Différence d'expression des gènes de *Lm* annotés comme étant Sigma B dépendants, entre 72 h et 6 h *p.i.* Sur 442 gènes annotés, 228 gènes sont sur-exprimés, 118 gènes ne sont pas significativement dérégulés et 96 sont réprimés.

Parmi les gènes Sigma B-dépendants, on observe la sur-expression de gènes qui contribuent à la résistance à l'acidité comme le système glutamate décarboxylase (GAD), précédemment mentionnés dans les gènes associés à la virulence. On retrouve notamment *gadD2* et *gadD3* qui codent pour deux glutamate décarboxylases, impliquées dans le métabolisme du glutamate-γ-aminobutyrate (GABA) qui participe à la réduction de l'acidité dans les compartiments cellulaires. En outre, on trouve aussi la sur-expression des gènes du système arginine déiminase (ADI) avec *arcB*, *arcC* et *arcD* qui jouent un rôle dans la tolérance à l'acidité *via* la conversion de l'arginine en ornithine. Du fait du caractère acide des LisCV, ces deux systèmes peuvent potentiellement contribuer à la survie des *Lm* intracellulaires (**Figure 35**).

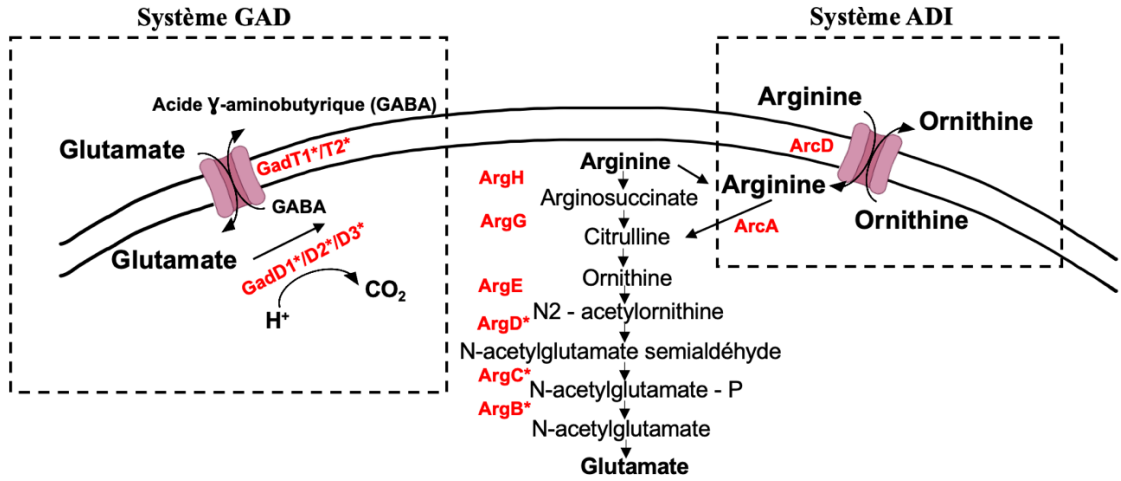


Figure 35 : Principaux systèmes impliqués dans la résistance à l'acidité chez *Lm*. Le système GAD est le système Glutamate décarboxylase et le système ADI est le système Arginine déiminase.

Le gène du régulateur *sigB* lui-même ne semble pas dérégulé, ce qui suggère soit une dérégulation des facteurs Sigma ou Anti-Sigma qui pourrait impacter l'expression du régulon, soit l'intervention d'un autre facteur de régulation. Aucun des facteurs Anti-Sigma ou Anti-Anti-Sigma appartenant au stressosome ne semble être induits dans la vacuole (**Figure 36**). Des études ont montré des chevauchements importants entre les régulons contrôlés par *sigB*, *sigC* (uniquement dans les souches de lignée II), *sigH* et *sigL*, en réponse à des conditions environnementales en évolution rapide. Ces 4 facteurs sigma alternatifs sont présents chez *Lm* (Chaturongakul et al., 2011 ; Mujahid et al., 2013). De plus, des données récentes mettent en évidence l'implication de certains de ces facteurs dans la survie intracellulaire de *Lm*. La délétion de *sigL* dans des souches Δ*sigB*, Δ*sigC* ou Δ*sigH* restaure notamment les efficacités d'invasion altérées dans des souches simplement mutées, ce qui suggère que l'absence de SigL pourrait améliorer l'invasion de l'hôte (Rukit et al., 2022).

De manière intéressante, les expressions de *sigL* (Sigma-54) et *lmo2173*, un régulateur transcriptionnel sigma-54-dépendant, sont induites. Ces résultats suggèrent que Sigma-54 pourrait jouer un rôle dans la phase vacuolaire de *Lm*.

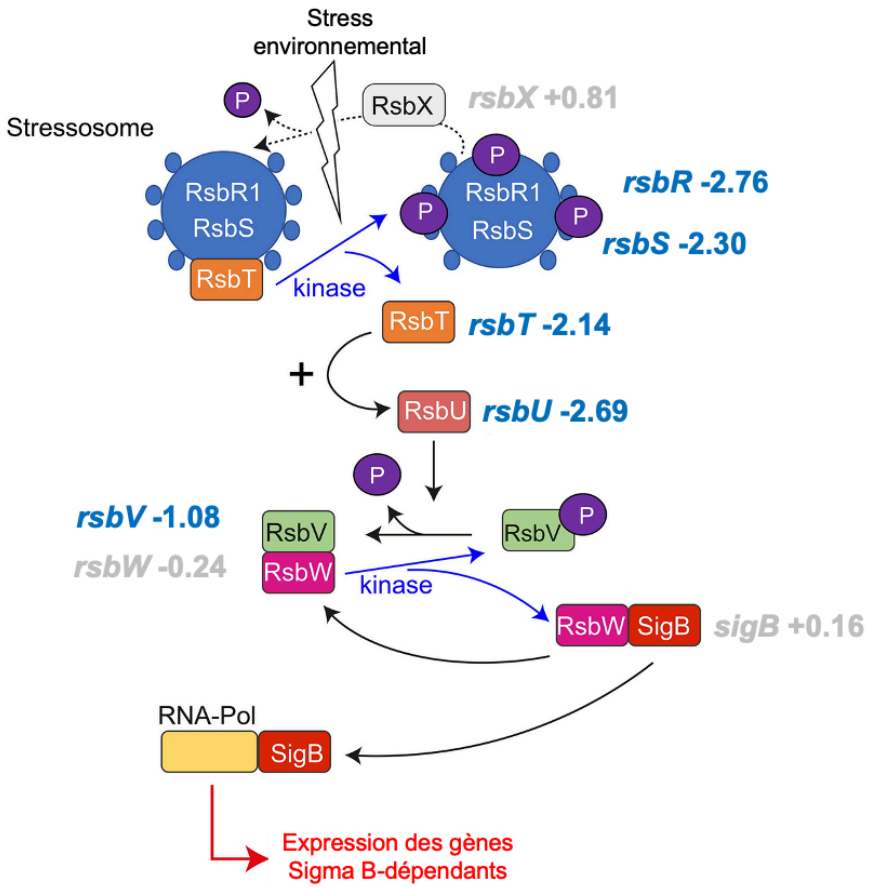


Figure 36 : Expression des gènes appartenant au stressosome, impliqués dans la régulation du facteur Sigma B (d'après Dessaux et al., 2020).

Outre les gènes Sigma B-dépendants, mais toujours en lien avec les conditions délétères intra-vacuolaires, on observe que les gènes de réponse SOS sont également induits, à savoir les gènes *dnaJ, dnaK*, *grpE* (*lmo1472-1474*), *groEL* (*lmo2068*) qui codent pour les protéines chaperonnes classiques en réponse au stress de classe 1 (Chatterjee et al., 2006). Les membres des protéines de stress de classe III, régulées par CtsR qui sont des protéases ATP-dépendantes nécessaires à la dégradation des protéines anormales, tels que *clpP, clpC, clpE, clpB, clpQ*, *lmo0230* et *lmo0231,* connus pour être induites dans des conditions phagolysosomales et intracytoplasmiques sont également induits spécifiquement à 72 h *p.i.*.

Après l'analyse descriptive du RNAseq, nous avons tenté de caractériser le rôle potentiel de gènes cibles candidats en les inactivant dans la souche WT EGD-e. De plus, nous avons cherché à mettre au point un système de détection spécifique de la phase vacuolaire *via* des gènes "senseurs". Ces deux approches sont développées dans la suite de cette partie.

Approche 1 : Étude ciblée du phénotype intracellulaire de mutants de délétion

Nous avons mis en évidence la forte expression, spécifiquement à 72 h d'infection, d'une part importante du régulon Sigma B, suggérant que ce facteur pourrait jouer un rôle important dans la survie des bactéries au sein des vacuoles LisCV. Nous avons testé la souche EGDe-Δ*sigB* et construit et testé le double mutant EGDe-Δ*actA*-Δ*sigB* afin d'être dans le contexte du modèle utilisé pour le transcriptome.

Parmi les gènes codant des protéines de surface, nous avons identifié 18 gènes codant pour des protéines LPXTG, spécifiquement induits à 72 h *p.i.*. Certaines de ces protéines ont déjà été observées comme étant induites dans des modèles d'infection cellulaire ou impliquées dans la virulence de *Lm* (Cabanes et al., 2002 ; Bierne et al., 2007), mais leur rôle lors de l'infection n'est pas connu. Parmi ces gènes, nous avons caractérisé le phénotype de mutants disponibles de la littérature (*inlH, lmo2085, inlE*). Les protéines LPXTG sont ancrées à la membrane bactérienne *via* la Sortase A. La délétion de *srtA* conduisant à la sécrétion de toutes les protéines ayant un motif LPXTG, les rendant non fonctionnelles, nous avons également testé la souche EGDe-Δ*srtA* et construit et testé le double mutant EGDe-Δ*srtA*-Δ*actA*.

Pour la construction des mutants Δ*actA*, nous avons utilisé le vecteur pMAD-*actA,* disponible au laboratoire et permettant la délétion du gène *actA* par double recombinaison homologue dans la souche d'intérêt (Arnaud et al., 2004 ; **Tableau 8**). Les mutants d'intérêt ont ensuite été testés dans notre modèle d'infection, selon notre protocole présenté en Partie I, pour l'étude de leur phénotype à long terme dans le modèle épithélial trophoblastique JEG-3. L'ensemble des souches testées sont présentées en **Tableau 8**. Malheureusement, nous n'avons pas observé de phénotypes significativement différents entre les mutants testés et la souche parentale (EGD-e WT ou EGDe-Δ*actA*), dans la capacité à se répliquer (CFU) ou à former des LisCV (IF) (**Figure 37**).

Tableau 6: Tableau récapitulatif des mutants testés.

Souches testées	Nom	Construction	Phénotype LisCV
EGDe-Δ*sigB*	BUG2215	F.Repoila/P.Mandin	Non
EGDe-Δ*sigB*-Δ*actA*	HBSC289	Ce travail	Non
EGDe-Δ*srtA*	BUG1777	H.Bierne	Non
EGDe-Δ*srtA*-Δ*actA*	HBSC374	Ce travail	Non
EGDe-*lmo1656*	BUG3607	David et al., 2018 (P.Cossart Lab)	Non
EGDe-Δ*lmo2085*	BUG2326	E.Gouin (P.Cossart Lab)	Non
EGD-Δ*inlE*	BUG950	S.Dramsi	Non
EGDe-Δ*inlH*	BUG2569	N.Personnic	Non
EGDe-Δ*inlGHE*	?	P.Cossart Lab	Non
EGDe-Δ*flaA*	BUG1967	P.Cossart Lab	Non
EGDe-Δ*A118*	?	From P.Cossart Lab	Non

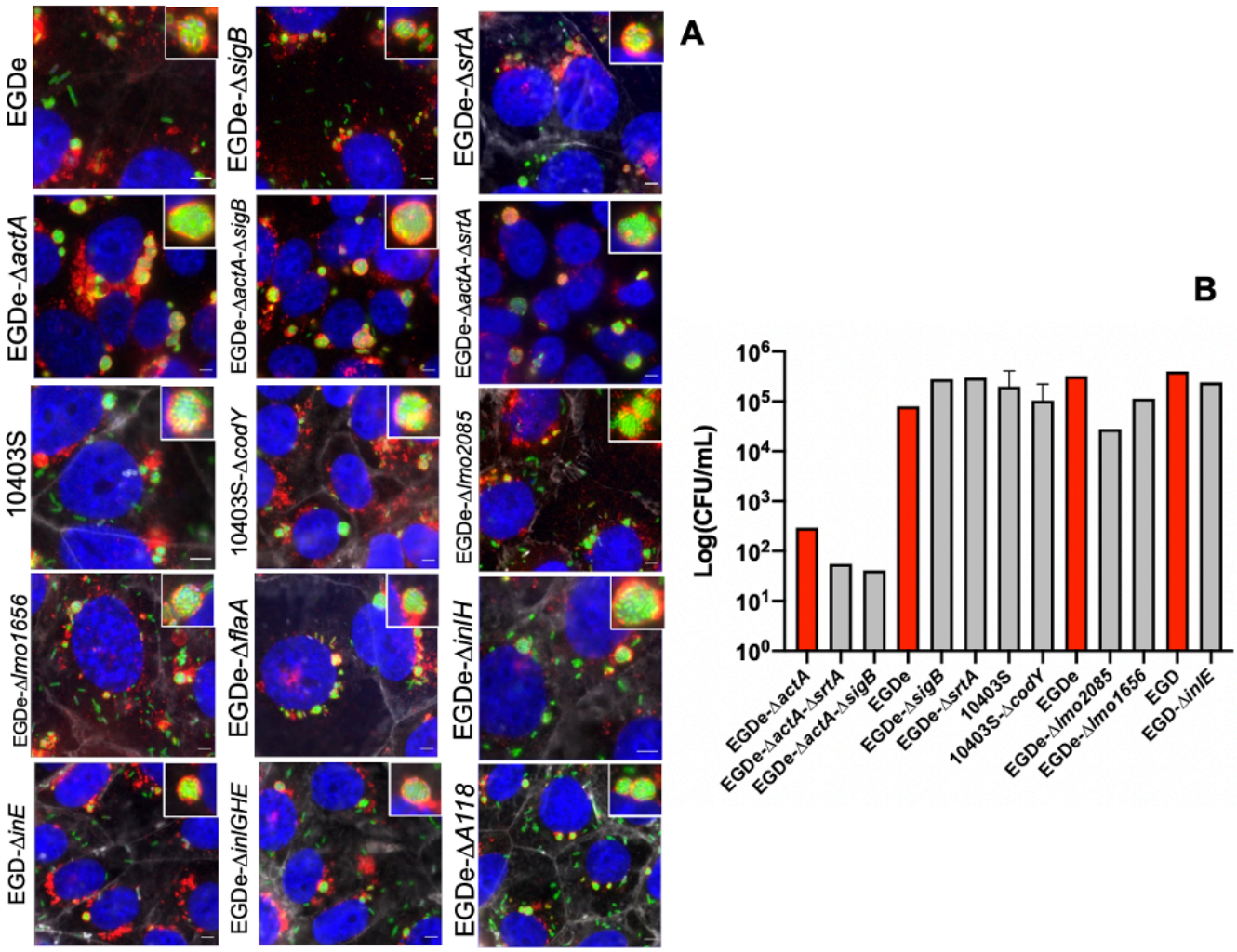


Figure 37 : Phénotypes intracellulaires des mutants testés après 72h d'infection dans le modèle épithélial trophoblastique JEG-3 en IF et CFU. A. Capacité à former des LisCV, visualisée par immunofluorescence (IF) ; **B.** Capacité à se répliquer, par comptage des CFU. Les souches parentales servant de contrôle EGD-e et EGDe-Δ*actA* sont visualisées en rouge.

Approche ciblée 2 : Identification de gènes "senseurs" des bactéries intra-LisCV

En s'appuyant sur le transcriptome, nous avons cherché des gènes spécifiquement exprimés à 72 h *p.i.,* potentiels "senseurs" de la vie intra-vacuolaire, en construisant des fusions transcriptionnelles avec le gène RFP comme rapporteur. Nous avons donc sélectionné les gènes candidats selon plusieurs critères :

(i) Une expression induite spécifiquement à 72 h d'infection dont l'expression est faible et comparable entre 6 h et BHI (log2fpkm < 2 et LOG2FC entre -1.5 et 1.5)

(ii) une expression forte et induite à 72 h comparée à 6 h *p.i.* (log2fpkm > 3 et LOG2FC > 6 respectivement).

Ces résultats ont été obtenus en se focalisant sur le CUTOFF le plus fort (LOG2FC > 3) de la **Figure 32**. Les gènes candidats sont présentés dans le **Tableau 9**.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des gènes candidats selon leurs expressions log2fpkm et leurs log2FC entre 72 h et 6 h *p.i.*. Log2fpkm correspond au niveau d'expression du gène dans une condition donnée.

Locustag	Product (upadted)	LOG2(FC)6h vs BHI	Log2(FC)72h vs 6h	Log2(FC)72h vs BHI	Log2pkm BHI	Log2pkm 6h	Log2pkm 72h
lmo0019	Hypothetical protein	0.14	7.40	7.54	0.99	1.13	7.65
lmo0254	Hypothetical protein	0.63	6.70	7.33	1.28	1.63	7.81
lmo0690	*flaA* - flagelline	-0,1	5.36	5.26	6.16	5.90	11.32
lmo0880	LPXTG protein	0.38	6.11	6.50	1.96	2.19	8.05
lmo1263	Transcriptional regulator	1.44	7.45	8.89	0.86	1.44	8.58
lmo2006	*alsS* - acetolactate synthase	1.33	5.17	6.50	7.30	8.56	13.04
lmo2085	LPXTG protein	0.08	6.27	6.35	2.71	2.68	8.88
lmo2322	*gp44* - Phage	-2,2	10.90	8.65	4.21	2.02	12.79
lmo2434	*gadD3* - Glutamate decarboxylase	-1,24	5.19	3.95	2.73	1.94	6.80

Outre les gènes répondant aux critères de discrimination, nous avons ajouté des gènes appartenant aux catégories fonctionnelles les plus induites dans la condition LisCV : le gène codant la flagelline (*flaA*), un gène appartenant au phage A118 (*lmo2322*), un gène du métabolisme (*alsS* - *lmo2006*), un gène impliqué dans la réponse au stress acide (*gadD3* - *lmo2434*) et deux gènes codant pour des protéines LPXTG (*lmo0880 et lmo2085*). Les gènes candidats sont également mis en évidence par visualisation volvano-plot en **Figure 38**.

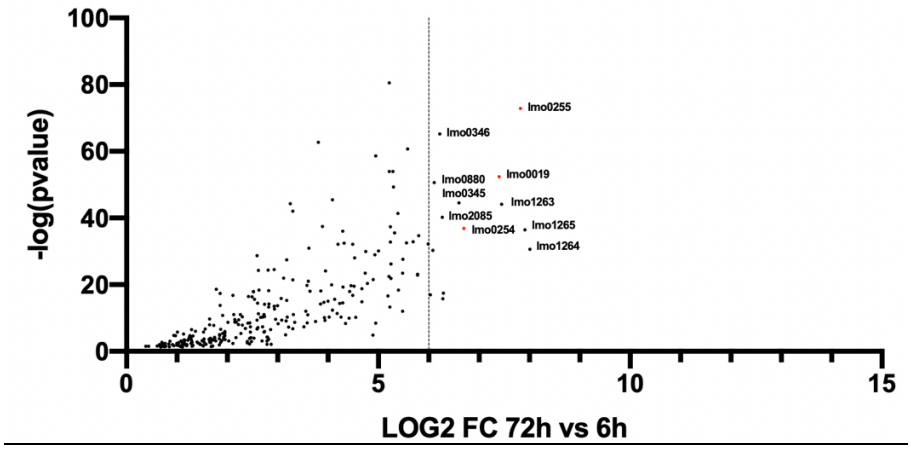


Figure 38 : Volcano plot des gènes sur-exprimés entre la condition 72 h et 6 h *p.i.* d'après les données RNAseq. Les gènes les plus exprimés spécifiquement lors de la condition 72 h *p.i.* sont annotés directement sur le graphique. L'axe des abscisses représente le log2 Fold Change (FC) entre 72 h et 6 h *p.i.*. L'axe des ordonnées représente le -log10 de la p-value de la différence d'expression entre 72 h et 6 h *p.i.*. Le seuil de LOG2FC égal à 6 est représenté.

Parmi les gènes retenus, trois candidats *lmo0019*, *lmo0254* et *lmo1263* codaient des protéines de fonction inconnue. Néanmoins, en amont de ces gènes, nous avons trouvé des motifs prédits de fixation de régulateurs, ArgR dans la séquence promotrice de *lmo0254* (ArgR est un régulateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme de l'arginine et qui joue un rôle dans la tolérance à l'acidité de *Lm*) (Cheng et al., 2017) et SigB dans la séquence promotrice de *lmo0019*. Lmo0019 est une hydrolase de la paroi bactérienne avec un domaine SH3 dont le gène est exprimé en présence de bactériocine d'après la littérature) (Desvaux et al., 2010 ; Laursen et al., 2014). Lmo0254 est une protéine à la fonction inconnue et dont le gène semble être organisé en opéron avec *lmo0255*, *lmo0256* et *lmo0257*. Lmo1263 est un régulateur transcriptionnel dont la fonction est inconnue. Le gène monocistronique *alsS* code pour l'α-acétolactate synthase (ALS). L'ALS condense deux molécules de pyruvate pour produire l'α-acétolactate (ALD) tout en consommant un proton, puis l'α-acétolactate décarboxylase décarboxyle l'ALD pour former de l'acétoïne *via* la consommation d'un second proton, ce qui permet de contribuer à la survie dans les environnements acides (Xiao & Xu, 2007 ; Arcari et al., 2020).

Pour l'étude de ces gènes "senseurs", nous avons choisi une approche par fusion transcriptionnelle en utilisant le vecteur pPL2-P*actA*-RFP (**Figure 39**) disponible au laboratoire (Lauer et al., 2002). Le promoteur d'*actA* a été remplacé par les promoteurs natifs des gènes

cibles, définis par la région intergénique entre le gène en amont et le gène cible, en incluant le codon stop du gène précédent et le *Ribosome-binding site* (RBS) du gène cible. Le vecteur a été électroporé dans la souche WT-EGDe et l'intégration a été confirmée par PCR avec les primers PL95 et PL102, spécifiques de pPL2 (Lauer et al., 2002).

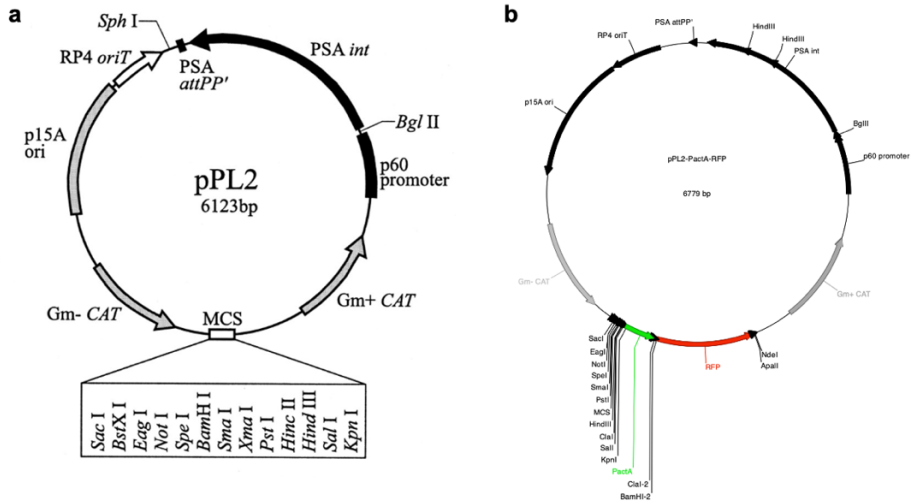


Figure 39 : Cartes des plasmides pPL2 (a) et pPL2-PactA-RFP (b) (d'après Lauer et al., 2002 ; Zeldovich et al., 2011 ; Portman et al., 2017).

Nous avons ensuite testé les différentes souches dans des conditions extracellulaires (dans du BHI jusqu'en phase exponentielle DO=1 et phase stationnaire) puis dans des conditions intracellulaires dans notre modèle trophoblastique JEG-3 après 6 h et 72 h d'infection, en microscopie avec le témoin négatif EGD-e pPL2 vide et le témoin positif 10403S-P*actA*-RFP dont l'expression est induite dès 6 h *p.i.*

Comme représenté en **Figure 40**, nous n'avons pas observé d'expression significativement différente de la RFP spécifiquement dans les LisCV, comparé au témoin négatif EGD-e pPL2-vide, quelques soient les promoteurs choisis. La faible intensité de la RFP observée semble être la conséquence d'une fluorescence aspécifique dans le canal Cy3.

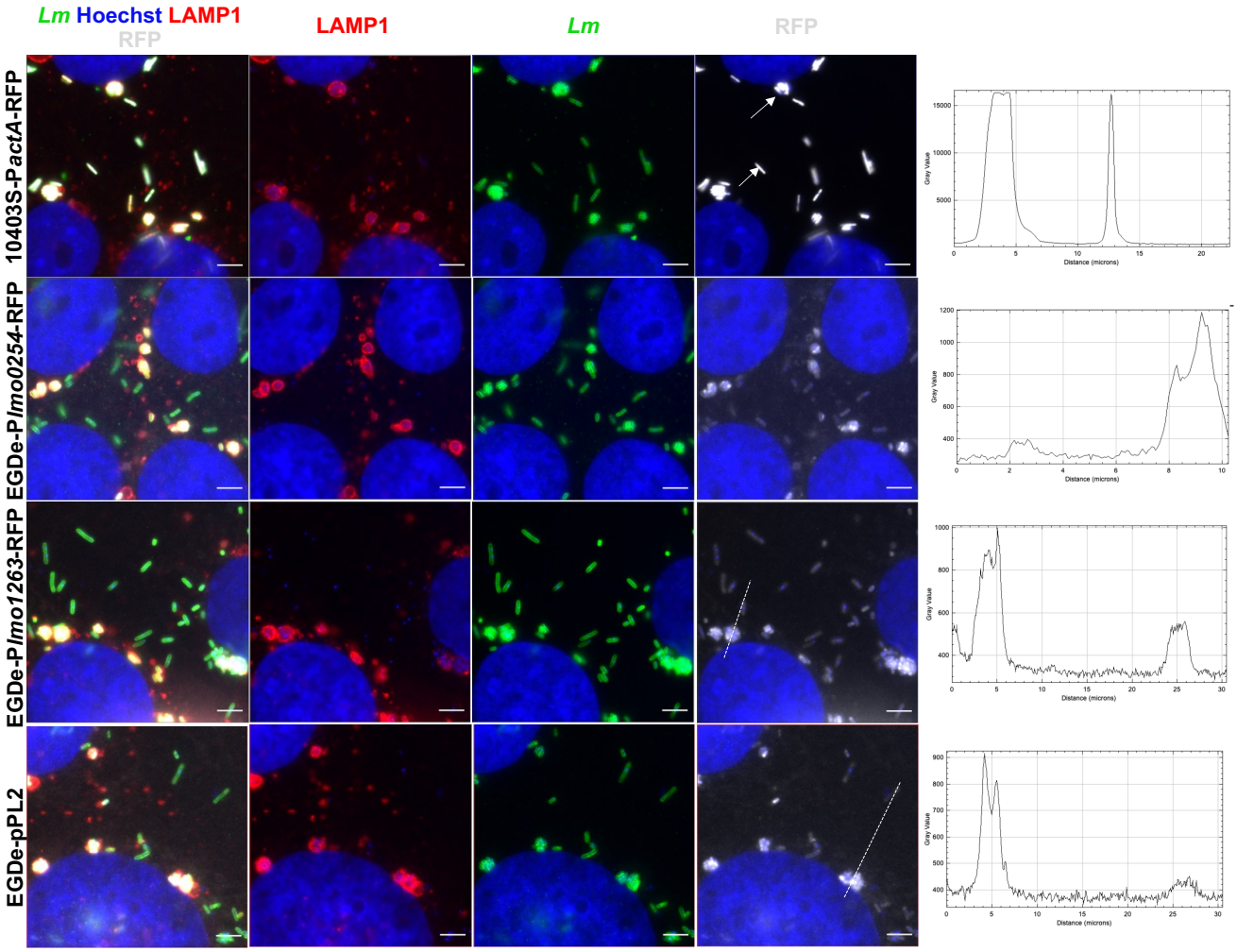


Figure 40 : Exemples des souches EGDe-P*lmo0254*-RFP et EGDe-P*lmo1263*-RFP après 72h d'infection dans le modèle cellulaire JEG-3. Les noyaux cellulaires sont en bleus, les bactéries en vertes, le marquage LAMP1 en rouge et la RFP en blanc. Les graphiques associés représentent l'intensité fluorescente de la RFP le long d'un segment représenté sur le canal RFP. Ce segment coupe à la fois des bactéries au sein d'une vacuole et des bactéries cytosoliques. 10403S-P*actA*-RFP et EGDe- pPL2 sont respectivement les contrôles positifs et négatifs.

Cette absence de détection pourrait s'expliquer par une expression relativement faible des gènes mis en évidence dans les conditions vacuolaires (liée à un état de dormance des *Listeria*) et dont l'expression serait insuffisante pour être détectée par immunofluorescence. Nous pourrions tester d'autres gènes rapporteurs notamment la GFP ou d'autres marqueurs. D'autres catégories fonctionnelles de gènes mériteraient notre attention notamment la catégorie des ABC transporteurs, des gènes du métabolisme carboné ainsi que les gènes codant pour des facteurs de transcription.

CONCLUSIONS & DISCUSSION

Listeria monocytogenes : un modèle des pathogènes intracellulaires cytosoliques

Listeria monocytogenes et ses stratégies d'infection cellulaire ont fait l'objet de nombreuses études depuis les 40 dernières années. Elle s'illustre aujourd'hui en tant que bactérie modèle des pathogènes intracellulaires, en particulier cytosoliques. Si les mécanismes associés à son cycle d'infection précoce et sa dissémination dans l'organisme sont bien caractérisés, de nouvelles études continuent d'émerger et identifient de nouveaux stratagèmes et déterminants moléculaires utilisés par *Listeria* pour s'adapter aux différentes niches écologiques. C'est un modèle qui a contribué à de nombreuses avancées dans différents domaines, notamment l'épigénétique et la microbiologie cellulaire. Pourtant, la vie intracellulaire de *Lm* n'est pas limitée au cytosol et plusieurs travaux ont mis en lumière les vies intra-vacuolaires de *Lm*.

La vie bimodale de *Listeria monocytogenes* : la fin du paradigme

Les premiers travaux datent de 1998, où l'équipe de Bhardwaj et al., a observé des *Lm* dans de larges vacuoles à simple membrane dans des macrophages hépatiques, après 3 semaines d'infection dans des souris immunodéprimés. Ces résultats ont été confirmés en 2008, avec la caractérisation de ces vacuoles larges vacuoles, les SLAP pour *Spacious* Listeria-*containing phagosome* (Birmingham et al., 2008). Ce sont des phagosomes qui dérivent de la vacuole primaire d'entrée, qui piègent un sous-ensemble de bactéries produisant une faible quantité de LLO. Ces compartiments ne maturent pas en phagolysosome et conservent un pH neutre, ce qui constitue une niche de persistance pour *Lm* dans les macrophages. Depuis, l'observation d'autres vacuoles ont émergées, notamment les LisCV (Listeri*a-containing vacuole*) (Kortebi et al., 2017), les eSLAP (Peron-Cane et al., 2020) et les rSLAP (Tran et al., 2020). Les SLAP et rSLAP ont été observées dans des macrophages murins, les eSLAP observées dans un modèle épithélial et les LisCV, observées dans des hépatocytes humains et une lignée trophoblastique. Les LisCVssont très caractéristiques, contrairement aux autres vacuoles elles ne dérivent pas de la vacuole d'entrée ou vacuole primaire mais apparaissent après une étape de dissémination active dans le cytosol, lors de la phase tardive de l'infection. Avec les SLAP, les LisCV peuvent être considérées comme des vacuoles de persistance qui contiennent des bactéries à croissance lente. Les eSLAP et rSLAP sont des vacuoles de transition qui précèdent soit un relargage de *Lm* dans le cytosol, soit leur dégradation. La genèse des LisCV et les mécanismes impliqués dans la survie des *Lm* intra-vacuolaires restent à caractériser. Néanmoins, le processus de formation des LisCV est ActA-dépendant. Après la phase de dissémination active, les bactéries cessent de synthétiser ActA à leur surface avant de se faire incorporer dans les LisCV. De plus,

le mutant de délétion *Lm*-Δ*actA* entre plus efficacement dans les LisCV au cours de l'infection, avec la formation de vacuoles plus grosses. Ce modèle a également permis l'observation de certaines bactéries dans un autre état dit Viable but not cultivable (VBNC), c'est à dire indétectable par les tests de diagnostics classiques basés sur la croissance sur des milieux de culture conventionnels et dans lequel les bactéries conservent la capacité de se répliquer à nouveau lors de conditions spécifiques ("résurrection").

Lors de ma thèse, nous avons rédiger une revue faisant un état de l'art sur l'induction de l'état VBNC chez *Lm*, dans des conditions extra- et intracellulaires. Nous y présentons également les problématiques associées pour l'hôte ainsi que plusieurs arguments en faveur de lien possible entre l'existence de l'état VBNC intracellulaire et le portage asymptomatique du pathogène. Cette revue permet de prendre conscience de l'omniprésence de *Lm* dans l'environnement, en particulier sous la forme VBNC qui suggère une forte sous-estimation de la présence et de la quantité du pathogène dans l'environnement et chez l'hôte. Il s'agirait de développer ou de standardiser l'utilisation de tests de détection plus sensibles et permettant la détection des formes VBNC afin d'étudier leur impact sur la santé de l'hôte et leur rôle dans la dissémination de l'organisme dans l'environnement (Lotoux et al., 2022).

Notre hypothèse est que les bactéries peuvent survivre dans cet état de "dormance" (incluant la forme VBNC) au sein de ces vacuoles dans les tissus des organismes et constituer un risque en cas de réveil pour les individus infectés, de façon analogue à la latence du pathogène *Mycobacterium tuberculosis* (Bierne et al., 2018). De plus, cet état pourrait contribuer au portage asymptomatique du pathogène, observé à la fois chez l'homme et les animaux, et qui participe à sa dissémination dans l'environnement (Maury et al., 2019 ; Hafner et al., 2021). En effet, la phase asymptomatique de la listériose invasive (ou période d'incubation) peut être longue, en particulier lorsqu'elle est associée à une grossesse (jusqu'à 3 mois) (Goulet et al., 2013 ; Lotoux et al., 2022). Les mécanismes de portage asymptomatique ainsi que les temps d'incubation long de la listériose invasive chez la femme enceinte sont mal compris. Des travaux expérimentaux des années 1950, obtenues après infection de lapines gestantes, ont montré des avortements spontanés après inoculation mais également après une seconde gestation sans autre inoculation, ce qui suggère que *Lm* pourrait persister dans l'appareil reproducteur sans signe de maladie pour l'hôte mais en conservant son pouvoir pathogène rendant possible le déclenchement d'une nouvelle infection.

La formation des LisCV est une propriété intrinsèque de *Listeria monocytogenes*

Lors de mon arrivée dans le laboratoire, le phénotype de formation des LisCV avait été observé pour deux souches modèles de laboratoire à savoir EGD-e et 10403S. Ces souches utilisées jusqu'alors appartiennent à la lignée II et aux complexes clonaux CC9 (EGD-e) et CC7 (10403S). Or, les CC9 font partie des complexes clonaux majoritairement retrouvés parmi les isolats alimentaires, et plus rarement parmi les cas cliniques, contrairement à certains CC de la lignée I comme les CC1, 2, 4 et 6, majoritairement retrouvés dans des cas de listériose et dites "hyper-virulentes" dans des modèles expérimentaux murins (Maury et al., 2016). Il nous paraissait important de prendre en compte la variabilité génétique de l'espèce pathogène Listeria monocytogenes dans le phénotype de persistance des LisCV.

La première étape de mon travail a donc été de cribler un ensemble de 71 souches représentatives de la diversité génétique de l'espèce *Lm* et de caractériser le phénotype de formation des LisCV. Nous avons choisi des souches appartenant aux deux lignées principales de l'espèce, couvrant 22 différents complexes clonaux et de différentes origines (aliments, cas cliniques humains et animaux, environnements de ferme et agro-alimentaire). Nous avons mis au point, dans un modèle de cellules épithéliales trophoblastiques, un protocole de criblage efficace pour l'étude de l'invasion, de la dissémination lors des temps précoces et de la formation des LisCV lors d'infection prolongée, par CFU et IF.

Nous avons observé une grande variabilité dans les capacités d'invasion, cohérente avec différentes formes de InlA des souches de la collection, en particulier pour les souches CC9 et CC121 dont la quasi-totalité présente une protéine tronquée non fonctionnelle. Nous avons aussi observé que la majorité des souches formaient des LisCV quelques soient l'origine, la lignée ou le complexe clonal. La formation des vacuoles semble donc être une propriété générale intrinsèque de l'espèce *Lm*. Nous insistons sur le fait que même les souches hypo-invasives, appartenant à des CC dont les isolats sont rarement retrouvés dans des cas de listériose et présentant une InlA tronquée, sont capables une fois rentrées, de se répliquer et de disséminer dans la cellule aussi efficacement qu'une souche WT. Si les données décrivant les souches appartenant aux complexes clonaux CC9 et CC121 dans des modèles *in vivo*, proposent qu'elles soient généralement associées à des souches hypo-virulentes, nos données suggèrent qu'elles conservent un potentiel infectieux important, comparable à celle d'une souche virulente. Nous avons également testé 4 souches de *Listeria ivanovii*, espèce pathogène des animaux. Des données préliminaires suggèrent que ces souches forment des vacuoles. La formation des LisCV pourrait être associée à la virulence des bactéries pathogènes du genre *Listeria*. Il

pourrait également être pertinent de tester une souche non pathogène de *Listeria innocua*, possédant le locus LIPI-1 et le locus d'invasion, afin d'étudier la capacité d'une telle souche à former des LisCV.

Identification de déterminants bactériens impliqués dans la formation des LisCVs

Même si la majorité des souches CC9 et CC121 qui présentent une protéine InlA tronquée sont capables de former des LisCV comme la souche WT, nous avons identifié 4 variants affectés à différents stades du cycle infectieux et conduisant à des phénotypes hypo- ou hyper-persistants. Ces résultats suggèrent que les souches portant une InlA tronquée, rarement retrouvées dans des cas cliniques mais fréquemment dans les aliments, pouvaient accumuler des mutations conduisant à la perte de facteurs bactériens importants pour les étapes clés de l'infection au fil de leur évolution, en particulier la formation des LisCV.

Nous avons réalisé un second criblage avec 35 souches CC9 et CC121. Au total, sur 106 souches testées, nous avons identifié 4 variants appartenant au CC9 ou CC121, présentant des altérations dans leur capacité à se multiplier et à former des LisCV dans notre modèle.

Les variants V1 et V2 présentaient des défauts de réplication observés dès les phases précoces de l'infection, correspondant à la sortie de la vacuole d'entrée et à la dissémination intra- et intercellulaire avec une mutation dans le gène *hly* et une délétion du gène *gshF*, respectivement. Les mutations n'ont pas été décrites précédemment mais correspondent à des gènes de virulence déjà connus, ce qui nous a permis de valider notre hypothèse de retrouver plus fréquemment des mutations ou la perte de gènes importants pour la virulence parmi des souches contre-sélectionnées pour l'infection de l'hôte. De façon surprenante, nous n'avons pas remarqué de mutations dans *prfA* généralement observées dans des souches non hémolytiques (Maury et al., 2017), ce qui atteste d'une grande conservation des gènes de virulence parmi l'espèce pathogène *Lm*. Pour les variants V3 et V4, les défauts de réplication ont été observés à des phases tardives de l'infection (après 24 h d'infection). Ces variants ont la particularité d'être moins associés aux LisCV, plus associés à l'actine, présentent plus d'ActA à leur surface spécifiquement lors des phases tardives. De plus, V3 et V4 présentent un défaut de polymérisation de l'actine avec moins de comètes et plus de nuage autour des bactéries, ce qui suggère une dérégulation de la migration d'ActA au vieux pôle de la bactérie. Nous avons mis en évidence que ces variants avaient en commun plusieurs mutations ponctuelles dans des gènes dont les fonctions n'ont pas été liées à la virulence jusqu'alors, en particulier *ftsA*, gène essentiel du *core genome*, qui code

pour une protéine du divisome. Le lien potentiel entre les mutations observées notamment dans *ftsA* et l'association à l'actine est en cours d'étude. Il est clair que l'activation d'ActA joue un rôle essentiel dans le phénotype LisCV, mais le niveau de régulation impliqué n'a pas été mis en évidence à ce jour. Parmi les autres mutations communes à V3 et V4, on trouve également le gène *lmo0224* (*folP*) impliqué dans la biosynthèse du folate ; *lmo1845* (*pbuO*) qui code pour une perméase de la guanine et de l'hypoxanthine ; *lmo1915* (*maeA/mleS*) qui code pour une malate déshydrogénase (oxaloacetate décarboxylante) et enfin le gène *lmo2667* (*mtlF*) qui code pour une enzyme du PTS impliquée dans le transport et le métabolisme du D-arbitol. Nous avons cherché à complémenter les mutations soit par réintroduction, par recombinaison homologue d'une copie de la région WT dans les variants, soit par complémentation *en trans*. Le gène *ftsA* étant essentiel, nous ne sommes pas parvenus à introduire l'allèle. Néanmoins, nous avons tenté de complémenter le variant par expression constitutive du gène *ftsA*-WT sous le promoteur Phyper (promoteur fort). De plus, nous nous sommes intéressés à l'expression différentielle de ces gènes entre la souche WT et les variants, dans des conditions intracellulaires (6 h et 72 h *p.i.*) par RT-qPCR. Ces résultats sont en cours d'analyses.

L'approche transcriptomique comme outil d'identification de gènes impliqués dans la formation des LisCV

Nous avons également choisi une approche transcriptomique, avec le modèle bactérien EGDe-Δ*actA*, qui rentre plus efficacement dans les LisCV durant l'infection et qui présente un phénotype plus homogène que la souche parentale, avec la quasi-totalité des bactéries retrouvées dans les LisCV après 3 jours d'infection. Nos données obtenues aux temps d'infection précoces (6 h *p.i.*) montraient une induction de l'expression des gènes de virulence du locus LIPI-1, du locus d'invasion *inlAB* et des gènes associés au métabolisme carboné intracellulaire (*uhpT*, *glpK*). Ces données étaient cohérentes avec les données transcriptomiques intracellulaires retrouvées dans la littérature (Chatterjee et al., 2006 ; Schultze et al., 2015). Les données obtenues lors des phases tardives de l'infection (72 h p.i.) correspondent aux premières données disponibles. L'observation majeure est une reprogrammation importante de l'expression des gènes entre les conditions intracellulaires précoces et tardives. Les gènes exprimés lors de la condition LisCV sont majoritairement associées à la réponse au stress et la réponse SOS, et montrent une baisse de l'activité métabolique générale, en lien avec l'état réplicatif ralenti des bactéries intra-vacuolaires observé en microscopie à épifluorescence et en microscopie électronique. Quelques catégories de gènes ont retenu notre attention. 17 protéines

LPXTG étaient exprimées spécifiquement durant la phase LisCV, ainsi que les gènes associés à la biosynthèse du flagelle, les gènes du prophage A118, les gènes appartenant au régulon sigmaB et certains gènes de fonctions inconnues. Nous avons tenté d'évaluer le rôle de ces gènes par des approches de génération de mutants de délétion et par fusions transcriptionnelles. Il était déjà connu que les gènes associés au flagelle et au prophage étaient exprimés dans des conditions de stress, mais nous avons considéré qu'ils pouvaient être des "senseurs" de la vie vacuolaire. Néanmoins, nous ne sommes pas parvenus a confirmé un rôle potentiel des gènes candidats dans la biogénèse LisCV ou dans la survie des bactéries intra-vacuolaires. Beaucoup de données restent à exploiter notamment des facteurs de transcription exprimés dans les conditions vacuolaires, les gènes associés au métabolisme carboné ainsi que les gènes qui codent pour des ABC transporteurs. L'idéal serait de confronter notre jeu de données avec d'autres RNA-seq réalisés à partir d'autres modèles cellulaires, en particulier des modèles primaires, afin de mettre en évidence les mécanismes spécifiques de la formation des LisCV par *Lm*.

Perspectives des travaux de thèse

Nous avons mis en place un protocole de criblage et d'analyses de génomique comparative qui a permis de mettre en évidence de la perte, le gain ou des mutations dans les régions codantes du génome. Il serait également intéressant de prendre en compte les régions inter-géniques non codantes ainsi que les éléments génétiques mobiles (MGE). En effet, certaines souches peuvent être porteuses de plasmides ou d'autres MGE qui pourraient moduler leur virulence. Récemment, le plasmide pLMST6 a été observé parmi des souches de *Lm* ST6 fréquemment isolés de cas de méningites (Kremer et al., 2017). Ce plasmide, parmi d'autres (pLM80 qui comprend la cassette de résistance au benzalkonium chloride (BC) *bcrABC,* ou pLM5578), confère également une tolérance aux produits de désinfection appartenant à la famille des QACs. (Elhanafi et al., 2010 ; Kremer et al., 2017 ; Kropac et al., 2019). Les souches porteuses de pLMST6 provoquent également une mortalité accrue chez le poisson zèbre, ce qui suggère un rôle dans la pathogénicité des gènes portés par ce plasmide (Kropac et al., 2019). Outre les plasmides, d'autres MGE comme les transposons (*Tn6188*, *Tn542* ou *Tn554-like*) ou les prophages peuvent porter des gènes importants pour la résistance aux désinfectants (Müller et al., 2013 ; Palma et al., 2020 ; Guidi et al., 2021) et donc indirectement contribuer à leur persistance dans les ateliers de production (Castro et al., 2021). Comme pour la persistance dans

l'environnement, certains MGE pourraient contribuer à la régulation de la persistance intracellulaire.

Notre méthode a été réalisée *in vitro* dans un modèle de cellules épithéliales trophoblastiques JEG-3, dont l'invasion par *Lm* est InlA-dépendante. Il serait intéressant d'observer les phénotypes des variants observés dans d'autres modèles cellulaires, notamment des modèles hépatocytaires (Descoeudres et al., 2021) ou des modèles *in vivo*. Cependant, le choix d'un modèle *in vivo* pertinent pour l'étude de l'infection par *Lm* n'est pas chose évidente (Lecuit et al., 2020 ; Kammoun et al., 2022). Concernant l'étude du tropisme placentaire de *Lm*, les travaux pionniers ont été réalisé chez le cochon d'inde et le lapin, ayant des périodes de gestation courte et beaucoup de petits par portés. En particulier, des expériences chez les lapins ont suggéré que *Lm* pourrait persister dans l'appareil génital féminin sans aucun signe de maladie et pourrait par la suite réinitialiser l'infection au cours des gestations successives (Gray et al., 1963). Des études récentes réalisées chez des femelles macaques gestantes révèlent des interruptions de grossesse précoces survenues après une infection orale par *Lm.* De plus, non seulement le placenta, mais également le tractus génital maternel étaient infectés (Wolf et al., 2019). Ces différents modèles peuvent être intéressants pour l'étude de la potentielle persistance de *Lm* dans les tissus de l'appareil reproducteur et de son effet potentiel sur les gestations qui suivent une première inoculation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. & Rørvik, L. M. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 57–63 (2000).

Abram, F. *et al.* Identification of Components of the Sigma B Regulon in *Listeria monocytogenes* That Contribute to Acid and Salt Tolerance. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6848–6858 (2008).

Aké, F. M. D., Joyet, P., Deutscher, J. & Milohanic, E. Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* **81**, 274–293 (2011).

Alexander, A. V., Walker, R. L., Johnson, B. J., Charlton, B. R. & Woods, L. W. Bovine abortions attributable to Listeria ivanovii : four cases (1988-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **200**,.

Allende, A. *et al.* Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFS2* **16**, (2018).

Allerberger, F. & Wagner, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 16–23 (2010).

Alvarez, D. E. & Agaisse, H. The Metalloprotease Mpl Supports Listeria monocytogenes Dissemination through Resolution of Membrane Protrusions into Vacuoles. *Infect Immun* **84**, 1806–1814 (2016).

Angelakis, E. & Raoult, D. Q fever. *Veterinary Microbiology* **140**, 297–309 (2010).

Angelo, K. M., Jackson, K. A., Wong, K. K., Hoekstra, R. M. & Jackson, B. R. Assessment of the Incubation Period for Invasive Listeriosis: Table 1. *Clin Infect Dis.* **63**, 1487–1489 (2016).

Anwar, T. M. *et al.* Genetic diversity, virulence factors, and antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes from food, livestock, and clinical samples between 2002 and 2019 in China. *International Journal of Food Microbiology* **366**, 109572 (2022).

Arcari, T., Feger, M.-L., Guerreiro, D. N., Wu, J. & O'Byrne, C. P. Comparative Review of the Responses of Listeria monocytogenes and Escherichia coli to Low pH Stress. *Genes* **11**, 1330 (2020).

Archer, D. L. The evolution of FDA's policy on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in the United States. *Current Opinion in Food Science* **20**, 64–68 (2018).

Arnaud, M., Chastanet, A. & Débarbouillé, M. New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6887–6891 (2004).

Arvaniti, M., Tsakanikas, P., Papadopoulou, V., Giannakopoulou, A. & Skandamis, P. Listeria monocytogenes Sublethal Injury and Viable-but-Nonculturable State Induced by Acidic Conditions and Disinfectants. *Microbiol Spectr* **9**, e01377-21 (2021).

Aslan, H. *et al.* Activation of the Two-Component System LisRK Promotes Cell Adhesion and High Ampicillin Tolerance in Listeria monocytogenes. *Front. Microbiol.* **12**, 618174 (2021).

Ayrapetyan, M., Williams, T. & Oliver, J. D. Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *J Bacteriol* **200**, (2018).

Bagatella, S., Tavares-Gomes, L. & Oevermann, A. Listeria monocytogenes at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. *Vet Pathol.* **59**, (2022).

Bajor, A. *et al.* Listeria monocytogenes endophthalmitis – case report and review of risk factors and treatment outcomes. *BMC Infect Dis* **16**, 332 (2016).

Bakardjiev, A. I., Stacy, B. A., Fisher, S. J. & Portnoy, D. A. Listeriosis in the Pregnant Guinea Pig: a Model of Vertical Transmission. *Infect Immun* **72**, 489–497 (2004).

Bakardjiev, A. I., Stacy, B. A. & Portnoy, D. A. Growth of Listeria monocytogenes in the Guinea Pig Placenta and Role of Cell-to-Cell Spread in Fetal Infection. *J INFECT DIS* **191**, 1889–1897 (2005).

Balaban, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol* **17**, 441–448 (2019).

Balandyté, L., Brodard, I., Frey, J., Oevermann, A. & Abril, C. Ruminant Rhombencephalitis-Associated Listeria monocytogenes Alleles Linked to a Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Complex. *Appl Environ Microbiol* **77**, 8325–8335 (2011).

Balwit, J. M., Langevelde, P. v., Vann, J. M. & Proctor, R. A. Gentamicin-Resistant Menadione And Hemin Auxotrophic Staphylococcus Aureus Persist Within Cultured Endothelial Cells. *Journal of Infectious Diseases* **170**, 1033–1037 (1994).

Beauclair, J., Gardia, C., Heye, P., Metay, M. & Gauter, J. Fiche pratique de sécurité ED 106. (2011).

Bécavin, C. *et al.* Comparison of Widely Used Listeria monocytogenes Strains EGD, 10403S, and EGD-e Highlights Genomic Differences Underlying Variations in Pathogenicity. *mBio* **5**, e00969-14 (2014).

Becker, L. A., Etin, M. S. C., Hutkins, R. W. & Benson, A. K. Identification of the Gene Encoding the Alternative Sigma Factor □B from Listeria monocytogenes and Its Role in Osmotolerance. *J. BACTERIOL.* **180**, (1998).

Begley, M., Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. & Hill, C. Contribution of Three Bile-Associated Loci, *bsh* , *pva* , and *btlB* , to Gastrointestinal Persistence and Bile Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **73**, 894–904 (2005).

Begley, M., Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. Glutamate Decarboxylase-Mediated Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 6541–6546 (2010).

Belias, A., Sullivan, G., Wiedmann, M. & Ivanek, R. Factors that contribute to persistent Listeria in food processing facilities and relevant interventions: A rapid review. *Food Control* **133**, 108579 (2022).

Benvenuti, S. & Comoglio, P. M. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J. Cell. Physiol.* **213**, 316–325 (2007).

Beresford, M. R., Andrew, P. W. & Shama, G. Listeria monocytogenes adheres to many materials found in food-processing environments: LISTERIAL ADHESION TO SURFACES. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 1000–1005 (2001).

Bergmann, S., Rohde, M., Schughart, K. & Lengeling, A. The bioluminescent Listeria monocytogenes strain Xen32 is defective in flagella expression and highly attenuated in orally infected BALB/cJ mice. *Gut Pathog* **5**, 19 (2013).

Bernier, S. P. & Surette, M. G. Concentration-dependent activity in natural environments. *Front. Microbio.* **4**, (2013).

Bertsch, D. *et al.* Listeria fleischmannii sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 526–532 (2013).

Besnard, V., Federighi, M. & Cappelier, J. M. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*: dvc procedure in listeria monocytogenes. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 77–81 (2000).

Betriu, C., Fuentemilla, S., Méndez, R., Picazo, J. J. & García-Sánchez, J. Endophthalmitis Caused by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **39**, 2742–2744 (2001).

Bhardwaj, V., Kanagawa, O., Swanson, P. E. & Unanue, E. R. Chronic Listeria Infection in SCID Mice: Requirements for the Carrier State and the Dual Role of T Cells in Transferring Protection or Suppression. *The Journal of Immunology* **160**, 376–384 (1998).

Bierne, H. *et al.* Inactivation of the srtA gene in Listeria monocytogenes inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* **43**, 869–881 (2002).

Bierne, H. & Cossart, P. Listeria monocytogenes Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 377–397 (2007).

Bierne, H., Milohanic, E. & Kortebi, M. To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double Life of Listeria monocytogenes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 136 (2018).

Bigger, J. W. Treatment of Staphylococcal infections with penicillin. *The Lancet* 497–500 (1944).

Birmingham, C. L. *et al.* Listeria monocytogenes Evades Killing by Autophagy During Colonization of Host Cells. *Autophagy* **3**, 442–451 (2007).

Birmingham, C. L. *et al.* Listeriolysin O allows Listeria monocytogenes replication in macrophage vacuoles. *Nature* **451**, 350–354 (2008).

Boura, M. *et al.* Loss of SigB in Listeria monocytogenes Strains EGD-e and 10403S Confers Hyperresistance to Hydrogen Peroxide in Stationary Phase under Aerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol* **82**, 4584–4591 (2016).

Braun, L. *et al.* InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular Microbiology* **25**, 285–294 (1997).

Brenner, M. *et al.* Listeria monocytogenes TcyKLMN Cystine/Cysteine Transporter Facilitates Glutathione Synthesis and Virulence Gene Expression. *mBio* **13**, e00448-22 (2022).

Brosch, R., Buchrieser, C. & Rocourt, J. Subtyping of Listeria monocytogenes serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Research in Microbiology* **142**, 667–675 (1991).

Brosch, R., Chen, J. & Luchansky, J. B. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for Listeria monocytogenes and their correlation with serovar. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2584–2592 (1994).

Buchrieser, C., Brosch, R., Catimel, B. & Rocourt, J. Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can. J. Microbiol.* **39**, 395–401 (1993).

Burall, L. S., Grim, C. J., Mammel, M. K. & Datta, A. R. A Comprehensive Evaluation of the Genetic Relatedness of Listeria monocytogenes Serotype 4b Variant Strains. *Front. Public Health* **5**, 241 (2017).

Bussi, C. & Gutierrez, M. G. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiology Reviews* **43**, 341–361 (2019).

Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L. & Cossart, P. Surface proteins and the pathogenic potential of Listeria monocytogenes. *Trends in Microbiology* **10**, 238–245 (2002).

Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P. & Cossart, P. Auto, a surface associated autolysin of Listeria monocytogenes required for entry into eukaryotic cells and virulence: Auto, a Listeria autolysin involved in virulence. *Molecular Microbiology* **51**, 1601–1614 (2004).

Cabanes, D. *et al.* Gp96 is a receptor for a novel Listeria monocytogenes virulence factor, Vip, a surface protein. *EMBO J* **24**, 2827–2838 (2005).

Camejo, A. *et al.* The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* **2**, 379–394 (2011).

Cappitelli, F., Polo, A. & Villa, F. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. *Food Eng Rev* **6**, 29–42 (2014).

Carlin, C. R. *et al.* Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel *Listeria sensu stricto* Species, *L. swaminathanii*. *Microbiol Spectr* **10**, e00442-22 (2022).

Carlin, C. R., Roof, S. & Wiedmann, M. Assessment of Reference Method Selective Broth and Plating Media with 19 Listeria Species Highlights the Importance of Including Diverse Species in Listeria Method Evaluations. *Journal of Food Protection* **85**, 494–510 (2022).

Carpentier, B. & Cerf, O. Review — Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* **145**, 1–8 (2011).

Carvalho, F., Sousa, S. & Cabanes, D. How Listeria monocytogenes organizes its surface for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).

Carvalho, F. *et al.* L-Rhamnosylation of Listeria monocytogenes Wall Teichoic Acids Promotes Resistance to Antimicrobial Peptides by Delaying Interaction with the Membrane. *PLoS Pathog* **11**, e1004919 (2015).

Castanheira, S. & García-del Portillo, F. Salmonella Populations inside Host Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 432 (2017).

Castro, H., Douillard, F. P., Korkeala, H. & Lindström, M. Mobile Elements Harboring Heavy Metal and Bacitracin Resistance Genes Are Common among Listeria monocytogenes Strains Persisting on Dairy Farms. *mSphere* **6**, e00383-21 (2021).

Cemma, M., Lam, G. Y., Stöckli, M., Higgins, D. E. & Brumell, J. H. Strain-Specific Interactions of Listeria monocytogenes with the Autophagy System in Host Cells. *PLoS ONE* **10**, e0125856 (2015).

Chakraborty, T. *et al.* Coordinate regulation of virulence genes in Listeria monocytogenes requires the product of the prfA gene. *J Bacteriol* **174**, 568–574 (1992).

Challan Belval, S. *et al.* Assessment of the Roles of LuxS, *S* -Ribosyl Homocysteine, and Autoinducer 2 in Cell Attachment during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2644–2650 (2006).

Charlier, C. *et al.* Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* **17**, 510–519 (2017).

Charlier, C., Disson, O. & Lecuit, M. Maternal-neonatal listeriosis. *Virulence* **11**, 391–397 (2020).

Chatterjee, S. S. *et al.* Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in Listeria monocytogenes serotype strains. *International Journal of Medical Microbiology* **296**, 277–286 (2006).

Chatterjee, S. S. *et al.* Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **74**, 1323–1338 (2006).

Chaturongakul, S. *et al.* Transcriptomic and Phenotypic Analyses Identify Coregulated, Overlapping Regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the Alternative Sigma Factors σ^B, σ^C, σ^H, and σ^L in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 187–200 (2011).

Chen, M. *et al.* Isolation, Potential Virulence, and Population Diversity of Listeria monocytogenes From Meat and Meat Products in China. *Front. Microbiol.* **10**, 946 (2019).

Chen, Y. *et al.* Core Genome Multilocus Sequence Typing for Identification of Globally Distributed Clonal Groups and Differentiation of Outbreak Strains of Listeria monocytogenes. *Appl Environ Microbiol* **82**, 6258–6272 (2016).

Chen, Y. *et al.* Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Isolated From Three Commercial Tree Fruit Packinghouses and Evidence of Persistent and Transient Contamination. *Front. Microbiol.* **12**, 756688 (2022).

Chenal-Francisque, V. *et al.* Worldwide Distribution of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1110–1112 (2011).

Cheng, C. *et al.* Listeria monocytogenes 10403S Arginine Repressor ArgR Finely Tunes Arginine Metabolism Regulation under Acidic Conditions. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).

Chiba, S. *et al.* Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches in vivo: Internalin B promotes entry into ileal PPs. *Microbiology and Immunology* **55**, 123–129 (2011).

Choe, J. E. & Welch, M. D. Actin-based motility of bacterial pathogens: mechanistic diversity and its impact on virulence. *Pathogens and Disease* **74**, ftw099 (2016).

Chong, R. *et al.* Regulatory Mimicry in Listeria monocytogenes Actin-Based Motility. *Cell Host & Microbe* **6**, 268–278 (2009).

Clayton, E. M. *et al.* Atypical Listeria innocua strains possess an intact LIPI-3. *BMC Microbiol* **14**, 58 (2014).

Codogno, P., Mehrpour, M. & Proikas-Cezanne, T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 7–12 (2012).

Conter, M. *et al.* Polymorphism of actA gene is not related to in vitro virulence of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology* **137**, 100–105 (2010).

Cossart, P. & Helenius, A. Endocytosis of Viruses and Bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, a016972–a016972 (2014).

Costa, A., Bertolotti, L., Brito, L. & Civera, T. Biofilm Formation and Disinfectant Susceptibility of Persistent and Nonpersistent *Listeria monocytogenes* Isolates from Gorgonzola Cheese Processing Plants. *Foodborne Pathogens and Disease* **13**, 602–609 (2016).

Costa, A. C., Pinheiro, J., Reis, S. A., Cabanes, D. & Sousa, S. Listeria monocytogenes Interferes with Host Cell Mitosis through Its Virulence Factors InlC and ActA. *Toxins* **12**, 411 (2020).

Cotter, P. D., Gahan, C. G. M. & Hill, C. A glutamate decarboxylase system protects Listeria monocytogenes in gastric fluid. *Mol Microbiol* **40**, 465–475 (2001).

Cotter, P. D., Ryan, S., Gahan, C. G. M. & Hill, C. Presence of GadD1 Glutamate Decarboxylase in Selected *Listeria monocytogenes* Strains Is Associated with an Ability To Grow at Low pH. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2832–2839 (2005).

Cotter, P. D. *et al.* Listeriolysin S, a Novel Peptide Haemolysin Associated with a Subset of Lineage I Listeria monocytogenes. *PLoS Pathog* **4**, e1000144 (2008).

da Silva, E. P. & De Martinis, E. C. P. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of Listeria monocytogenes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 957–968 (2013).

David, D. J., Pagliuso, A., Radoshevich, L., Nahori, M.-A. & Cossart, P. Lmo1656 is a secreted virulence factor of Listeria monocytogenes that interacts with the sorting nexin 6–BAR complex. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 9265–9276 (2018).

de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K. & Vázquez-Boland, J. A. Regulation of Listeria virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 118–127 (2011).

den Bakker, H. C., Bowen, B. M., Rodriguez-Rivera, L. D. & Wiedmann, M. FSL J1-208, a Virulent Uncommon Phylogenetic Lineage IV Listeria monocytogenes Strain with a Small Chromosome Size and a Putative Virulence Plasmid Carrying Internalin-Like Genes. *Appl Environ Microbiol* **78**, 1876–1889 (2012).

den Bakker, H. C. *et al.* Listeria floridensis sp. nov., Listeria aquatica sp. nov., Listeria cornellensis sp. nov., Listeria riparia sp. nov. and Listeria grandensis sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**, 1882–1889 (2014).

Desai, A. N., Anyoha, A., Madoff, L. C. & Lassmann, B. Changing epidemiology of Listeria monocytogenes outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases* **84**, 48–53 (2019).

Descoeudres, N. *et al.* An Immunomodulatory Transcriptional Signature Associated With Persistent Listeria Infection in Hepatocytes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 761945 (2021).

Dessaux, C., Guerreiro, D. N., Pucciarelli, M. G., O'Byrne, C. P. & García-del Portillo, F. Impact of osmotic stress on the phosphorylation and subcellular location of Listeria monocytogenes stressosome proteins. *Sci Rep* **10**, 20837 (2020).

Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Chambon, C. & Hébraud, M. Comprehensive Appraisal of the Extracellular Proteins from a Monoderm Bacterium: Theoretical and Empirical Exoproteomes of *Listeria monocytogenes* EGD-e by Secretomics. *J. Proteome Res.* **9**, 5076–5092 (2010).

Dhama, K. *et al.* Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly* **35**, 211–235 (2015).
Dill, J. A. & Rissi, D. R. Diagnostic Exercise: Suppurative Rhombencephalitis and Meningitis in a Goat. *Vet Pathol* **51**, 828–831 (2014).

Disson, O. *et al.* Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455**, 1114–1118 (2008).

Disson, O. *et al.* Peyer's patch myeloid cells infection by Listeria signals through gp38+ stromal cells and locks intestinal villus invasion. *Journal of Experimental Medicine* **215**, 2936–2954 (2018).

Disson, O., Moura, A. & Lecuit, M. Making Sense of the Biodiversity and Virulence of Listeria monocytogenes. *Trends in Microbiology* **29**, 811–822 (2021).

Doijad, S. P. *et al.* Listeria goaensis sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**, 3285–3291 (2018).

Domann, E. *et al.* A novel bacterial virulence gene in Listeria monocytogenes required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *The EMBO Journal* **11**, 1981–1990 (1992).

Domínguez-Bernal, G. *et al.* A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins: *Listeria ivanovii* -specific pathogenicity island. *Molecular Microbiology* **59**, 415–432 (2006).

Donovan, S. Listeriosis: a Rare but Deadly Disease. *Clinical Microbiology Newsletter* **37**, 135–140 (2015).

Dortet, L., Mostowy, S. & Cossart, P. Listeria and autophagy escape: Involvement of InlK, an internalin-like protein. *Autophagy* **8**, 132–134 (2012).

Dramsi, S. *et al.* Entry of Listeria monocytogenes into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**, 251–261 (1995).

Dreyer, M. *et al.* Listeria monocytogenes sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Sci Rep* **6**, 36419 (2016).

Driehuis, F., Wilkinson, J. M., Jiang, Y., Ogunade, I. & Adesogan, A. T. Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science* **101**, 4093–4110 (2018).

Drolia, R., Tenguria, S., Durkes, A. C., Turner, J. R. & Bhunia, A. K. Listeria Adhesion Protein Induces Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction for Bacterial Translocation. *Cell Host & Microbe* **23**, 470-484.e7 (2018).
Dumont, J. & Cotoni, L. Bacille semblable a celui du rougey du porc encontre dans le L.C.R d'un meningitique. *Ann.Inst.Pasteur* **35**, 625–633 (1921).

Dussurget, O. *et al.* Listeria monocytogenes bile salt hydrolase is a virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis: Erratum. *Molecular Microbiology* **46**, 903–903 (2002).

Eiting, M., Hagelüken, G., Schubert, W.-D. & Heinz, D. W. The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of Listeria monocytogenes, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif: Crystal structure of PrfA. *Molecular Microbiology* **56**, 433–446 (2005).

Elhanafi, D., Dutta, V. & Kathariou, S. Genetic Characterization of Plasmid-Associated Benzalkonium Chloride Resistance Determinants in a *Listeria monocytogenes* Strain from the 1998-1999 Outbreak. *Appl Environ Microbiol* **76**, 8231–8238 (2010).

Esteban, J. I., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R. A. & Hurtado, A. Faecal shedding and strain diversity of Listeria monocytogenesin healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Vet Res* **5**, 2 (2009).

Fagerlund, A. *et al.* Pervasive Listeria monocytogenes Is Common in the Norwegian Food System and Is Associated with Increased Prevalence of Stress Survival and Resistance Determinants. *Appl Environ Microbiol* **88**, e00861-22 (2022).

Fan, Z., Xie, J., Li, Y. & Wang, H. Listeriosis in mainland China: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases* **81**, 17–24 (2019).

Faralla, C. *et al.* InlP, a New Virulence Factor with Strong Placental Tropism. *Infect Immun* **84**, 3584–3596 (2016).

Faralla, C. *et al.* Listeria monocytogenes InlP interacts with afadin and facilitates basement membrane crossing. *PLoS Pathog* **14**, e1007094 (2018).

Fauvart, M., De Groote, V. N. & Michiels, J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Journal of Medical Microbiology* **60**, 699–709 (2011).

Fenlon, D. R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *Journal of Applied Bacteriology* **59**, 537–543 (1985).

Ferreira, A., O'Byrne, C. P. & Boor, K. J. Role of sigma B in Heat, Ethanol, Acid and Oxidative Stress Resistance and during Carbon Starvation in Listeria monocytogenes. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **67**, 4454–4457 (2001).
Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. & Stasiewicz, M. J. Listeria monocytogenes Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection* **77**, 150–170 (2014).

Fiedler, F., Seger, J., Schrettenbrunner, A. & Seeliger, H. P. R. The biochemistry of murein and cell wall teichoic acids in the genus Listeria. *Systematic and Applied Microbiology* **5**, 360–376 (1984).

Fiedler, F. Biochemistry of the cell surface of Listeria strains: A locating general view. *Infection* **16**, S92–S97 (1988).

Fonnesbech Vogel, B., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. & Gram, L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Cold-Smoked Salmon Processing Plants Detected by DNA-Based Typing Methods. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2586–2595 (2001).

Forster, B. M. *et al.* The Metalloprotease of Listeria monocytogenes Is Regulated by pH. *J Bacteriol* **193**, 5090–5097 (2011).

Fox, E. M., Leonard, N. & Jordan, K. Physiological and Transcriptional Characterization of Persistent and Nonpersistent Listeria monocytogenes Isolates. *Appl Environ Microbiol* **77**, 6559–6569 (2011).

Franciosa, G., Maugliani, A., Scalfaro, C., Floridi, F. & Aureli, P. Expression of Internalin a and Biofilm Formation among *Listeria Monocytogenes* Clinical Isolates. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**, 183–193 (2009).

Fraser, D. W. *et al.* Description of an Epidemic of Pneumonia. *The New England Journal of Medecine* **297**, 1189–1196 (1977).

Fraser, K. R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K. & O'Byrne, C. P. Role of sigmaB in Regulating the Compatible Solute Uptake Systems of Listeria monocytogenes: Osmotic Induction of opuC Is sigmaB Dependent. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **69**, (2003).

Fravalo, P. *et al.* Characterisation of *InlA* truncation in *Listeria monocytogenes* isolates from farm animals and human cases in the province of Quebec. *Vet. rec. open* **4**, (2017).

Freitag, N. E., Port, G. C. & Miner, M. D. Listeria monocytogenes — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**, 623–628 (2009).

Fritsch, L. *et al.* Insights from genome-wide approaches to identify variants associated to phenotypes at pan-genome scale: Application to L. monocytogenes' ability to grow in cold conditions. *International Journal of Food Microbiology* **291**, 181–188 (2019).
Gaballa, A., Guariglia-Oropeza, V., Wiedmann, M. & Boor, K. J. Cross Talk between SigB and PrfA in Listeria monocytogenes Facilitates Transitions between Extra- and Intracellular Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **83**, e00034-19 (2019).

Gaillard, J. L., Berche, P. & Sansonetti, P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of Listeria monocytogenes. *Infect Immun* **52**, 50–55 (1986).

Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Gouln, E. & Cossart, P. Entry of L. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**, 1127–1141 (1991).

Gessain, G. *et al.* PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to Listeria monocytogenes. *Journal of Experimental Medicine* **212**, 165–183 (2015).

Ghosh, P. *et al.* Invasion of the Brain by *Listeria monocytogenes* Is Mediated by InlF and Host Cell Vimentin. *mBio* **9**, e00160-18 (2018).

Glaser, P. *et al.* Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* **294**, 849–852 (2001).

Goley, E. D. & Welch, M. D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 713–726 (2006).

Gopal, S. *et al.* A Multidomain Fusion Protein in *Listeria monocytogenes* Catalyzes the Two Primary Activities for Glutathione Biosynthesis. *J Bacteriol* **187**, 3839–3847 (2005).

Gorski, L. *et al.* Prevalence and Clonal Diversity of over 1,200 Listeria monocytogenes Isolates Collected from Public Access Waters near Produce Production Areas on the Central California Coast during 2011 to 2016. *Appl Environ Microbiol* **88**, e00357-22 (2022).

Gouin, E., Welch, M. D. & Cossart, P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 35–45 (2005).

Gouin, E. *et al.* Ubiquitination of *Listeria* Virulence Factor InlC Contributes to the Host Response to Infection. *mBio* **10**, e02778-19 (2019).

Goulet, V. *et al.* Incidence of Listeriosis and Related Mortality Among Groups at Risk of Acquiring Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* **54**, 652–660 (2012).

Goulet, V., King, L. A., Vaillant, V. & de Valk, H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* **13**, 11 (2013).

Gözel, B. *et al.* Hyperinvasiveness of *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is independent of lineage I-specific genes encoding internalin-like proteins. *MicrobiologyOpen* **8**, (2019).
Gray, M. L., Seeliger, H. P. R. & Potel, J. Basic Science Review : Perinatal Infections Due to Listeria Monocytogenes: Do These Affect Subsequent Pregnancies? *Clin Pediatr (Phila)* **2**, 614–623 (1963).

Gray, M. L. & Killinger, A. H. Listeria monocytogenes and Listeric Infections. **30**, (1966).

Gründling, A., Burrack, L. S., Bouwer, H. G. A. & Higgins, D. E. Listeria monocytogenes regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12318–12323 (2004).

Guerreiro, D. N., Arcari, T. & O'Byrne, C. P. The σB-Mediated General Stress Response of Listeria monocytogenes: Life and Death Decision Making in a Pathogen. *Front. Microbiol.* **11**, 1505 (2020).

Guidi, F. *et al.* Hypo- and Hyper-Virulent Listeria monocytogenes Clones Persisting in Two Different Food Processing Plants of Central Italy. *Microorganisms* **9**, 376 (2021).

Guldimann, C. *et al.* Increased spread and replication efficiency of Listeria monocytogenes in organotypic brain-slices is related to multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) complex. *BMC Microbiol* **15**, 134 (2015).

Haase, J. K. *et al.* The ubiquitous nature of *L isteria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study: MLST of *L . monocytogenes*. *Environ Microbiol* **16**, 405–416 (2014).

Hafner, L. *et al.* Listeria monocytogenes faecal carriage is common and depends on the gut microbiota. *Nat Commun* **12**, 6826 (2021).

Hain, T. *et al.* Temporal transcriptomic analysis of the Listeria monocytogenes EGD-e σB regulon. *BMC Microbiol* **8**, 20 (2008).

Hain, T. *et al.* Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of Listeria monocytogenes. *BMC Genomics* **13**, 144 (2012).

Hall, M. *et al.* Structural basis for glutathione-mediated activation of the virulence regulatory protein PrfA in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 14733–14738 (2016).

Halsey, C. R., Glover, R. C., Thomason, M. K. & Reniere, M. L. The redox-responsive transcriptional regulator Rex represses fermentative metabolism and is required for Listeria monocytogenes pathogenesis. *PLoS Pathog* **17**, e1009379 (2021).

Hamon, M., Bierne, H. & Cossart, P. Listeria monocytogenes: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**, 423–434 (2006).

Hamon, M. A. & Cossart, P. K + Efflux Is Required for Histone H3 Dephosphorylation by Listeria monocytogenes Listeriolysin O and Other Pore-Forming Toxins. *Infect Immun* **79**, 2839–2846 (2011).

Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F. & Cossart, P. Listeriolysin O: the Swiss army knife of Listeria. *Trends in Microbiology* **20**, 360–368 (2012).

Hansen, M., Rubinsztein, D. C. & Walker, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 579–593 (2018).

Harter, E. *et al.* Stress Survival Islet 2, Predominantly Present in Listeria monocytogenes Strains of Sequence Type 121, Is Involved in the Alkaline and Oxidative Stress Responses. *Appl Environ Microbiol* **83**, e00827-17 (2017).

Hein, I. *et al.* Stress Survival Islet 1 (SSI-1) Survey in *Listeria monocytogenes* Reveals an Insert Common to *Listeria innocua* in Sequence Type 121 *L. monocytogenes* Strains. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2169–2173 (2011).

Helaine, S. *et al.* Internalization of *Salmonella* by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science* **343**, 204–208 (2014).

Herler, M. *et al.* Positive Selection of Mutations Leading to Loss or Reduction of Transcriptional Activity of PrfA, the Central Regulator of *Listeria monocytogenes* Virulence. *J Bacteriol* **183**, 5562–5570 (2001).

Hill, N. S. & Welch, M. D. A glycine-rich PE_PGRS protein governs mycobacterial actin-based motility. *Nat Commun* **13**, 3608 (2022).

Hingston, P. A., Stea, E. C., Knøchel, S. & Hansen, T. Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of Listeria monocytogenes on stainless steel surfaces. *Food Microbiology* **36**, 46–56 (2013).

Hingston, P. *et al.* Genotypes Associated with Listeria monocytogenes Isolates Displaying Impaired or Enhanced Tolerances to Cold, Salt, Acid, or Desiccation Stress. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).

Huang, J. & Brumell, J. H. Bacteria–autophagy interplay: a battle for survival. *Nat Rev Microbiol* **12**, 101–114 (2014).

Hurtado, A., Ocejo, M. & Oporto, B. Salmonella spp. and Listeria monocytogenes shedding in domestic ruminants and characterization of potentially pathogenic strains. *Veterinary Microbiology* **210**, 71–76 (2017).

Hwang, C., Sinskey, A. J. & Lodish, H. F. Oxidized Redox State of Glutathione in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **257**, 1496–1502 (1992).

Hwang, H.-J., Kim, G.-A. & Chung, M.-S. Impact of factors affecting the efficacy of intense pulsed light for reducing Bacillus subtilis spores. *Food Sci Biotechnol* **30**, 1321–1329 (2021).

Impens, F. *et al.* N-terminomics identifies Prli42 as a membrane miniprotein conserved in Firmicutes and critical for stressosome activation in Listeria monocytogenes. *Nat Microbiol* **2**, 17005 (2017).

Ireton, K., Mortuza, R., Gyanwali, G. C., Gianfelice, A. & Hussain, M. Role of internalin proteins in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* **116**, 1407–1419 (2021).

Jacquet, C. *et al.* A Molecular Marker for Evaluating the Pathogenic Potential of Foodborne *Listeria monocytogenes*. *J INFECT DIS* **189**, 2094–2100 (2004).

Jagannath, C., McBride, J. W. & Vergne, I. Editorial: The Autophagy Pathway: Bacterial Pathogen Immunity and Evasion. *Front. Immunol.* **12**, 768935 (2021).

Janakiraman, V. Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Reviews in Obstetrics & Genecology* **1**, 179–185 (2008).

Jensen, V. B., Harty, J. T. & Jones, B. D. Interactions of the Invasive Pathogens *Salmonella typhimurium* , *Listeria monocytogenes* , and *Shigella flexneri* with M Cells and Murine Peyer's Patches. *Infect Immun* **66**, 3758–3766 (1998).

Johansson, J. *et al.* An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in Listeria monocytogenes. *Cell* **110**, 551–561 (2002).

Johnson, L. J. *et al.* Human Placental Trophoblasts Infected by Listeria monocytogenes Undergo a Pro-Inflammatory Switch Associated With Poor Pregnancy Outcomes. *Front. Immunol.* **12**, 709466 (2021).

Jones, S. & Portnoy, D. A. Characterization of Listeria monocytogenes Pathogenesis in a Strain Expressing Perfringolysin 0 in Place of Listeriolysin 0. **62**, (1994).

Jonquières, R., Bierne, H., Mengaud, J. & Cossart, P. The inlA Gene of Listeria monocytogenes LO28 Harbors a Nonsense Mutation Resulting in Release of Internalin. *Infect Immun* **66**, 3420–3422 (1998).
Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P. & Cossart, P. Interaction between the protein InlB of Listeria monocytogenes and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **34**, 902–914 (1999).

Jordan, S. J. *et al.* Listeria monocytogenes Biofilm-Associated Protein (BapL) May Contribute to Surface Attachment of L. monocytogenes but Is Absent from Many Field Isolates. *Appl Environ Microbiol* **74**, 5451–5456 (2008).

Joseph, B. & Goebel, W. Life of Listeria monocytogenes in the host cells' cytosol. *Microbes and Infection* **9**, 1188–1195 (2007).

Joseph, B. *et al.* Glycerol Metabolism and PrfA Activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **190**, 5412–5430 (2008).

Kahl, B. C., Becker, K. & Löffler, B. Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony Variants in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev* **29**, 401–427 (2016).

Kammoun, H. *et al.* Listeriosis, a model infection to study host-pathogen interactions in vivo. *Current Opinion in Microbiology* **66**, 11–20 (2022).

Kanki, M., Naruse, H. & Kawatsu, K. Comparison of listeriolysin O and phospholipases PlcA and PlcB activities, and initial intracellular growth capability among food and clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* **124**, 899–909 (2018).

Kaplowitz, N., Aw, T. Y. & Ookhtens, M. The Regulation of Hepatic Glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 715–744 (1985).

Kaptchouang Tchatchouang, C.-D. *et al.* Listeriosis Outbreak in South Africa: A Comparative Analysis with Previously Reported Cases Worldwide. *Microorganisms* **8**, 135 (2020).

Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J. & Wiedmann, M. Listeria monocytogenes σB Regulates Stress Response and Virulence Functions. *J. BACTERIOL.* **185**, (2003).

Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M. & Boor, K. J. Contributions of Listeria monocytogenes σ B and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiology* **152**, 1827–1838 (2006).

Kentache, T. *et al.* Transport and Catabolism of Pentitols by ***Listeria monocytogenes***. *Microb Physiol* **26**, 369–380 (2016).

Khelef, N., Lecuit, M., Bierne, H. & Cossart, P. Species specificity of the Listeria monocytogenes InlB protein. *Cell Microbiol* **8**, 457–470 (2006).

Kim, H., Marquis, H. & Boor, K. J. σ B contributes to Listeria monocytogenes invasion by controlling expression of inlA and inlB. *Microbiology* **151**, 3215–3222 (2005).

Kim, M., Fevre, C., Lavina, M., Disson, O. & Lecuit, M. Live Imaging Reveals Listeria Hijacking of E-Cadherin Recycling as It Crosses the Intestinal Barrier. *Current Biology* **31**, 1037-1047.e4 (2021).

Kocks, C. *et al.* L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**, 521–531 (1992).

Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H. & Cossart, P. Polarized distribution of Listeria monocytogenes surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *Journal of Cell Science* **105**, 699–710 (1993).

Koopmans, M. M., Brouwer, M. C., Vázquez-Boland, J. A. & van de Beek, D. Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Review* (2022).

Kortebi, M. *et al.* Listeria monocytogenes switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Pathog* **13**, e1006734 (2017).

Kremer, P. H. C. *et al.* Benzalkonium tolerance genes and outcome in Listeria monocytogenes meningitis. *Clinical Microbiology and Infection* **23**, 265.e1-265.e7 (2017).

Kropac, A. C., Eshwar, A. K., Stephan, R. & Tasara, T. New Insights on the Role of the pLMST6 Plasmid in Listeria monocytogenes Biocide Tolerance and Virulence. *Front. Microbiol.* **10**, 1538 (2019).

Krypotou, E. *et al.* Control of Bacterial Virulence through the Peptide Signature of the Habitat. *Cell Reports* **26**, 1815-1827.e5 (2019).

Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N. Q. & Leibler, S. Bacterial Persistence. *Genetics* **169**, 1807–1814 (2005).

Kwon, D. H. & Song, H. K. A Structural View of Xenophagy, a Battle between Host and Microbes. *Molecules and Cells* **41**, 27–34 (2018).

Kwong, J. C. *et al.* Prospective Whole-Genome Sequencing Enhances National Surveillance of Listeria monocytogenes. *J Clin Microbiol* **54**, 333–342 (2016).

Lam, G. Y., Cemma, M., Muise, A. M., Higgins, D. E. & Brumell, J. H. Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to Listeria monocytogenes during the early stages of macrophage infection. *Autophagy* **9**, 985–995 (2013).

Lamond, N. & Freitag, N. Vertical Transmission of Listeria monocytogenes: Probing the Balance between Protection from Pathogens and Fetal Tolerance. *Pathogens* **7**, 52 (2018).

Lamont, R. F. *et al.* Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine* **39**, (2011).

Lang Halter, E., Neuhaus, K. & Scherer, S. Listeria weihenstephanensis sp. nov., isolated from the water plant Lemna trisulca taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 641–647 (2013).

Lathrop, A. A., Banada, P. P. & Bhunia, A. K. Differential expression of InlB and ActA in Listeria monocytogenes in selective and nonselective enrichment broths. *J Appl Microbiol* **104**, 627–639 (2008).

Lauer, P., Chow, M. Y. N., Loessner, M. J., Portnoy, D. A. & Calendar, R. Construction, Characterization, and Use of Two Listeria monocytogenes Site-Specific Phage Integration Vectors. *J. BACTERIOL.* **184**, (2002).

Laursen, M. F., Bahl, M. I., Licht, T. R., Gram, L. & Knudsen, G. M. A single exposure to a sublethal pediocin concentration initiates a resistance-associated temporal cell envelope and general stress response in *L isteria monocytogenes*: Sublethal pediocin doses may prime for resistance. *Environ Microbiol* **17**, 1134–1151 (2015).

Le Monnier, A. *et al.* ActA Is Required for Crossing of the Fetoplacental Barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **75**, 950–957 (2007).

Lebreton, A., Bierne, H. & Cossart, P. Les multiples stratégies de Listeria. in *Pour la Science* vol. 412 42–49 (2012).

Leclercq, A. *et al.* Listeria rocourtiae sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2210–2214 (2010).

Lecuit, M. *et al.* A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen Listeria monocytogenes. *EMBO J* **18**, 3956–3963 (1999).

Lecuit, M. *et al.* A Transgenic Model for Listeriosis: Role of Internalin in Crossing the Intestinal Barrier. *Science* **292**, 1722–1725 (2001).

Lecuit, M. *et al.* Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes* : Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6152–6157 (2004).

Lecuit, M. & Cossart, P. Bases moléculaires du tropisme foetoplacentaire de *Listeria monocytogenes*. *Med Sci (Paris)* **21**, 17–19 (2005).

Lee, S. *et al.* Listeria monocytogenes Source Distribution Analysis Indicates Regional Heterogeneity and Ecological Niche Preference among Serotype 4b Clones. *mBio* **9**, e00396-18 (2018).

Lemon, K. P., Freitag, N. E. & Kolter, R. The Virulence Regulator PrfA Promotes Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **192**, 3969–3976 (2010).

Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* **49**, W293–W296 (2021).

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D. & Faucher, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).

Lianou, A. & Sofos, J. N. A Review of the Incidence and Transmission of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments. *Journal of Food Protection* **70**, 2172–2198 (2007).

Liu, D. *Handbook of Listeria monocytogenes*. (CRC Press, 2008).

Liu, D. *et al.* The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies. *Viruses* **13**, 1268 (2021).

Liu, X. *et al.* Persistence of Listeria monocytogenes ST5 in Ready-to-Eat Food Processing Environment. *Foods* **11**, 2561 (2022).

Liu, Y., Orsi, R. H., Boor, K. J., Wiedmann, M. & Guariglia-Oropeza, V. Home Alone: Elimination of All but One Alternative Sigma Factor in Listeria monocytogenes Allows Prediction of New Roles for σB. *Front. Microbiol.* **8**, 1910 (2017).

Lobel, L. *et al.* The metabolic regulator CodY links *L isteria monocytogenes* metabolism to virulence by directly activating the virulence regulatory gene *prfA*: CodY links *L. monocytogenes* metabolism to virulence. *Molecular Microbiology* **95**, 624–644 (2015).

Lobel, L. & Herskovits, A. A. Systems Level Analyses Reveal Multiple Regulatory Activities of CodY Controlling Metabolism, Motility and Virulence in Listeria monocytogenes. *PLoS Genet* **12**, e1005870 (2016).

Loessner, M. J., Inman, R. B., Lauer, P. & Calendar, R. Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of Listeria monocytogenes : implications for phage evolution. *Mol Microbiol* **35**, 324–340 (2000).

Lotoux, A., Milohanic, E. & Bierne, H. The Viable But Non-Culturable State of Listeria monocytogenes in the One-Health Continuum. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 849915 (2022).

Lu, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB j.* **13**, 1169–1183 (1999).

Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* **30**, 42–59 (2009).

Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S. & Korkeala, H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent Listeria monocytogenes strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 265–272 (2003).

Luo, L. *et al.* Case report: whole genome sequencing based investigation of maternal-neonatal listeriosis in Sichuan, China. *BMC Infect Dis* **19**, 893 (2019).

Madhusoodanan, J. How persister bacteria evade antibiotics, prolong infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2215617119 (2022).

Mahoney, D. B. J. *et al.* Associations between Listeria monocytogenes genomic characteristics and adhesion to polystyrene at 8 °C. *Food Microbiology* **102**, 103915 (2022).

Makariti, I. P., Printezi, A., Kapetanakou, A. E., Zeaki, N. & Skandamis, P. N. Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of Listeria monocytogenes in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiology* **45**, 231–244 (2015).

Marquis, H., Goldfine, H. & Portnoy, D. A. Proteolytic Pathways of Activation and Degradation of a Bacterial Phospholipase C during Intracellular Infection by Listeria monocytogenes. *Journal of Cell Biology* **137**, 1381–1392 (1997).

Maudet, C. *et al.* Bacterial inhibition of Fas-mediated killing promotes neuroinvasion and persistence. *Nature* **603**, 900–906 (2022).

Maury, M. M. *et al.* Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* **48**, 308–313 (2016).

Maury, M. M. *et al.* Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of Listeria monocytogenes. *Infect Immun* **85**, e00541-17 (2017).

Maury, M. M. *et al.* Hypervirulent Listeria monocytogenes clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun* **10**, 2488 (2019).

McDade, J. E. *et al.* Isolation of a Bacterium and Demonstration of Its Role in Other Respiratory Disease. *The New England Journal of Medecine* **297**, 1197–1203 (1977).

McGann, P., Wiedmann, M. & Boor, K. J. The Alternative Sigma Factor σ^{B} and the Virulence Gene Regulator PrfA Both Regulate Transcription of *Listeria monocytogenes* Internalins. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2919–2930 (2007).

McLauchlin, J., Audurier, A. & Taylor, A. G. The evaluation of a phage-typing system for Listeria monocytogenes for use in epidemiological studies. *Journal of Medical Microbiology* **22**, 357–365 (1986).

McLauchlin, J. & Low, JC. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *The Veterinary Record* **135**, 615–617 (1994).

Melter, O. & Radojevič, B. Small colony variants of Staphylococcus aureus — review. *Folia Microbiol* **55**, 548–558 (2010).

Melton-Witt, J. A., Rafelski, S. M., Portnoy, D. A. & Bakardjiev, A. I. Oral Infection with Signature-Tagged Listeria monocytogenes Reveals Organ-Specific Growth and Dissemination Routes in Guinea Pigs. *Infect Immun* **80**, 720–732 (2012).

Mengaud, J. *et al.* Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Molecular Microbiology* **5**, 2273–2283 (1991).

Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R.-M. & Cossart, P. E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of L. monocytogenes into Epithelial Cells. *Cell* **84**, 923–932 (1996).

Meredith, M. J. & Reed, D. J. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 3747–3753 (1982).

Meza-Torres, J. *et al.* Listeriolysin S: A bacteriocin from *Listeria monocytogenes* that induces membrane permeabilization in a contact-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2108155118 (2021).

Milohanic, E. *et al.* Transcriptome analysis of Listeria monocytogenes identifies three groups of genes differently regulated by PrfA: Analysis of the PrfA regulon of L. monocytogenes. *Molecular Microbiology* **47**, 1613–1625 (2003).

Milohanic, E., Jonquières, R., Cossart, P., Berche, P. & Gaillard, J.-L. The autolysin Ami contributes to the adhesion of Listeria monocytogenes to eukaryotic cells via its cell wall anchor: Ami-mediated adhesion. *Molecular Microbiology* **39**, 1212–1224 (2004).

Misra, S. K. *et al.* Quantitative Proteome Analyses Identify PrfA-Responsive Proteins and Phosphoproteins in *Listeria monocytogenes*. *J. Proteome Res.* **13**, 6046–6057 (2014).

Mitchell, G. *et al.* Avoidance of Autophagy Mediated by PlcA or ActA Is Required for Listeria monocytogenes Growth in Macrophages. *Infect Immun* **83**, 2175–2184 (2015).

Moura, A. *et al.* Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of Listeria monocytogenes. *Nat Microbiol* **2**, 16185 (2016).

Moura, A. *et al.* Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **87**, e00758-18 (2019).

Moura, A. *et al.* Emergence and global spread of Listeria monocytogenes main clinical clonal complex. *Science Advances* 1–10 (2021).

Mujahid, S., Orsi, R. H., Vangay, P., Boor, K. J. & Wiedmann, M. Refinement of the Listeria monocytogenes σB regulon through quantitative proteomic analysis. *Microbiology* **159**, 1109–1119 (2013).

Müller, A. *et al.* Tn6188 - A Novel Transposon in Listeria monocytogenes Responsible for Tolerance to Benzalkonium Chloride. *PLoS ONE* **8**, e76835 (2013).

Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swann, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes (n.sp.). *J. Pathol.* **29**, 407–439 (1926).

Nelson, K. E. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen Listeria monocytogenes reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Research* **32**, 2386–2395 (2004).

Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **32**, 268–274 (2015).

Nightingale, K. K. *et al.* Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4458–4467 (2004).

Nightingale, K. K. *et al.* Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of Listeria monocytogenes in ruminants. **227**, (2005).

Nightingale, K. K. *et al.* Listeria monocytogenes F2365 Carries Several Authentic Mutations Potentially Leading to Truncated Gene Products, Including InlB, and Demonstrates Atypical Phenotypic Characteristics. *Journal of Food Protection* **70**, 482–488 (2007).

Nowak, J. *et al.* Persistent Listeria monocytogenes strains isolated from mussel production facilities form more biofilm but are not linked to specific genetic markers. *International Journal of Food Microbiology* **256**, 45–53 (2017).

Núñez-Montero, K. *et al.* Listeria costaricensis sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**, 844–850 (2018).
Nyfeldt, A. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C.R. Soc. Biol.* 590–591 (1937).

Oliver, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 415–425 (2010).

Orsi, R. H., Bakker, H. C. den & Wiedmann, M. Listeria monocytogenes lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* **301**, 79–96 (2011).

Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P. & Martínez-Suárez, J. V. The Connection between Persistent, Disinfectant-Resistant Listeria monocytogenes Strains from Two Geographically Separate Iberian Pork Processing Plants: Evidence from Comparative Genome Analysis. *Appl Environ Microbiol* **82**, 308–317 (2016).

Osborne, S. E. & Brumell, J. H. Listeriolysin O: from bazooka to Swiss army knife. *Phil. Trans. R. Soc. B* **372**, 20160222 (2017).

Pägelow, D. *et al.* The olfactory epithelium as a port of entry in neonatal neurolisteriosis. *Nat Commun* **9**, 4269 (2018).

Palma, F. *et al.* Dynamics of mobile genetic elements of Listeria monocytogenes persisting in ready-to-eat seafood processing plants in France. *BMC Genomics* **21**, 130 (2020).

Pan, Y., Breidt, F. & Kathariou, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7711–7717 (2006).

Paterson, J. S. The antigenic structure of organisms of the genus Listerella. *J. Pathol. Bacteriol.* **51**, 427–436 (1940).

Pérez-Trallero, E., Zigorraga, C., Artieda, J., Alkorta, M. & Marimón, J. M. Two Outbreaks of *Listeria monocytogenes* Infection, Northern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 2155–2157 (2014).

Peron-Cane, C. *et al.* Fluorescent secreted bacterial effectors reveal active intravacuolar proliferation of Listeria monocytogenes in epithelial cells. *PLoS Pathog* **16**, e1009001 (2020).

Personnic, N. *et al.* The Stress-Induced Virulence Protein InlH Controls Interleukin-6 Production during Murine Listeriosis. *Infect Immun* **78**, 1979–1989 (2010).

Petit, T. J. P. & Lebreton, A. Adaptations of intracellular bacteria to vacuolar or cytosolic niches. *Trends in Microbiology* **30**, 736–748 (2022).

Petkau, A. *et al.* SNVPhyl: a single nucleotide variant phylogenomics pipeline for microbial genomic epidemiology. *Microbial Genomics*.

Pfendler, S. *et al.* UV-C as an efficient means to combat biofilm formation in show caves: evidence from the La Glacière Cave (France) and laboratory experiments. *Environ Sci Pollut Res* **24**, 24611–24623 (2017).

Piercey, M. J., Hingston, P. A. & Truelstrup Hansen, L. Genes involved in Listeria monocytogenes biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15°C. *International Journal of Food Microbiology* **223**, 63–74 (2016).

Piffaretti, J. C. *et al.* Genetic characterization of clones of the bacterium Listeria monocytogenes causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3818–3822 (1989).

Pilgrim, S., Kolb-Mäurer, A., Gentschev, I., Goebel, W. & Kuhn, M. Deletion of the Gene Encoding p60 in *Listeria monocytogenes* Leads to Abnormal Cell Division and Loss of Actin-Based Motility. *Infect Immun* **71**, 3473–3484 (2003).

Pillich, H., Puri, M. & Chakraborty, T. ActA of Listeria monocytogenes and Its Manifold Activities as an Important Listerial Virulence Factor. in *The Actin Cytoskeleton and Bacterial Infection* (ed. Mannherz, H. G.) vol. 399 113–132 (Springer International Publishing, 2016).

Pirie, J. H. H. Listeria: change of name for a genus of bacteria. *Nature* **145**, 264 (1940).

Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A. & Cossart, P. Entry of Listeria monocytogenes in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, a010009–a010009 (2012).

Pizarro-Cerdá, J., Charbit, A., Enninga, J., Lafont, F. & Cossart, P. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens Listeria, Francisella, Shigella and Yersinia. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **60**, 155–167 (2016).

Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. Listeria monocytogenes: cell biology of invasion and intracellular growth. (2018).

Pohl, A. M. *et al.* Differences Among Incidence Rates of Invasive Listeriosis in the U.S. FoodNet Population by Age, Sex, Race/Ethnicity, and Pregnancy Status, 2008–2016. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**, 290–297 (2019).

Polle, L., Rigano, L. A., Julian, R., Ireton, K. & Schubert, W.-D. Structural Details of Human Tuba Recruitment by InlC of Listeria monocytogenes Elucidate Bacterial Cell-Cell Spreading. *Structure* **22**, 304–314 (2014).

Portman, J. L., Dubensky, S. B., Peterson, B. N., Whiteley, A. T. & Portnoy, D. A. Activation of the *Listeria monocytogenes* Virulence Program by a Reducing Environment. *mBio* **8**, e01595-17 (2017).

Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W. & Cossart, P. Molecular determinants of Listeria monocytogenes pathogenesis. *Infect Immun* **60**, 1263–1267 (1992).

Pourpre, R. *et al.* A bacterial virulence factor interacts with the splicing factor RBM5 and stimulates formation of nuclear RBM5 granules. *Sci Rep* **12**, 21961 (2022).

Proctor, R. A. *et al.* Staphylococcus aureus Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).

Prokop, A. *et al.* OrfX, a Nucleomodulin Required for *Listeria monocytogenes* Virulence. *mBio* **8**, e01550-17 (2017).

Promadej, N., Fiedler, F., Cossart, P., Dramsi, S. & Kathariou, S. Cell Wall Teichoic Acid Glycosylation in *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Requires *gtcA* , a Novel, Serogroup-Specific Gene. *J Bacteriol* **181**, 418–425 (1999).

Pucciarelli, M. G. & Portillo, F. G.-D. Salmonella Intracellular Lifestyles and Their Impact on Host-to-Host Transmission. *Microbiology Spectrum* **5**, 1–18 (2017).

Quereda, J. J. *et al.* Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 5706–5711 (2016).

Quereda, J. J. *et al.* Reassessing the role of internalin B in Listeria monocytogenes virulence using the epidemic strain F2365. *Clinical Microbiology and Infection* **25**, 252.e1-252.e4 (2019).

Quereda, J. J. *et al.* Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes* : A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence* **12**, 2509–2545 (2021).

Radoshevich, L. & Cossart, P. Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **16**, 32–46 (2018).

Radtke, A. L. *et al.* Listeria monocytogenes exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1633–1638 (2011).

Raengpradub, S., Wiedmann, M. & Boor, K. J. Comparative Analysis of the σ ^{B} -Dependent Stress Responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* Strains Exposed to Selected Stress Conditions. *Appl Environ Microbiol* **74**, 158–171 (2008).

Rafelski, S. M. & Theriot, J. A. Mechanism of polarization of Listeria monocytogenes surface protein ActA. *Mol Microbiol* **59**, 1262–1279 (2006).

Ragon, M. *et al.* A New Perspective on Listeria monocytogenes Evolution. *PLoS Pathog* **4**, e1000146 (2008).

Rasmussen, O. F. & Olsen, J. E. Listeria monocytogenes exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin 0 genes.

Rawool, D. B., Malik, S. V. S., Shakuntala, I., Sahare, A. M. & Barbuddhe, S. B. Detection of multiple virulence-associated genes in Listeria monocytogenes isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology* **113**, 201–207 (2007).

Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J. & Tang, C. M. Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 333–340 (2009).

Rees, C. E. D., Doyle, L. & Taylor, C. M. Listeria monocytogenes. in *Foodborne Diseases* 253–276 (Elsevier, 2017).

Renier, S. *et al.* Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition: *SecA* 2 impacts biofilm formation in *L. monocytogenes*. *Environ Microbiol* **16**, 1176–1192 (2014).

Reniere, M. L. *et al.* Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. *Nature* **517**, 170–173 (2015).

Reniere, M. L., Whiteley, A. T. & Portnoy, D. A. An In Vivo Selection Identifies Listeria monocytogenes Genes Required to Sense the Intracellular Environment and Activate Virulence Factor Expression. *PLoS Pathog* **12**, e1005741 (2016).

Ribet, D. & Cossart, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection* **17**, 173–183 (2015).

Ricchi, M. *et al.* Short communication: Persistent contamination by Listeria monocytogenes of bovine raw milk investigated by whole-genome sequencing. *Journal of Dairy Science* **102**, 6032–6036 (2019).

Riebisch, A. K., Mühlen, S., Beer, Y. Y. & Schmitz, I. Autophagy—A Story of Bacteria Interfering with the Host Cell Degradation Machinery. *Pathogens* **10**, 110 (2021).

Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P. & Guzzo, J. agr System of Listeria monocytogenes EGD-e: Role in Adherence and Differential Expression Pattern. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6125–6133 (2007).

Ripio, M. T., Domínguez-Bernal, G., Lara, M., Suárez, M. & Vazquez-Boland, J. A. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in Listeria monocytogenes. *J Bacteriol* **179**, 1533–1540 (1997).

Roberts, A., Chan, Y. & Wiedmann, M. Definition of Genetically Distinct Attenuation Mechanisms in Naturally Virulence-Attenuated *Listeria monocytogenes* by Comparative Cell Culture and Molecular Characterization. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3900–3910 (2005).

Roberts, A. *et al.* Genetic and phenotypic characterization of Listeria monocytogenes lineage III. *Microbiology* **152**, 685–693 (2006).

Roche, S. M. *et al.* Investigation of Specific Substitutions in Virulence Genes Characterizing Phenotypic Groups of Low-Virulence Field Strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6039–6048 (2005).

Roche, S. M. *et al.* Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent Listeria monocytogenes isolates. *BMC Microbiol* **12**, 304 (2012).

Rocourt, J. *et al.* Epidémie de listériose en France en 1992.

Rocourt, J., Schrettenbrunner, A. & Seeliger, H. P. R. Différenciation biochimique des groupes génomiques de Listeria monocytogenes (sensu lato). *Ann.Microbiol. (Inst. Pasteur)* **134**, 65–71 (1983).

Rolhion, N. *et al.* A Listeria monocytogenes Bacteriocin Can Target the Commensal Prevotella copri and Modulate Intestinal Infection. *Cell Host & Microbe* **26**, 691-701.e5 (2019).

Ronneau, S., Hill, P. W. & Helaine, S. Antibiotic persistence and tolerance: not just one and the same. *Current Opinion in Microbiology* **64**, 76–81 (2021).

Rukit, J. *et al.* Roles of Alternative Sigma Factors in Invasion and Growth Characteristics of Listeria monocytogenes 10403S Into Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Caco-2 Cell. *Front. Microbiol.* **13**, 901484 (2022).

Rupp, S. *et al.* A naturally occurring prfA truncation in a Listeria monocytogenes field strain contributes to reduced replication and cell-to-cell spread. *Veterinary Microbiology* **179**, 91–101 (2015).

Rupp, S., Bärtschi, M., Frey, J. & Oevermann, A. Hyperinvasiveness and increased intercellular spread of Listeria monocytogenes sequence type 1 are independent of listeriolysin S, internalin F and internalin J1. *Journal of Medical Microbiology* **66**, 1053–1062 (2017).

Ryan, S., Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. G. M. A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of Listeria monocytogenes in suboptimal conditions: Stress survival islet in L. monocytogenes. *Journal of Applied Microbiology* **109**, 984–995 (2010).

Rychli, K. *et al.* Comparative genomics of human and non-human Listeria monocytogenes sequence type 121 strains. *PLoS ONE* **12**, e0176857 (2017).

Ryser, E. T. & Marth, E. H. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. (CRC Press, 2007).

Sabet, C. *et al.* The Listeria monocytogenes Virulence Factor InlJ Is Specifically Expressed In Vivo and Behaves as an Adhesin. *Infect Immun* **76**, 1368–1378 (2008).

Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., de la Fuente, L. & Vázquez, J. A. Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones. *J Clin Microbiol* **41**, 757–762 (2003).

Samanta, D., Clemente, T. M., Schuler, B. E. & Gilk, S. D. Coxiella burnetii Type 4B Secretion System-dependent manipulation of endolysosomal maturation is required for bacterial growth. *PLoS Pathog* **15**, e1007855 (2019).

Sauders, B. D. *et al.* Low Prevalence of Listeria monocytogenes in Human Stool. *Journal of Food Protection* **68**, 178–181 (2005).

Scallan, E. *et al.* Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 7–15 (2011).

Schiavano, G. F. *et al.* Whole-Genome Sequencing Characterization of Virulence Profiles of Listeria monocytogenes Food and Human Isolates and In Vitro Adhesion/Invasion Assessment. *Microorganisms* **10**, 62 (2021).

Schlech, W. F. *et al.* Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medecine* **308**, 203–206 (1983).

Schnupf, P., Zhou, J., Varshavsky, A. & Portnoy, D. A. Listeriolysin O Secreted by *Listeria monocytogenes* into the Host Cell Cytosol Is Degraded by the N-End Rule Pathway. *Infect Immun* **75**, 5135–5147 (2007).

Schoder, D., Guldimann, C. & Märtlbauer, E. Asymptomatic Carriage of Listeria monocytogenes by Animals and Humans and Its Impact on the Food Chain. *Foods* **11**, 3472 (2022).

Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. Epidemiology of Human Listeriosis. *CLIN. MICROBIOL. REV.* **4**, (1991).

Schuerch, D. W., Wilson-Kubalek, E. M. & Tweten, R. K. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12537–12542 (2005).

Schultze, T. *et al.* A detailed view of the intracellular transcriptome of Listeria monocytogenes in murine macrophages using RNA-seq. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).

Scortti, M., Monzó, H. J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D. A. & Vázquez-Boland, J. A. The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection* **9**, 1196–1207 (2007).

Seeliger, H. P. R. & Höhne, K. Serotyping of Listeria monocytogenes and related species. *Methods in Microbiology* **13**, 31–49 (1979).

Senczek, D., Stephan, R. & Untermann, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of Listeria strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 155–159 (2000).

Seveau, S., Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. Molecular mechanisms exploited by Listeria monocytogenes during host cell invasion. *Microbes and Infection* **9**, 1167–1175 (2007).

Seveau, S. Multifaceted Activity of Listeriolysin O, the Cholesterol-Dependent Cytolysin of Listeria monocytogenes. in *MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion* (eds. Anderluh, G. & Gilbert, R.) vol. 80 161–195 (Springer Netherlands, 2014).

Shaughnessy, L. M., Hoppe, A. D., Christensen, K. A. & Swanson, J. A. Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in Listeria monocytogenes vacuoles. *Cell Microbiol* **8**, 781–792 (2006).

Singh, R., Jamieson, A. & Cresswell, P. GILT is a critical host factor for Listeria monocytogenes infection. *Nature* **455**, 1244–1247 (2008).

Siqueira, M. da S., Ribeiro, R. de M. & Travassos, L. H. Autophagy and Its Interaction With Intracellular Bacterial Pathogens. *Front. Immunol.* **9**, 935 (2018).

Sleator, R. D., Wemekamp-Kamphuis, H. H., Gahan, C. G. M., Abee, T. & Hill, C. A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in Listeria monocytogenes: Listerial bile tolerance. *Molecular Microbiology* **55**, 1183–1195 (2004).
Sleator, R. D., Watson, D., Hill, C. & Gahan, C. G. M. The interaction between Listeria monocytogenes and the host gastrointestinal tract. *Microbiology* **155**, 2463–2475 (2009).

Smith, G. A. *et al.* The two distinct phospholipases C of Listeria monocytogenes have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**, 4231–4237 (1995).

Sokolovic, Z. *et al.* Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of Listeria monocytogenes strains belonging to serogroup 4. *Infect Immun* **64**, 4008–4019 (1996).

Song, Z. *et al.* The population structure and genetic diversity of Listeria monocytogenes ST9 strains based on genomic analysis. *Front. Microbiol.* **13**, 982220 (2022).

Steckler, A. J., Cardenas-Alvarez, M. X., Townsend Ramsett, M. K., Dyer, N. & Bergholz, T. M. Genetic characterization of Listeria monocytogenes from ruminant listeriosis from different geographical regions in the U.S. *Veterinary Microbiology* **215**, 93–97 (2018).

Steele, S., Radlinski, L., Taft-Benz, S., Brunton, J. & Kawula, T. H. Trogocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *eLife* **5**, e10625 (2016).

Stévenin, V. *et al.* Dynamic Growth and Shrinkage of the Salmonella-Containing Vacuole Determines the Intracellular Pathogen Niche. *Cell Reports* **29**, 3958-3973.e7 (2019).

Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199–210 (2008).

Sue, D., Boor, K. J. & Wiedmann, M. σ B-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes opuCA and lmo1421 and the conjugated bile salt hydrolase gene bsh in Listeria monocytogenes. *Microbiology* **149**, 3247–3256 (2003).

Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* **9**, 1236–1243 (2007).

Takeuchi, Aki. Electron miscroscope studies of experimental salmonella infection. *American Society for Microbiology* 109–136 (1966).

Takeuchi, Aki. Electron-miscroscope studies of experimental salmonella infection in the preconditioned guinea pig. *American Society for Microbiology* 137–161 (1967).

Tan, M. F. *et al.* Development of ListeriaBase and comparative analysis of Listeria monocytogenes. *BMC Genomics* **16**, 755 (2015).

Tattoli, I. *et al.* Listeria phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures: *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses. *The EMBO Journal* **32**, 3066–3078 (2013).

Taylor, C. M. *et al.* Listeria monocytogenes relA and hpt Mutants Are Impaired in Surface-Attached Growth and Virulence. *J Bacteriol* **184**, 621–628 (2002).

Témoin, S., Roche, S. M., Grépinet, O., Fardini, Y. & Velge, P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of Listeria monocytogenes field strains. *Microbiology* **154**, 939–948 (2008).

Tiensuu, T., Guerreiro, D. N., Oliveira, A. H., O'Byrne, C. & Johansson, J. Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing Listeria monocytogenes to transition from a saprophyte to a killer. *Microbiology* **165**, 819–833 (2019).

Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes. *Journal of Cell Biology* **109**, 1597–1608 (1989).

Toledo-Arana, A. *et al.* The Listeria transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**, 950–956 (2009).

Tompkin, R. B. Control of Listeria monocytogenes in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection* **65**, 709–725 (2002).

Travier, L. *et al.* ActA Promotes Listeria monocytogenes Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. *PLoS Pathog* **9**, e1003131 (2013).

Travier, L. & Lecuit, M. Listeria monocytogenes ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* **17**, 53–60 (2014).

Van den Bergh, B., Fauvart, M. & Michiels, J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews* **41**, 219–251 (2017).

Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D. & Waites, W. M. Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Appl Environ Microbiol* **66**, 860–863 (2000).

Vasanthakrishnan, R. B. *et al.* PrfA regulation offsets the cost of *L isteria* virulence outside the host: Cost of *Listeria* virulence. *Environ Microbiol* **17**, 4566–4579 (2015).

Vaughn, B. & Abu Kwaik, Y. Idiosyncratic Biogenesis of Intracellular Pathogens-Containing Vacuoles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 722433 (2021).
Vazquez-Boland, J. A. *et al.* Nucleotide sequence of the lecithinase operon of Listeria monocytogenes and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* **60**, 219–230 (1992).

Vázquez-Boland, J. A. *et al.* Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**, 584–640 (2001).

Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G. & Yarlagadda, P. K. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proc Inst Mech Eng H* **228**, 1083–1099 (2014).

Vega, Y. *et al.* New Listeria monocytogenes prfA* mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA: PrfA* mutations and structure-function of PrfA. *Molecular Microbiology* **52**, 1553–1565 (2004).

Veiga, E. & Cossart, P. Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* **7**, 894–900 (2005).

Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S. & Collins, J. J. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat Chem Biol* **8**, 431–433 (2012).

Velge, P., Bottreau, E., Kaeffer, B. & Pardon, P. Cell immortalization enhances Listeria monocytogenes invasion. *Med Microbiol Immunol* **183**, (1994).

Velge, P. *et al.* A naturally occurring mutation K220T in the pleiotropic activator PrfA of Listeria monocytogenes results in a loss of virulence due to decreasing DNA-binding affinity. *Microbiology* **153**, 995–1005 (2007).

Velge, P. & Roche, S. M. Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiology* **5**, 1799–1821 (2010).

Verran, J., Airey, P., Packer, A. & Whitehead, K. A. Chapter 8 Microbial Retention on Open Food Contact Surfaces and Implications for Food Contamination. in *Advances in Applied Microbiology* vol. 64 223–246 (Elsevier, 2008).

Wang, Y., Feng, H., Zhu, Y. & Gao, P. Structural insights into glutathione-mediated activation of the master regulator PrfA in Listeria monocytogenes. *Protein Cell* **8**, 308–312 (2017).

Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A. & Bielawski, J. P. Multilocus Genotyping Assays for Single Nucleotide Polymorphism-Based Subtyping of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7629–7642 (2008).

Wemekamp-Kamphuis, H. H., Wouters, J. A., Hain, T., Chakraborty, T. & Abee, T. Identification of Sigma Factor □B-Controlled Genes and Their Impact on Acid Stress, High Hydrostatic Pressure, and Freeze Survival in Listeria monocytogenes EGD-e. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*

Wiedmann, M. *et al.* Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct Listeria monocytogenes lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* **65**, 2707–2716 (1997).

Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J. & Boor, K. J. General Stress Transcription Factor sigmaB and Its Role in Acid Tolerance and Virulence of Listeria monocytogenes. *J. BACTERIOL.* **180**, (1998).

Wirtanen, G. & Salo, S. Disinfection in Food Processing – Efficacy Testing of Disinfectants. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology* **2**, 293–306 (2003).

Wolfe, B. *et al.* Sequelae of Fetal Infection in a Non-human Primate Model of Listeriosis. *Front. Microbiol.* **10**, 2021 (2019).

Wong, K. K. Y. & Freitag, N. E. A Novel Mutation within the Central *Listeria monocytogenes* Regulator PrfA That Results in Constitutive Expression of Virulence Gene Products. *J Bacteriol* **186**, 6265–6276 (2004).

Wu, Y., Vulić, M., Keren, I. & Lewis, K. Role of Oxidative Stress in Persister Tolerance. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 4922–4926 (2012).

Wurtzel, O. *et al.* Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Mol Syst Biol* **8**, 583 (2012).

Xiao, Z. & Xu, P. Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **33**, 127–140 (2007).

Yin, Y. *et al.* A hybrid sub-lineage of Listeria monocytogenes comprising hypervirulent isolates. *Nat Commun* **10**, 4283 (2019).

Yoshikawa, Y. *et al.* Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11**, 1233–1240 (2009).

Zeldovich, V. B., Robbins, J. R., Kapidzic, M., Lauer, P. & Bakardjiev, A. I. Invasive Extravillous Trophoblasts Restrict Intracellular Growth and Spread of Listeria monocytogenes. *PLoS Pathog* **7**, e1002005 (2011).

Zhang, Y. *et al.* Listeria hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing. *Nat Immunol* **20**, 433–446 (2019).

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W. & Ding, T. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).

ANNEXES

frontiers in Cellular and Infection Microbiology

REVIEW
published: 18 March 2022
doi: 10.3389/fcimb.2022.849915

The Viable But Non-Culturable State of *Listeria monocytogenes* in the One-Health *Continuum*

*Aurélie Lotoux, Eliane Milohanic and Hélène Bierne**

Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, EPIMIC Lab, Jouy-en-Josas, France

Many bacterial species, including several pathogens, can enter a so-called "viable but non-culturable" (VBNC) state when subjected to stress. Bacteria in the VBNC state are metabolically active but have lost their ability to grow on standard culture media, which compromises their detection by conventional techniques based on bacterial division. Under certain conditions, VBNC bacteria can regain their growth capacity and, for pathogens, their virulence potential, through a process called resuscitation. Here, we review the current state of knowledge of the VBNC state of *Listeria monocytogenes* (*Lm*), a Gram-positive pathogenic bacterium responsible for listeriosis, one of the most dangerous foodborne zoonosis. After a brief summary of characteristics of VBNC bacteria, we highlight work on VBNC *Lm* in the environment and in agricultural and food industry settings, with particular emphasis on the impact of antimicrobial treatments. We subsequently discuss recent data suggesting that *Lm* can enter the VBNC state in the host, raising the possibility that VBNC forms contribute to the asymptomatic carriage of this pathogen in wildlife, livestock and even humans. We also consider the resuscitation and virulence potential of VBNC *Lm* and the danger posed by these bacteria to at-risk individuals, particularly pregnant women. Overall, we put forth the hypothesis that VBNC forms contribute to adaptation, persistence, and transmission of *Lm* between different ecological niches in the One-Health *continuum*, and suggest that screening for healthy carriers, using alternative techniques to culture-based enrichment methods, should better prevent listeriosis risks.

Keywords: zoonosis, VBNC, dormancy, asymptomatic infections, foodborne pathogen, risk assessment, pregnancy, infectious diseases

OPEN ACCESS

Edited by:
Changyong Cheng, Zhejiang A & F University, China

Reviewed by:
Yanhong Liu, United States Department of Agriculture (USDA), United States
Trinad Chakraborty, University of Giessen, Germany

***Correspondence:**
Hélène Bierne
helene.bierne@inrae.fr

Specialty section:
This article was submitted to Bacteria and Host, a section of the journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Received: *06 January 2022*
Accepted: *07 February 2022*
Published: *18 March 2022*

Citation:
Lotoux A, Milohanic E and Bierne H (2022) The Viable But Non-Culturable State of Listeria monocytogenes in the One-Health Continuum. Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:849915. doi: 10.3389/fcimb.2022.849915

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes (*Lm*) is a ubiquitous Gram-positive bacterium that contaminates food production lines and is pathogenic for humans and various animal species (Bagatella et al., 2021; Quereda et al., 2021). This facultative intracellular pathogen has evolved sophisticated mechanisms to enter, grow and survive in many eukaryotic cell types and to infect several organs, including the intestine, liver, spleen, brain and placenta (Radoshevich and Cossart, 2017). *Lm* is the etiological agent of listeriosis, a disease characterized by bacteremia, central nervous system infections, spontaneous abortions and perinatal infections (Schlech, 2019; Charlier et al., 2020; Bagatella

et al., 2021). Listeriosis leads to the highest number of hospitalizations and case fatality rate of any foodborne zoonosis in Europe (European Food Safety et al., 2021), as well as in the United States (Scallan et al., 2011). These rates have not yet been estimated in other regions of the world, but it is noteworthy that countries in Asia and Africa, as well as Australia, have experienced several listeriosis outbreaks in recent decades, with the largest ever in South Africa (2017-2018; 1060 cases, 216 deaths) (Kaptchouang Tchatchouang et al., 2020). The foods responsible of this massive outbreak were processed meat products, named polony. Foods associated with listeriosis include raw meat and fish, seafood, unpasteurized dairy products and foods contaminated after processing, including soft cheeses and deli meats. In recent years, increased surveillance for *Lm* has shown that this dangerous germ can contaminate a variety of ready-to-eat (RTE) foods, including uncooked vegetables and fresh-cut fruits (Buchanan et al., 2017). For example, in Europe, a multi-country outbreak was attributed to consumption of frozen sweet corn (2015-2018; 53 cases, 10 deaths) (McLauchlin et al., 2021), while recent outbreaks in the United States have been associated with consumption of enoki mushrooms (2020; 36 cases, 4 deaths) and packaged salads (2021; 27 cases, 3 deaths, in two separate outbreaks) (https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html).

The remarkable adaptation of *Lm* to different ecosystems, in the environment (*e.g.,* river, lake and sea water, sewage, soil, plants, decaying plants, fodder, silage, agricultural effluents), a variety of foods, and hosts of diverse species, makes it an important archetype of the "One-Health" approach to infectious diseases, which recognizes the interconnection between human health, animal health and environmental ecosystems. However, there is much to discover about the ecology of *Lm*, in terms of natural reservoirs and mechanisms of transmission. In particular, the potential for asymptomatic carriage of this pathogen has been less explored than its mechanisms of pathogenicity. However, healthy carriers play an important role as reservoirs and dispersion factors of *Lm* in the environment. As early as the 1960s, Gray and Killinger (1966) cited 37 mammalian species from which this pathogen was isolated in the feces (Gray and Killinger, 1966). *Lm* is also found in many species of wild mammals, such as rats, hares, hedgehogs, badgers, deer, moose, otters, raccoons, foxes, bears, boars, monkeys (Giovannini et al., 1988; Inoue et al., 1991; Low and Donachie, 1997; Yoshida et al., 2000; Lyautey et al., 2007; Rothenburger et al., 2015; Weindl et al., 2016; Hydeskov et al., 2019; Parsons et al., 2019; Fredriksson-Ahomaa et al., 2020; Palacios-Gorba et al., 2021) and even aquatic mammals, such as dolphins (Sevellec et al., 2020). *Lm* is also a pathogen of farmed mammals, such as sheep, goats, cattle, pigs, horses and rabbits, and pet animals, such as dogs and cats (Weber et al., 1995; Lyautey et al., 2007; Oevermann et al., 2010; Leclercq et al., 2014; Rothenburger et al., 2015). Oevermann and colleagues recently discussed the current knowledge of listeriosis pathology in naturally susceptible species, focusing on ruminants and the neuro-invasive form of the disease (Bagatella et al., 2021). While most of these studies have looked for *Lm* in sick animals, healthy animals can constitute an important reservoir, releasing the pathogen in the environment through fecal excretion or abortion products. In this regard, it is worth mentioning that *Lm* prevalence can sometimes be as high as 30-40% in the feces of healthy cattle (Weber et al., 1995; Hurtado et al., 2017). Healthy carriage of *Lm* also exists in humans, as described in several studies (Lamont and Postlethwaite, 1986; Muller, 1990; MacGowan et al., 1991; Mascola et al., 1992; Iida et al., 1998; Grif et al., 2001; Grif et al., 2003). However, the techniques used to determine the prevalence of asymptomatic carriage have lacked sensitivity and have generally relied on testing for culturable bacteria in feces. A very recent study has significantly improved the knowledge of the frequency of this carriage, by studying the prevalence of *Lm* DNA in the stool of a French cohort of 900 healthy individuals. The use of PCR amplification of the *Lm* virulence gene *hly* revealed a significant proportion of 10% of asymptomatic *Lm* carriers in this population (Hafner et al., 2021). This study also indicated that metagenomics based on 16S rRNA gene sequencing (*i.e.*, metataxonomics) was less efficient in detecting healthy *Lm* carriers (an order of 5%), whereas full metagenomic studies using shotgun sequencing failed in detecting *Lm* DNA signal in the gut microbiota. This highlights the importance of using sensitive molecular techniques to detect healthy carriers. However, it should be remembered that these molecular biology-based approaches cannot determine whether the detected DNA is from live or dead bacteria.

Lm is known to be tolerant to many physical and physicochemical stresses, allowing it to survive in a wide range of environmental conditions (Tasara and Stephan, 2006; Gahan and Hill, 2014; Dorey et al., 2019; Matereke and Okoh, 2020; Quereda et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021). The ability of *Lm* to enter a so-called Viable But Non-Culturable state (VBNC) is also a key factor in the survival of this non-spore-forming bacterium following stress. This property was first described 20 years ago for *Lm* present in water (Besnard et al., 2000) and more recently within human cells (Kortebi et al., 2017), findings which raise the issue of detecting "silent" forms of this pathogen in agriculture, food and asymptomatic hosts (Bierne et al., 2018). Here, we review the state of knowledge on the VBNC status of *Lm*. The various techniques associated with detection of VBNC forms will not be extensively discussed in this review, but are summarized in **Table 1**, and we refer readers to excellent recent reviews on this topic (Kumar and Ghosh, 2019; Dong et al., 2020; Wideman et al., 2021). We apologize to the authors whose work was not cited, due to space constraints.

OVERVIEW OF THE VBNC STATE

Microorganisms colonize an impressive variety of ecological niches and survive a wide range of adverse environmental conditions. The survival strategies employed by bacteria encompass two main mechanisms. The first one is sporulation, which consists of the formation of a specialized cell (or endospore), metabolically inactive and resistant to many

TABLE 1 | Methods to study VBNC *Lm*.

Acronym	Full name	Mechanism of action	References
CTC–DAPI	5- cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride– 4',6-diamidino-2-phenylindole staining	CTC, a redox dye, is reduced to an insoluble fluorescent red CTC-formazan salt by the electron transport chain in actively respiring bacterial cells. The presence of red CTC crystals in bacterial cells is visualized by epifluorescence microscopy. Counterstaining with DAPI, which fluoresces blue, provides contrast and allows enumeration of total bacteria.	Bremer et al., 1998; Besnard et al., 2000; Cappelier et al., 2005; Dreux et al., 2007
DVC	Direct Viable Count	Incubation of the samples in a medium containing a limited level of nutrients and an antibiotic acting as an inhibitor of DNA replication, allows the viable cells to metabolize nutrients and elongate, while blocking their division. After staining with a fluorescent dye, elongated cells are counted by fluorescence microscopy.	Besnard et al., 2000; Besnard et al., 2002; Dreux et al., 2007; Giao and Keevil, 2014; Highmore et al., 2018
DVC –FISH	Direct Viable Count – Fluorescence In Situ Hybridization	This method combines DVC and FISH with a *Lm* fluorescent oligonucleotide probe (usually 16S rRNA) used to visualize bacteria by microscopy.	Moreno et al., 2012
Live/Dead BacLight	Live/Dead BacLight bacterial viability assay	This method discriminates between live and dead bacteria based on membrane integrity, using a dual staining with DNA-intercalating dyes, SYTO 9 green-fluorescent stain and Propidium Iodide (PI) red-fluorescent stain. These dyes differ in their ability to enter bacteria. SYTO 9 enters in all cells, whereas PI only enters bacteria with compromised membranes, causing reduced SYTO 9 fluorescence. With an optimized mixture, dead bacteria will fluoresce red, while live bacteria will fluoresce green.	Dreux et al., 2007; Lindback et al., 2010; Giao and Keevil, 2014; Kortebi et al., 2017; Afari and Hung, 2018; Robben et al., 2019; Gu et al., 2020
Flow cytometry	Flow cytometry	This method estimates the number of viable cells in a heterogeneous population using a flow cytometer. Viable cells are discriminated by fluorescent dyes that either penetrate all cells (*e.g.*, SYTO 9 or SYTO 24) or penetrate only cells with compromised membranes (*e.g.*, PI).	Truchado et al., 2020; Chiara et al., 2021
CFDA	Carboxy-fluorescein diacetate staining	CFDA is a colorless fluorogenic ester that enters bacterial cells through diffusion. CFDA is enzymatically cleaved by esterase enzymes of viable cells yielding a fluorescent probe, which accumulates exclusively in bacteria with intact membranes. This labeling can be used for monitoring viable cells by fluorescence microscopy or flow cytometry.	Olszewska et al., 2015; Arvaniti et al., 2021
ATP	BacTiter-Glo Microbial Cell Viability assay	The method is based on the quantification of ATP. A sample is mixed with a luciferase reagent and the luminescence is recorded in relative light units (RLU) by a luminometer. Data are converted to ATP concentration per cell using a standard curve, and is proportional to the number of viable cells.	Lindback et al., 2010; Robben et al., 2019
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Amplification of a bacterial DNA fragment by real time polymerase chain reaction. This method indicates presence of bacterial DNA but does not assess viability.	Wery et al., 2006; Klein et al., 2011; Maynaud et al., 2016; Afari and Hung, 2018
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Detection of a messenger RNA (mRNA), by PCR amplification of a cDNA sequence synthesized from the mRNA template.	Lindback et al., 2010; Zolfaghari et al., 2020
v-PCR (EMA- or PMA-qPCR)	viability-PCR	Ethidium monoazide (EMA) and propidium monoazide (PMA) are photoreactive DNA-intercalating dyes that, when used in combination with polymerase chain reaction, prevent the DNA of dead bacteria from being amplified. The dyes selectively enter only the compromised cells (PMA being more selective for dead cells than EMA). Exposure to light crosslinks the dye to the DNA and blocks the PCR reaction (generally in qPCR).	Desneux et al., 2016; Overney et al., 2016; Overney et al., 2017; Brauge et al., 2020; Gu et al., 2020; Truchado et al., 2020; Bernardo et al., 2021
Metataxonomics 16S-rRNA	16S rRNA gene sequencing	This method is based on the sequencing of the 16S rRNA gene, which is found in all bacteria and archaea. 16S rRNA gene sequencing is commonly used for identification, classification and quantification of microbes within microbial communities. This method indicates presence of bacterial DNA but does not assess viability.	Pang et al., 2018
Metagenomics	Whole shotgun metagenomic sequencing	Direct sequencing of all the DNA present in a sample. Shotgun sequencing has more power to identify less abundant taxa than 16S rRNA sequencing, but requires in-depth bioinformatics analysis. This method indicates presence of bacterial DNA but does not assess viability.	De Goffau et al., 2019

Only methods cited in this review are listed and ordered as follows: fluorescence-based methods, biochemical methods and molecular biology methods. The reference list provides examples, but is not exhaustive.

environmental perturbations (*e.g.,* heat treatment, high pressure, dehydration, lack of nutrients, antimicrobial agents, UV and γ radiation). When conditions become favorable for regrowth, the spore is able to germinate to regenerate a vegetative bacterium (Setlow and Johnson, 2019). The second mechanism consists of entry into a state of dormancy, allowing non-spore-forming bacteria to survive environmental stress (*e.g.*, nutrient starvation, light exposure, temperature change, osmotic pressure, oxygen concentration, pH), antimicrobial compounds (*e.g.*, disinfectants, antibiotics) or host factors (Kaprelyants et al., 1993). This dormant state is a reversible state of slowed activity, in which a subpopulation of bacterial cells can survive for prolonged periods without cell division (**Table 2**). In bacterial species that transiently lose the ability to grow on standard culture media on which they are known to grow, this is referred to as a VBNC state. Bacteria in the VBNC state (here termed "VBNC bacteria") fail to multiply and form colonies on plates, while maintaining a slowed metabolic activity. First described in 1982 for Gram-negative bacteria [*Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, (Xu et al., 1982)], the VBNC state is, like sporulation, a reversible state. VBNC bacteria can regain their lost culturability under certain conditions called "resuscitation" (Oliver, 2010; Li et al., 2014; Zhao et al., 2017). Illustrating this property, *Vibrio vulnificus*, an environmental bacterium living in estuarine waters, enters a VBNC state during winter months and regrows during warmer months (Whitesides and Oliver, 1997).

It should be noted that, in addition to the VBNC state, other physiological states associated with the survival of bacteria in stressful conditions have been described, such as the sublethal state or the persistent state. The terminology used can be confusing, as the terms sometimes cover overlapping phenotypes, or phenotypes associated with clinical pictures (*i.e.,* persistent infection and latent infection). For clarity, we provide a table defining these terms (**Table 2**). In particular, so-called "persisters" appear following antibiotic treatment, to which they adapt and acquire tolerance to the treatment (Gollan et al., 2019). Some authors propose that persisters and VBNC bacteria are actually part of the same *continuum* in the natural life cycle of microorganisms, between actively growing, dormant and dead cells. VBNC cells would thus be in a deeper dormant state than persister cells (Ayrapetyan et al., 2018). A recent study suggests that sublethal injury is also an initial stage of dormancy that is followed by the VBNC state (Arvaniti et al., 2021). It can be pointed out that VBNC cell subpopulations can also exist naturally in unstressed environments, as the result of a stochastic physiological phenomenon, which leads to a bacterial pool predisposed to resist potential future stresses (Ayrapetyan et al., 2015; Goncalves and De Carvalho, 2016).

Since its discovery in 1982, the VBNC state has been described for more than 100 species, two-thirds of which are pathogenic species (Oliver, 2010; Li et al., 2014; Ramamurthy et al., 2014; Zhao et al., 2017; Dong et al., 2020). This list is constantly growing. In general, bacteria capable of entering the VBNC state have a broad phylogenetic distribution, suggesting that the VBNC state is a general strategy adopted by different genera to survive adverse conditions (Li et al., 2014; Pinto et al., 2015). Currently, the majority of species described as entering the VBNC state are Gram-negative bacteria. Among Gram-positive bacteria, in addition to *Lm*, there are other pathogens of the firmicutes phylum (*e.g.*, *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis*), and actinobacteria (*e.g.*, *Mycobacterium tuberculosis*). Because of their non-culturable nature and resuscitation capacity, VBNC bacteria are a public health problem. For species responsible for food poisoning, VBNC

TABLE 2 | Definitions of terms used to describe different survival strategies of bacteria to cope with environmental, antimicrobial, or host-derived stress.

Term	Definition
Sporulation	When exposed to stress, some bacteria undergo asymmetric cell division to produce a metabolically inactive daughter cell, called a spore. Upon exposure to favorable environmental conditions, a fraction of the spore germinates and initiates rapid growth to restore the population. Sporulation is a specialized development program.
Dormant state	Bacteria are in a dormant state when they stop dividing and strongly, or even completely reduce their metabolic activity when exposed to stress. Under specific stimuli, these cells regain their activity and have the ability to divide again. This generic term includes different phenotypes (such as persistence and VBNC states).
Viable But Non Culturable state	Bacteria are in a VBNC state when they have transiently lost their ability to grow on routine growth medium on which they were previously able to grow. These bacteria exhibit low but detectable metabolic activity, maintain membrane integrity, express genes and produce proteins at low levels. They cannot be detected by colony forming units (CFU) on standard culture media. Under appropriate conditions, VBNC bacteria regain their ability to be culturable through a process called resuscitation.
Sublethal state	Bacteria are in a sublethal state when they have suffered damage to cell structures due to chemical or physical processes, but are not killed and have the ability to repair their damage under appropriate conditions. They can grow on culture media, however none-selective. Sublethally injured cells that remain metabolically active but cannot be resuscitated in culture media may enter the VBNC state.
Persistence state	Bacteria are in a persistence state when they enter a state of slow or no growth and are able to survive stress within an otherwise stress-sensitive clonal population. This is a general term that describes an adaptive and reversible process. This term is often associated with persisters.
Persisters	This term defines a subpopulation of bacteria that survive antibiotic treatment, without acquiring genetic changes that confer resistance. Persisters are refractory to antibiotic treatment *in vitro* or in the host due to low target activity or low antibiotic uptake.
Persistent infection	This clinical term refers to an infection that is not effectively eliminated by the host. Bacteria survive in the host's tissues for a prolonged period of time despite the host's immune defenses.
Latent infection	This clinical term refers to persistent asymptomatic infection. Latent infection occurs when a microbe persists in a host without disrupting homeostasis sufficiently to cause clinical symptoms or disease. Latency can be beneficial to both the host and the microbe, in a balance where the host avoids progressive damage from interaction with the microbe and the microbe secures a stable niche in which to survive. Latency can be deleterious to the host when a latent infection reactivates, causing symptomatic disease months or years after the initial infection.

forms escape quality controls in food industries, as detection of contamination is most often based on methods dependent on bacterial growth in conventional enrichment media.

VBNC bacteria are also suspected of causing asymptomatic infections. However, while the ability to enter a VBNC state has been described for many pathogens, the demonstration that this state exists in the host is virtually undocumented, except in the case of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Human infection with Mtb produces an active form of the disease, tuberculosis (TB), one of the top ten causes of death worldwide, as well as an asymptomatic form called latent tuberculosis infection (LTBI) (Gengenbacher and Kaufmann, 2012; Dutta and Karakousis, 2014; Peddireddy et al., 2017). Mathematical models based on immunoassays suggest that a quarter of the world's population is affected by LTBI, with a risk of reactivation to TB in about 5-10% of cases. In LTBI, Mtb bacilli enter a dormant state characterized by reduced metabolic activity in response to stressful intracellular conditions and activation of the host immune response. The bacteria enter a non-culturable state in the lungs, but also potentially in other organs (Dutta and Karakousis, 2014), without causing any symptoms, a VBNC state termed "latency". Studies suggest that Mtb bacilli coexist in mixed populations with culturable stages, in a physiological *continuum* from persistence to dormancy (Gengenbacher and Kaufmann, 2012; Dutta and Karakousis, 2014; Gample et al., 2019). Reactivation of TB shows that latent VBNC cells are able to retain or, at least, regain their virulence potential upon resuscitation. Resuscitation factors (Rpfs), initially identified in the bacterium *Micrococcus luteus* (Kaprelyants et al., 1994; Mukamolova et al., 1998) and later in mycobacteria (Mukamolova et al., 2002; Rosser et al., 2017) are involved in this process. Some fatty acid species, adenylate cyclase, transcription factors regulating respiration pathways, and carbohydrate metabolism, also appear to be involved in Mtb resuscitation (Shleeva et al., 2013; Salina et al., 2019).

INDUCTION OF THE VBNC STATE OF *Lm* IN WATER

To our knowledge, the entry of *Lm into* the VBNC state in a natural environment was first suggested by Colburn et al. (1990), following the observation of lower frequency of culturable bacteria detected in marine water samples than in fresh water samples of the same estuary in California (Colburn et al., 1990). Bremer et al. (1998) also hypothesized this after examining the survival of *Lm* in sterilized seawater in the laboratory (Bremer et al., 1998). After 26 days, a fraction of the cell population seemed to be VBNC, as the number of viable cells quantified by measurement of respiratory activity (*i.e.*, CTC-DAPI, **Table 1**) was greater than that determined by traditional colony forming units (CFU) counts on tryptic soy yeast extract agar plates. Besnard et al. (2000) then formally established this capacity of *Lm* to enter the VBNC state (Besnard et al., 2000), by culturing bacteria in a nutrient-free water or "microcosm water" (*i.e.,* sterile filtered water of pH = 6), a medium used to study the VBNC state of *Campylobacter jejuni* (Rollins and Colwell, 1986). Under these conditions, and using Direct Viable Counts (DVC) and CTC-DAPI methods (**Table 1**), these authors showed that two strains of *Lm*, CNL 895807 and ScottA, formed VBNC bacteria after four to six weeks of nutrient deprivation. Furthermore, these forms retained metabolic activity for up to ten weeks. The same team later revealed the influence of inoculum concentration, light exposure, temperature, strain used, pH and NaCl concentration on the efficiency of the phenomenon (Besnard et al., 2002). Thus, a high inoculum concentration decreased the induction of the VBNC state, probably due to a higher nutrient flux within the population. Conversely, higher salt concentration or incubation temperatures stimulated entry into the VBNC state. A strain effect was also found: for the Scott A and CNL 895807 strains, the VBNC state was maintained throughout the experiment, whereas the VBNC state was transient for the LO28 and ATCC 19115 strains. VBNC bacteria induced in microcosm water conserve a metabolic activity, as demonstrated by *de novo* production of ATP and mRNA (Lindback et al., 2010). In the latter study, the quantification of viable bacteria was estimated by the LIVE/DEAD BacLight assay, a dual-staining microscopy method that assesses membrane integrity (**Table 1**).

More recently, a study showed that tap water was also a highly deprived medium in which *Lm* can enter the VBNC state, particularly within biofilms formed on stainless steel surfaces (Giao and Keevil, 2014). Thus, although *Lm* is not known to be a waterborne pathogen, the potential for *Lm* cells to remain on surfaces with only water as a nutrient medium can have a significant impact on public health. If decontamination is insufficient after surface cleaning, *Lm* could remain on food industry surfaces (*e.g.,* floors, walls, workbenches, sinks, refrigerators) and be transferred into food products.

The studies mentioned in this section are listed in **Table 3**.

INDUCTION OF THE VBNC STATE OF *Lm* UNDER AGRO-INDUSTRIAL CONDITIONS AND IN FOODS

In addition to water, all ecosystems in the agricultural and food industries can be potentially impacted by VBNC *Lm* contamination. Because of the health risks of such contamination, many studies have addressed this problem by modeling the contamination by VBNC *Lm* in reconstituted systems (also called bacterial microcosms). The main technical difficulty is to correctly differentiate dead from VBNC cells in complex matrices. Works have examined the persistence of *Lm* in urban or agricultural effluents, after inoculation of bacteria into sewage sludge (Wery et al., 2006), cattle manure (Klein et al., 2011), or digestates from agricultural waste methanizers (Maynaud et al., 2016). In these studies, comparison of viable bacterial counts estimated by amplification of a bacterial gene by quantitative real-time PCR (qPCR) (**Table 1**), to that of culturable bacteria by CFU, showed a slower decline of *Lm* cells counted by PCR than by CFU, suggesting the presence of non-culturable cells in these microcosms. However,

TABLE 3 | VBNC *Lm* in water.

Lm strains	Tested conditions	Incubation time	References
Scott A, KM	Filter-sterilized seawater at 12.8 °C or 20.8 °C	20 to 28 days	Bremer et al., 1998
CNL 895807 Scott A ATCC 19115 LO28	Filtered sterilized water adjusted to pH 6.0, incubated at 20°C or 4°C with or without NaCl 7%, with gentle shaking at 100 rpm, 6 log CFU/mL	4 to 6 weeks	Besnard et al., 2000
CNL 895807 Scott A ATCC 19115 LO28	Filtered sterilized water adjusted to pH 6.0, incubated at 20°C or 4°C, with or without NaCl 7%, with gentle shaking at 100 rpm, 8 to 9 log CFU/mL (high inoculum) 6 log CFU/mL (low inoculum)	Up to 12 months 28-80 days (9-28 days under natural sun light)	Besnard et al., 2002
Scott A EGDe 14 strains from different origins	Filtered, autoclaved MQ water adjusted to pH 6.0, incubated at 4°C, with gentle shaking at 100 rpm, 7 log CFU/mL	5 to 12 weeks	Lindback et al., 2010
NCTC 13372	Biofilm on stainless steel coupons in tap water, incubated at different temperatures, 7 log CFU/mL	24 and 48 hours	Giao and Keevil, 2014

Studies are listed by publication date in the References column.

qPCR does not distinguish DNA of non-culturable bacteria from dead bacteria, generating a risk of overestimating the number of VBNC bacteria. Accurate quantification of only viable bacteria has been improved by a so-called "viability-PCR" (v-PCR), a method combining the use of an amplification inhibitor, such as propidium monoazide (PMA) or ethidium monoazide (EMA), and qPCR (PMA-qPCR; EMA-qPCR, **Table 1**). In particular, PMA is a DNA intercalant which enters into cells with compromised membrane integrity and blocks amplification of their DNA. Treating bacterial cells with PMA, prior to DNA extraction, therefore allows for more selective detection of viable bacteria (although there remains a bias for DNA amplification from dead cells that would have retained an intact membrane) (Dong et al., 2020; Fleischmann et al., 2021; Wideman et al., 2021). This technique provided strong evidence for the presence of VBNC *Lm* in pig manure (Desneux et al., 2016), as well as in food environments (see below and **Table 1**).

Other studies reported induction of the VBNC state of *Lm* on the surface of plants, including parsley (Dreux et al., 2007) and spinach leaves (Highmore et al., 2018). Indeed, *Lm* has evolved mechanisms to colonize plants (Truong et al., 2021). The possibility that conventional culture-based counts underestimate the number of viable *Lm* on plant products must be considered in the context of cross-contamination risks, when a contaminated product is washed and pathogens are transferred from the contaminated product to water and then from water to clean product. Two studies looked at this problem, investigating whether process wash water (PWW) could be a vector for VBNC contamination. *Lm* contamination of a PWW was modeled in the laboratory, either by inoculating a PWW of shredded lettuce with a cocktail of six *Lm* strains (Truchado et al., 2020) or spinach and lettuce rinse waters with a cocktail of three *Lm* strains (Gu et al., 2020). Potential VBNC were detected in these wastewaters by the PMA-qPCR method or viability microscopy with the BacLight assay (**Table 1**). Importantly, in both cases, exposure to sanitizers increased the formation of unculturable viable cells (see next section).

With respect to foods, there is ample evidence for the presence of VBNC in food matrices or food processing environments. Olszewska et al. (2015) studied the fate of *Lm* after bacterial inoculation of long-ripened hard cheese samples from retail market, left in different packaging conditions for up to 90 days at 6°C (Olszewska et al., 2015). As an approach to assess bacterial viability in complex matrices, these authors used direct epifluorescence filtration, based on fluorescence staining with carboxyfluorescein diacetate (CFDA), which allows tracing bacteria that exhibit metabolic activity (**Table 1**). Their results showed significant discrepancies between CFDA and CFU numbers at each sampling point during cheese storage, regardless of packaging conditions, indicating the existence of VBNC cells. Overney et al. (2016) studied the behavior of *Lm* grown in two food contaminants, smoked salmon juice or meat exudate, by quantifying total cells by qPCR, viable cells by PMA-qPCR, and culturable cells by CFU counting (Overney et al., 2016). Meat exudate appeared to be a much more stressful medium than smoked salmon juice, and generated VBNC cells. These authors proposed that these differences between meat exudate and smoked salmon juice could be explained by the difference in pH (5.4 for meat exudate, 6.2 for smoked salmon juice), which is an environmental stress. Importantly, there is evidence for the existence of VBNC forms, no longer in laboratory models, but directly in food samples. With a DVC method coupled with FISH using a 16S rRNA probe (**Table 1**), Moreno et al. (2012) suggested the existence of VBNC *Lm* in RTE vegetable samples (Moreno et al., 2012). Recently, a study using PMA-qPCR provided strong arguments for the existence of VBNC *Lm* in RTE salads (Bernardo et al., 2021). Sources of product contamination can come directly from surfaces in the production environment. By directly sampling critical areas of four seafood plants, over eight months, Brauge et al. (2020) detected VBNC *Lm*, primarily after cleaning and disinfection operations (Brauge et al., 2020), highlighting the fact that all industrial disinfectants can fail to inactivate *Lm* cells on inert surfaces, as discussed below.

The studies mentioned in this section are listed in **Table 4**.

TABLE 4 | VBNC *Lm* in agri-food industrial conditions.

Lm strains	Tested conditions	Incubation time	References
Scott A	Sewage sludge, at 20°C, 6 log CFU/mL	2, 5, 9 and 17 days	Wery et al., 2006
EGDe, EGDe-GFP LmP60	Parsley leaves under low relative humidity (47–69%) 7 log CFU/mL (high inoculum) 4.5 log CFU/mL (low inoculum)	2 and 15 days	Dreux et al., 2007
Endogenous strains	Cattle feedlot manures and compost, stored at 4 °C in the dark	112 days	Klein et al., 2011
Endogenous strains	Samples of RTE foods of vegetal origin from market		Moreno et al., 2012
ATCC19112	Cheese samples of long-ripened hard cheese, at 6°C, 6-7 log CFU/g	90 days	Olszewska et al., 2015
A strain isolated from pig manure	Nine piggery effluents		Desneux et al., 2016
CCL 500	*Lm* cultured in smoked salmon juice or meat exudate, at 25°C, 3 log CFU/mL	48 hours	Overney et al., 2016
Rifampicin-resistant mutant obtained from CIP110870 (isolated from pig manure)	Digestates from agricultural biogas plants, at 24°C, 6-7 log CFU/mL	40 days	Maynaud et al., 2016
Scott A-GFP	Spinach leaves washed in chlorinated water, 6 log CFU/mL	2 minutes	Highmore et al., 2018
3-strain cocktail (FS2025, FS2030, FS2061)	Rinse water of spinach or romaine lettuce leaves (untreated or chlorinated or peracetic-treated water), 6 log CFU/mL	30 seconds	Gu et al., 2020
6-strain cocktail	Chlorine-treated process wash water from washing shredded lettuce, 5 log CFU/mL	30 seconds + 1 and 3 hours	Truchado et al., 2020
Endogenous strains	Environmental samples collected in smoked salmon processing plants		Brauge et al., 2020
Endogenous strains	Samples of ready-to-eat (RTE) salad, incubated at 4, 12 or 16°C	Up to 8 days	Bernardo et al., 2021

Studies are listed by publication date in the References column.

INDUCTION OF THE VBNC STATE OF *Lm* BY EXPOSURE TO ANTIMICROBIAL TREATMENTS AND IN BIOFILMS

The eradication of microorganisms in food processing plants, hospitals and domestic environments is most often done through disinfectants, while preservatives are used to maintain the microbiological quality of food, and antibiotics remain the first-line treatment for bacterial infections. However, many of these antimicrobial agents are not very effective on VBNC bacteria, which not only have a slower metabolism, but a different morphology and composition, than vegetative bacteria, making them more resistant to physico-chemical stress. (Li et al., 2014; Dong et al., 2020). Additionally, and importantly, as entering a VBNC state is a physiological adaptation to stress, these antimicrobial treatments may stimulate formation of VBNC bacteria. In the case of *Lm*, an initial study suggested that exposure of bacteria to potassium sorbate could promote the formation of VBNC *Lm* at 37°C (Cunningham et al., 2009). Later, chlorinated treatments were associated with the appearance of VBNC forms, both in fresh produce (Highmore et al., 2018) and in wastewater (Truchado et al., 2020). This is of particular concern because chlorine is the most commonly used sanitizer in industry and its efficacy is typically assessed using culturable bacterial counts (López-Gálvez et al., 2019). It is worth noting that bacterial adaptation to chlorine-containing disinfectants induces physicochemical and morphological changes in *Lm* described for other species entering the VBNC state, in particular a transition from the typical rod shape of *Lm* bacilli to a coccoid shape (Gao and Liu, 2014). Treatments with lower concentrations of chlorine or benzalkonium chloride also show induction of VBNC *Lm* (Afari and Hung, 2018; Noll et al., 2020; Truchado et al., 2020). VBNC *Lm* also emerged in presence of other antimicrobial agents, such as surfactants (Robben et al., 2018), preservatives (Zolfaghari et al., 2020), essential oils (De Medeiros Barbosa et al., 2020) or peracetic acid (Gu et al., 2020; Arvaniti et al., 2021). Chiara et al. (2021) interestingly showed that the origin of the bacterial cells has a significant impact on the viability and culturability of *Lm* against antimicrobial treatments. Thus, mild heat treatment combined or not with terpenoids mainly affected cell culturability (assessed by CFU count) rather than viability (assessed by flow cytometry, **Table 1**) (Chiara et al., 2021).

Some new technologies to ensure the preservation and safety of RTE without the use of disinfectant molecules, or heating treatment, may also induce a loss of cultivability of *Lm* while maintaining a viable subpopulation. This is suggested by experiments conducted not directly on *Lm*, but on the closely related non-pathogenic species *Listeria innocua*, to evaluate a pulsed light treatment. A significant discrepancy was observed between the number of conventional CFUs and the various viability staining parameters, suggesting that a significant proportion of bacteria shifted to the VBNC state after pulsed light treatment. The loss of cultivability was associated with oxidative stress and DNA damages, rather than cell membrane

disruption or inactivation of intracellular enzymes (Kramer and Muranyi, 2014). It is important to mention that not only may VBNC *Lm* be induced by industrial treatment, but also tolerate higher concentrations of antimicrobials after adaptation to a first treatment (Noll et al., 2020) or upon a combination of treatments (Robben et al., 2018). In addition, VBNC forms induced by industrial cleaning products can become tolerant to antibiotics, particularly those used to treat listeriosis, such as ampicillin and gentamicin (Robben et al., 2019; Noll et al., 2020).

Lm like many other bacterial species can form biofilms, which also counteract general cleaning and disinfection procedures and make it difficult to remove this pathogen from food processing surfaces (Bridier et al., 2015). It is of note that *Lm* can enter a VBNC state within a biofilm (Chae and Schraft, 2001; Giao and Keevil, 2014; Brauge et al., 2018). Highmore et al. (2018) showed that VBNC *Lm* adhering to the surface of spinach leaves are present at junctions and stomata, a location favoring biofilm formation on the leaf surface. Despite the protective effect of the biofilm, chlorine exposure manages to induce the VBNC state within the biofilm (Highmore et al., 2018). The molecular characteristics of the bacterial surface appear to play a role in the efficiency to enter the VBNC state. For example, Brauge et al. (2018) showed that *Lm* mutants lacking N-acetylglucosamine in wall teichoic acids generate a higher population of VBNC in a biofilm (Brauge et al., 2018). The same team thereafter revealed that exposure of *Lm* biofilms on stainless steel or polyvinyl chloride to quaternary ammonium and hydrogen peroxide disinfectants reduced cultivable populations and induced VBNC populations (Brauge et al., 2020). Similarly, Overney et al. (2017) showed induction of the VBNC state in *Lm* biofilms formed on stainless steel after treatment with a chlorinated alkaline cleaner or quaternary ammonium disinfectant (Overney et al., 2017). Of note, in the presence of disinfectants, the difference between initial and final cell number was not significantly different when bacteria were grown in the presence of smoked salmon juice or meat exudate (Overney et al., 2017), which contrasts with the effect of the food soil itself (Overney et al., 2016) and further highlights the impact of stress induced by cleaning procedures on VBNC formation.

The studies mentioned in this section are listed in **Table 5**.

INDUCTION OF THE VBNC STATE OF *Lm* IN THE HOST

The hypothesis that *Lm* can enter a VBNC state in the host, particularly in an intracellular phase, has emerged from work in human epithelial cell infection models. The study of prolonged *Lm* infection in hepatocytes or trophoblast cells revealed a change in the pathogen's intracellular lifestyle, between the well-known active phases of cytosolic replication and intercellular dissemination (Radoshevich and Cossart, 2017) and a novel so-called "persistence" phase, in which the bacteria enter into dormancy within vacuoles, named LisCVs (*Listeria*-containing-vacuoles) (Kortebi et al., 2017). Thus, after a few days of infection, cytosolic bacteria cease to produce the actin polymerization factor ActA and are captured by intracellular membranes in an a xenophagy-like process, forming acidic vacuoles marked by the lysosomal protein LAMP1 (**Figure 1A**). In these single-membrane perinuclear compartments (**Figure 1B**), a bacterial subpopulation is degraded, while a majority population resists stress and enters a state of slowed growth. LisCVs remain intact in dividing cells during mitosis (**Figure 1C**), in the same way that lysosomes do not disintegrate during mitosis, but are partitioned as separate vesicles. This ability of LisCVs to segregate in daughter cells could be a way for dormant intracellular *Lm* to spread during epithelial tissue renewal.

Several evidences strongly suggest that a subpopulation of bacteria enters the VBNC state in LisCVs. First, after three days of infection, the number of intracellular bacteria quantified by microscopy is much higher than that determined by the classical CFU method (Kortebi et al., 2017). Second, the Baclight Live/Dead technique (**Table 1**) indicates that two-thirds of the vacuolar bacteria retain their membrane integrity. Additionally, when the *actA* gene is kept inactive, vacuolar *Listeria* all cease to be culturable on agar media and can propagate during host cell mitosis (**Figure 1C**), without being degraded by intracellular host defense mechanisms, such as autophagy (Kortebi et al., 2017). After several passages, parasitized host cells still harbor non-culturable bacteria in LAMP1-positive compartments (**Figure 1D**). A few bacteria exhibit a division septum (**Figure 1E**) and several retain membrane integrity, as indicated by the Baclight assay (**Figure 1F**), which is an indication of viability. Inhibition of ActA production is necessary to maintain the VBNC state during long-term infection, as this phenotype is reversible upon re-expression of the *actA* gene in an Δ*actA* mutant. Of note, reactivation of a subpopulation of vacuolar dormant bacteria was observed randomly during host cell passages. This re-growth process occurs by a stimulus not identified to date (Kortebi et al., 2017).

Overall, these results invite to consider the possibility that *Lm* may generate intracellular VBNC forms that might not be detected in tissue samples by bacterial growth-based diagnostic tests. The capacity to persist in intracellular vacuoles could also be involved in *Lm* escape from antibiotic therapy. We found that a high-dose of gentamicin cleared cytosolic *Lm* but not vacuolar *Lm* (Kortebi et al., 2017). LisCV could thus be a niche where *Lm* is protected from gentamicin and other antibiotics, similar to the aminoglycoside-tolerant small colony variants of *Staphylococcus aureus* (Mitchell et al., 2010), or the extracellular persisters of *Lm*, which emerge during bacterial growth in antibiotic-supplemented broth (Knudsen et al., 2013). In addition to antibiotic tolerance, it is possible that VBNC *Lm*-bearing host cells are not recognized and destroyed efficiently by immune cells. Related to this idea, we recently demonstrated that the vacuolar persistence phase of *Lm* in hepatocytes coincided with transcriptional inhibition of genes encoding acute phase proteins, which are important effectors of innate immunity (Descoeudres et al., 2021).

The existence of VBNC *Lm in vivo* remains to be formally demonstrated, but some studies support the hypothesis. As early as 1948, while trying to isolate the germs responsible for bovine

TABLE 5 | VBNC *Lm* induced by antimicrobials and/or in biofilms.

Lm strains	Tested conditions	Incubation time	References
Murray 7148	Biofilm on glass slides at 37°C, 7 log CFU/mL	Up to 10 days	Chae and Schraft, 2001
10403S	BHI adjusted to pH 4.0 with HCl, incubated at 37°C in the presence or absence of 50 mM K sorbate	24 hours	Cunningham et al., 2009
NCTC 13372	Biofilm on stainless steel coupons in tap water, incubated at different temperatures, 7 log CFU/mL	24 hours	Giao and Keevil, 2014
Listeria innocua DSM 20649	Pulsed light treatment (on a heat-stable polysaccharide gel surface with one single intense pulse), 6 to 7 log CFU/cm^2	one pulse	Kramer and Muranyi, 2014
9 ATCC strains from different serotypes	Chloramine-T or sodium hypochlorite in TSB at 37°C, 6 log CFU/mL	20 hours	Gao and Liu, 2014
LO28 EGDe	Biofilm on stainless steel surfaces, with different cleaning and disinfection procedures using Topax, a chlorinated alkaline cleaner or Triquart, a quaternary ammonium-based disinfectant, 8 log CFU/coupon	4 days	Overney et al., 2017
EGDe EGDe Δ*lmo2549* EGDe Δ*lmo2550* DSS 1130 BFA2	Biofilm on stainless steel coupons at 30°C, 7 log CFU/mL	48 hours	Brauge et al., 2018
Scott A-GFP	Spinach leaves washed in chlorinated water, 6 log CFU/mL	2 minutes	Highmore et al, 2018
Cocktail of five nalidixic acid-adapted strains (obtained from Scott A, LCDC-81-861, F8027, H7750 and G3990 strains)	Electrolyzed oxidizing (EO) water (pH 2.3), after low free chlorine concentration treatments, 6 log CFU/mL	1 and 5 minutes	Afari and Hung, 2018
EGDe	Combinational effect of surfactants and salts at room temperature, 9 log CFU/mL	1 and 24 hours	Robben et al., 2018
3253 EGDe QC1 Scott A	11% Lutensol XP30 + 1 M MgCl2, at room temperature, 9 log CFU/mL Susceptibility tests to antibiotics: ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem Test of quaternary ammonium compounds (*e.g.*, Benzalkonium chloride) and preservatives (bronopol, sodium azide)	24 hours	Robben et al., 2019
3-strain cocktail (FS2025, FS2030, FS2061)	Rinse water of spinach or romaine lettuce leaves (untreated or chlorinated or peracetic-treated water), 6 log CFU/mL	30 seconds	Gu et al., 2020
SLCC2540s	- Adaptation to benzalkonium chloride - Susceptibility tests to antibiotics: ampicillin, benzylpenicillin, ceftriaxone, ciprofloxacin, daptomycin, erythromycin, gentamicin, linezolid, meropenem, rifampicin, tetracycline, tigecycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomycin, at 37°C, 8.2 log CFU/mL	24 hours	Noll et al., 2020
Cocktail of three strains (ATCC 7644, ATCC 19112, ATCC 19117)	Essential oils in meat-based broth and PBS at 30°C, 7 log CFU/mL	60 to 180 minutes	de Medeiros Barbosa et al., 2020
ATCC 19115	Distilled water, with NaCl 30% at 4°C, 7 log CFU/mL	27 days	Zolfaghari et al., 2020
6-strain cocktail	Chlorine-treated process wash water from washing shredded lettuce, 5 log CFU/mL	30 seconds + 1 and 3 hours	Truchado et al., 2020
Lm1 Endogenous strains	- Single species and mixed biofilms grown on stainless steel and PVC after quaternary ammonium compound (QA) and hydrogen peroxide (HP) treatment, 9 log CFU/mL - Environmental samples collected in smoked salmon processing plants before cleaning and disinfection (C&D) operations	20 minutes	Brauge et al., 2020
Scott A	Non-treated (control) or treated bacteria (mild heating (55°C), for 30 min combined or not with terpenoids) and stored at 4°C, followed by inoculation on Gorgonzola rind, 4.6-4.8 log CFU/g	3 and 7 days	Chiara et al., 2021
Scott A	Exposure to peracetic acid at 40 ppm, at 20°C, 9 log CFU/mL	3 hours	Arvaniti et al., 2021

Studies are listed by publication date in the References column.

listeriosis, Gray et al. (1948) reported the non-culturability of *Lm* (Gray et al., 1948). Thus, the plating on tryptose agar of crushed brains of animals presenting clinical signs of listeriosis revealed no, or very few, bacterial colonies after 24 hours at 37°C. Surprisingly, re-spreading the same samples several months later, after storage in a refrigerator at 4°C, generated numerous colonies. As Gray and Killinger, (1966) reported in a well-documented review, this phenomenon has been described in several other studies showing that after natural or laboratory infections, culture from tissue suspension or swabs did not always reveal the presence of *Lm* (Gray and Killinger, 1966). It was necessary to refrigerate infected tissue for several weeks or months at low temperatures to detect the bacteria. Since that time, culture media for isolating *Lm* have been greatly improved,

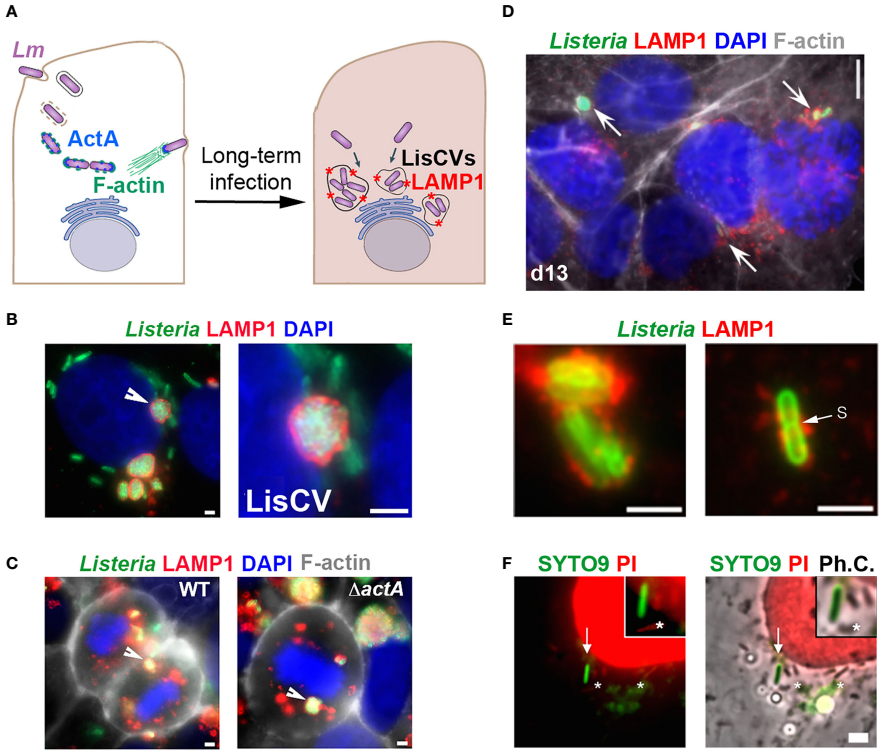


FIGURE 1 | Evidence for an intracellular VBNC state of *L. monocytogenes* (adapted from (Kortebi et al., 2017). **(A)** Simplified diagram of the different phases of the intracellular life of *Lm* in epithelial cells. Bacteria are internalized into the host cell and are contained in an entry vacuole. After escape into the cytosol, bacteria multiply and produce ActA, which allows them to polymerize actin (F-actin), move into the infected cell, and spread to adjacent cells (not shown). After a few days of infection, cytosolic bacteria cease to produce ActA and are captured in membrane compartments, forming *Listeria-containing vacuoles* (LisCVs) marked with LAMP1 (represented by red stars). In these acidic vacuoles, a subpopulation of bacteria can resist degradation and multiply slowly, up to entry into dormancy. **(B, C)** Observation of LisCVs by epifluorescence microscopy in human placental JEG3 cells infected for 3 days with *Lm*. LisCVs labelled with LAMP1 are in red, *Listeria* in green, DNA (stained with DAPI) in blue, and F-actin in white. **(B)** A cell contains several perinuclear LisCVs. The arrow indicates a LisCV shown at higher magnification in the image on the right. Bars: 2 µm. **(C)** LisCVs are present in mitotic cells infected with either the wild-type *Lm* strain (WT, left) or a Δ*actA* mutant (right). Bars: 2 µm. White arrows indicate representative LisCVs. **(D–F)** Subculturing of JEG3 cells infected with Δ*actA* bacteria leads to VBNC bacteria. **(D)** Cells infected for 3 days were subcultured and propagated until day 13 (d13) and stained as in **(C)**. Intracellular bacteria in LAMP1-positive compartments are indicated by arrows. At the same time, plating of infected cell lysates onto agar plates produces no colony (not shown). **(E)** High magnification images of non-culturable LAMP1-positive bacteria at d13. A bacterium with a division septum (s) is shown on the right. Bar: 5 µm. **(F)** JEG3 cells infected with non-culturable bacteria were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and stained with SYTO9 and PI (see BacLight assay, **Table 1**). Intact VBNC bacteria are stained green (arrow), while damaged bacteria (*) and nuclei are stained red. "Ph.C.": phase contrast. Bar: 1 µm. The top right squared images show higher magnifications, with one bacterium with an intact membrane (green) and three bacteria with a compromised membrane (red).

allowing more efficient culturability of the pathogen. However, these early observations are still intriguing and highlight the possibility that a listerial infection may be overlooked simply because the bacteria were not successfully isolated on the first culture attempt. Furthermore, the mechanism of the culturability enhancement effect at 4°C described by Gray et al. (1948) is not understood, and it is surprising that this phenomenon has not been further investigated. Recently, however, the existence of VBNC *Lm* has been evoked in a model of maternal-neonatal listeriosis in macaque monkeys, based on inconsistent results between CFU counts, which were sometimes negative on blood agar plates, while microscopy data showed Gram-positive rods in tissues (Wolfe et al., 2019). This model is of particular interest because the placentation, physiology, and immunology of pregnancy in the macaque is similar to that of the human species. A notable finding of this study is that some female macaques infected with a low inoculum of *Lm* were able to carry their pregnancies to term with no apparent signs of disease in either the mother or the neonate, whereas histological and cytokine examination of tissues after surgical removal revealed intrauterine signs of inflammation. This suggests the low-level impact of asymptomatic listeriosis, the subsequent consequences of which on the child are not known (Wolfe et al., 2019).

Molecular biology techniques based on PCR or DNA sequencing are currently the most effective in suggesting the presence of VBNC forms in host. From this perspective, we can cite two recent studies highlighting incidents of unusual detection of *Lm* DNA by metataxonomics or metagenomics approaches (**Table 1**). The first detected *Lm* DNA among all bacterial species identified in milk directly collected from the udder of healthy cows in a sterile manner (Pang et al., 2018). The second studied the placenta microbiome of women with gestational or delivery problems compared to women with normal pregnancies. The results revealed the presence of *Lm* DNA in one placenta, that of a mother whose pregnancy resulted in a premature birth but was not diagnosed for listeriosis (De Goffau et al., 2019). While these data do not demonstrate the existence of VBNC *Lm in vivo*, they do raise the importance of developing sensitive techniques to screen for *Lm* in at-risk humans, as well as in potentially healthy animals carrying the pathogen (see next section). As mentioned above, a PCR-based approach was much more effective in detecting *Lm* in the feces of healthy humans than metataxonomics or metagenomics (Hafner et al., 2021). Therefore, PCR-based approaches should be preferred to detect VBNC bacteria. However, development of sensitive viability estimation methods is required to determine the physiological status of the bacteria present in the tested samples.

RESUSCITATION AND VIRULENCE POTENTIAL OF VBNC *Lm*

VBNC forms participate in the dispersal and silent transmission of pathogens, but their ability to cause disease requires returning to an active state of virulence. This involves a conversion of dormant, non-culturable cells to an active, culturable state, a process termed "resuscitation" (Roszak et al., 1984; Baffone et al., 2006; Oliver, 2010; Ayrapetyan et al., 2018). Resuscitation is not synonymous with regrowth: a bacterium can be resurrected without dividing, and it is only after having completed the molecular program of exit from dormancy that it can divide on a nutrient-rich medium. To achieve the resuscitation of VBNC cells various physicochemical methods have been tested on different bacterial species, such as temperature shifts or supplementation with various nutrients or metabolites (Pinto et al., 2011; Li et al., 2014; Dong et al., 2020). However, in the case of *Lm*, most of these methods have failed to promote the resuscitation of VBNC forms (Lindback et al., 2010; Afari and Hung, 2018; Robben et al., 2018; Gu et al., 2020). The relative humidity of the environment could play a role for *Lm* exit from the VBNC state on leaf surfaces: resuscitation of VBNC *Lm* was observed when the relative humidity was close to 100%, but not in a dry environment (Dreux et al., 2007). Another study showed *Lm* cells heated in presence or absence of terpenoids recovered a partial culturability when inoculated on Gorgonzola rind, suggesting that VBNC cells can resuscitate under favorable conditions on food, such as higher availability of nutrients and other factors intrinsic to this food matrix (pH, water activity, relative humidity) (Chiara et al., 2021). However, these data did not exclude that the phenomenon resulted from a subpopulation of bacteria that remained culturable.

The possibility of VBNC *Lm* resuscitation in the host was first questioned by the experiments of Cappelier et al. (2005) showing that *Lm* VBNC remained avirulent *in vitro*, in tests of infection of human colon cells (HT-29), and *in vivo*, in a murine listeriosis model (Cappelier et al., 2005). Nevertheless, the same authors later observed that *Listeria* VBNC could resuscitate after incubation for two to six days in an embryonated chicken egg and regain their pathogenicity (Cappelier et al., 2007). Importantly, embryonated eggs allowed better recovery than non-embryonated eggs, suggesting that the substance involved in recovery is located in the chick embryo. Experiments in the worm *Caenorhabditis elegans* also support the hypothesis of VBNC *Lm* resuscitation in the host, through the observation of bacterial colonization of the intestinal tract after inoculation of VBNC forms (Highmore et al., 2018). Furthermore, in models of VBNC *Lm* formation in human epithelial cells, data suggest that subpopulations of unculturable *Lm* have the ability to return to an active growth stage, upon passages of infected host cells (Kortebi et al., 2017).

As previously mentioned, a family of proteins named Rpfs are involved in the resuscitation mechanism of *Micrococcus luteus* (Kaprelyants et al., 1994; Mukamolova et al., 1998) and Mycobacteria (Mukamolova et al., 2002; Rosser et al., 2017). *Lm* encodes two Rpf orthologs: Lmo0186 and Lmo2522 (Ravagnani et al., 2005; Pinto et al., 2013). Like the Rpf prototypes (Mukamolova et al., 2006; Telkov et al., 2006), *Lm* Rpf-like proteins have a lytic transglycosylase domain predicted to cleave glycosidic bonds in the peptidoglycan (PG). In agreement with this, recombinant Lmo0186 and Lmo2522 proteins have a muralytic activity on crude preparations of *Lm* cell walls, as well as on (NAG)3 MUF, an artificial polymer commonly used as a substrate for lysozyme (Pinto et al., 2013). However, while these enzymes demonstrate bacterial growth stimulating properties in minimal media, data indicating that they resuscitate VBNC *Lm* are still missing. More generally, if the muralytic activities of Rpfs are known to play a role in bacterial division, the functional mechanism of resuscitation remains to be clarified. Several hypotheses are proposed. An Rpf could act as a cytokine that, after being secreted by culturable cells, activates a receptor on the surface of VBNC cells and triggers the bacterial resuscitation process (Panutdaporn et al., 2006). Alternatively, it is not Rpf directly, but second messengers derived from PG lysis, that activate the regulatory cascade necessary for the resumption of growth, both of the local cell and, through diffusion, of adjacent bacteria (Nikitushkin et al., 2013). Another hypothesis proposes that an Rpf may be required to cleave a modified PG and release physical constraints, allowing cell growth to resume. This hypothesis is based on the observation that, in some bacterial species, the PG of VBNC cells undergoes increased total cross-linking and modifications, such as O-acetylation, which create a physical barrier for cell growth (Signoretto et al., 2000; Signoretto et al., 2002; Pfeffer et al., 2006). These hypotheses are not mutually exclusive. In any case, the conditions that trigger the expression of genes encoding Rpfs remain to be elucidated.

THE PROBLEM OF VBNC *Lm* IN AT-RISK PERSONS: PREGNANT WOMEN OR IMMUNOCOMPROMISED PEOPLE

The asymptomatic phase of invasive listeriosis (*i.e.,* the incubation period) can be long, particularly when associated with pregnancy [up to 3 months, (Goulet et al., 2013) (Angelo et al., 2016)], but the mechanisms associated with this asymptomatic phase are poorly understood. Furthermore, in maternal-neonatal (MN) listeriosis, women usually present with mild febrile symptoms or may even be asymptomatic (Charlier et al., 2020) and blood culture remains negative in about half of the cases tested (Charlier et al., 2017). This raises the question whether detection methods based on the culturability of the pathogen in pregnant women could miss VBNC *Lm*. This problem of screening could be particularly critical, should *Lm* cause early miscarriages. Currently, the dogma is that MN listeriosis is associated with late stages of pregnancy (*i.e.,* second or third trimester) (Charlier et al., 2020) but miscarriages occurring before 14 weeks of amenorrhea are generally not tested for *Lm*. Early spontaneous abortion associated with listeriosis may therefore be underdiagnosed. In support of this hypothesis, in a recent study examining 43 patients with spontaneous abortions, two vaginal swabs were positive for *Lm* by PCR test, of which one was negative for *Lm* by culture on agar plates (Fall et al., 2020). In addition to underdiagnosis of non-culturable *Lm*, reactivation of these dormant bacteria after a silent phase should also be considered. Data from the 1960s suggested that *Lm* present in the reproductive tract could reactivate during pregnancy and cause early fetal loss (Rappaport et al., 1960; Dungal, 1961; Gray et al., 1963; Gray and Killinger, 1966). Experimental work in a laboratory model of feto-placental listeriosis in rabbits supported this hypothesis. After inoculation with *Lm*, some rabbits showed spontaneous abortions with isolation of the bacterium, and after a novel gestation without further inoculation of the pathogen, could show reproductive failure during the following months (Gray et al., 1955). These observations opened the hypothesis that *Lm* could persist in the reproductive tract for a relatively long period of time without signs of disease, and trigger infection in subsequent pregnancies. This has however not been investigated further. As mentioned previously, recent data suggest that VBNC *Lm* might be present in the fetoplacental unit in a listeriosis model in macaques (Wolfe et al., 2019). It seems important to reconsider the notion of persistence of unculturable *Lm* in the female genital tract and subsequently in recurrent pregnancy losses (RPL). RPL is defined as three or more consecutive pregnancy losses before 20 weeks' gestation. Its etiology is often unclear and may be multifactorial (Pandey et al., 2005). A role for latent listeriosis in this condition has been suggested (Rappaport et al., 1960; Dungal, 1961; Romana et al., 1989), but more research is needed to validate or refute this hypothesis.

Outside of pregnancy cases, *Lm* is so far not described as a pathogen causing subclinical silent infections, but we cannot exclude that this bacterium hides in the organism for long periods of time, especially in a VBNC state within an intracellular vacuole (Bierne et al., 2018), as has been described for Mtb. High-risk factors for sporadic non-perinatal listeriosis are primarily immunosuppressive diseases (Friesema et al., 2015; Charlier et al., 2017). The awakening of dormant intracellular *Lm*, long after ingestion of contaminated food, should be investigated as a potential cause of sporadic listeriosis cases. The existence of a dormant subpopulation of *Lm* could also be implicated in cases of recurrent listeriosis (McLauchlin et al., 1991; Sauders et al., 2001). For example, in a cancer immunotherapy approach using an attenuated *Lm* strain as a vaccine vector, the inoculated strain led to bacteremia 31 months after the initial injection, despite the administration of antibiotic therapy in the patient (Fares et al., 2018).This strain was never detected in the patient's medical follow-up, as the blood culture remained negative. This phenomenon remains unexplained, but the investigators point to the fact that the patient had prostheses that may favor the formation of a *Lm* biofilm. While *Lm* is rarely implicated in prosthetic joint infections, there are now increasing reports of cases, particularly in immunocompromised individuals (Charlier et al., 2012) and chronic infections with *Lm* linked to these prostheses have been reported (Kleemann et al., 2009; Muchaamba et al., 2020; Hutchins et al., 2021). It is possible that the molecular mechanisms of fracture repair cause a momentary suppression of local immunity, while the development of a biofilm on the joint offers *Lm* protection from antibiotic treatment (Fares et al., 2018). In addition, the settlement of *Lm* in the VBNC state, either in an extracellular biofilm or within intracellular vacuoles, could contribute to this asymptomatic persistence and evasion of antibiotic therapy. These hypotheses, as well as the mechanism leading to the re-emergence of the persistent strain after such a long period of asymptomatic carriage, remain to be explored.

CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PERSPECTIVE

The spread of human infectious diseases emerging from animal reservoirs, such as avian influenza caused by the H5N1 virus and Covid-19 caused by the SARS-CoV-2 virus, have brought to the forefront the fact that zoonotic diseases represent a major public health risk. It has also become clear that the asymptomatic carriage plays a key role in the transmission of these dangerous pathogens. Because of its ubiquity in the environment, animals, and humans, which are the three pillars of the One Health *continuum*, as well as in the agri-food industry that connects them (**Figure 2**), *Lm* represents an exceptional bacterial model to address these issues, including the mechanism of circulation of this pathogen in a chain of contamination involving different ecosystems. In addition to vegetative culturable *Lm* cells, dormant VBNC *Lm* need further investigation, as entry and exit from the VBNC state is likely one of the key mechanisms for *Lm* adaptation to stress in these different ecological niches, as are spores for spore-forming bacterial species. Since VBNC *Lm* forms are ubiquitous in the One Health *continuum* (**Figure 2**), their non-detection by conventional

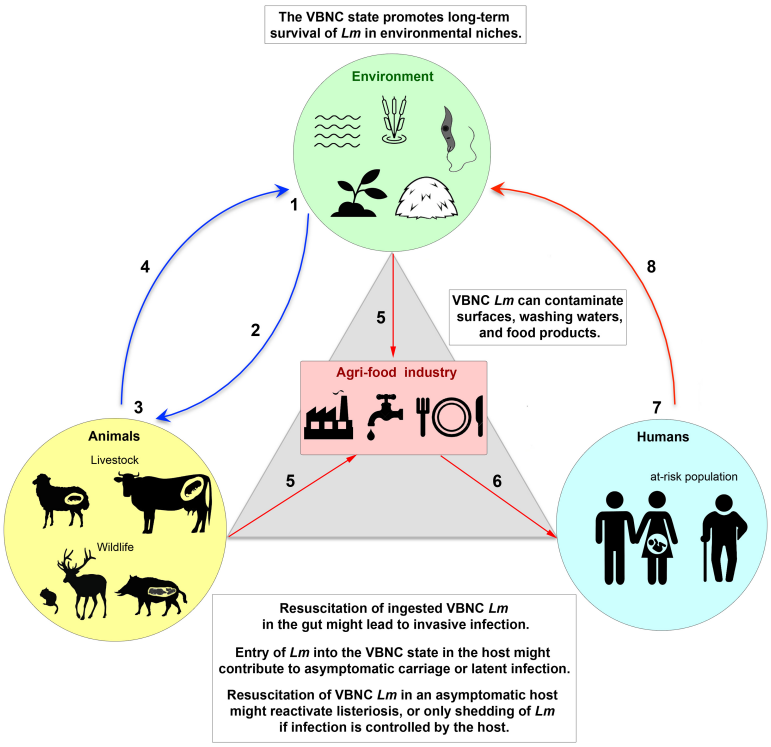


FIGURE 2 | The VBNC state of *L. monocytogenes* in the One Health *continuum*. (1) *Lm* is present in a wide range of environmental ecosystems (e.g., sea, rivers, lakes, soil, plants, fodder, and possibly within unicellular eukaryotes), either in a vegetative culturable state (VC) or in a viable but non-culturable (VBNC) dormant state that allows long-term survival under hostile conditions. (2) VC and VBNC bacteria are ingested by animals, in particular farmed and wild mammals, *via* food or water. (3) VBNC forms could be reactivated into VC forms in the gut by a resuscitation process. Active VC forms can lead to invasive infection or enter a steady state with the host, resulting in long-term asymptomatic carriage. Entry of bacteria into the VBNC state could contribute to this asymptomatic carriage, by promoting silent colonization of the gastrointestinal tract (gut-liver axis) or the female reproductive system. Resuscitation of dormant VBNC *Lm* in an asymptomatic host would reactivate a latent infection, leading to listeriosis or, if the infection is controlled by the host, to shedding of *Lm* into the environment. (4) Excretion of *Lm* from animals, in feces, abortive products or cadavers, releases the pathogen into the environment, initiating a new cycle. (5) During processing of animal or plant products, *Lm* can contaminate food industry production lines. Antimicrobial treatments and/or biofilm formation favor the appearance of VBNC bacteria and their persistence on surfaces, process wash waters, or in food matrices. VBNC *Lm* can thus contaminate raw or ready-to-eat foods. (6) Humans become infected by eating foods contaminated with VC or VBNC *Lm*. (7) As in animals, resuscitation of VBNC *Lm* in the gut might cause invasive listeriosis, mainly in at-risk populations (pregnant women, the elderly or immunocompromised persons). The VC *Lm* forms might also switch to the VBNC state in tissues, resulting in asymptomatic colonization of healthy carriers or a latent infection phase in at-risk individuals. (8) Human shedding of *Lm* releases the pathogen into the environment.

analytical methods poses a threat to public health and food safety. In the future, the implementation of a One Health approach to assess the impact of VBNC *Lm* in infection should be based on: (*i*) a more systematic sampling process in interconnected systems, which are animal and plant production systems (farms and their immediate environment), food production systems (food processing/packaging sites and food stores), and medical and hospital systems (samples from symptomatic listeriosis patients and at-risk asymptomatic individuals), (*ii*) the use of diagnostic methods without growth-based enrichment steps, to detect the presence of unculturable *Lm*, and (*iii*) whole-genome sequencing of isolated strains and comparative genomics, in order to determine which strains are most likely to enter the VBNC state, their ability to circulate, and in which ecosystem.

In the context of the food industry, safety standards concerning *Lm* contamination are all based on the growth capacity of this pathogen *via* the determination of CFU, both in the United States, with a zero-tolerance policy, and in Europe, with slightly less strict criteria for certain categories of RTE foods considered low risk (EC Regulation 2073/2005). These standards do not take into account the potential risk related to the presence of VBNC forms. As eradication of VBNC bacteria is difficult, their presence should be taken into account in risk assessment modeling and health regulation issues. In the context of VBNC bacteria in the host, many questions arise. For example, what are the physiological similarities and differences between bacteria in the VBNC state in an environmental niche and in a host? Are there strain-specific variations, with hypervirulent clones also

more prone to silently persist as VBNC forms in the host, compared to hypovirulent clones? Do VBNC *Lm* survive asymptomatically in a host while being silently excreted through fecal or uterine discharges until the host dies, or can they reactivate in the same individual when the immune system is weakened, which would be consistent with latent listeriosis (**Figure 2**)? What would be the mechanisms of immune tolerance by the host of these VBNC bacterial parasites? What are the reservoir tissues (*e.g.*, intestine, liver, gallbladder, endometrium)? What are the reservoir hosts (including protozoa)? Answering these questions will require clinically relevant animal models and overcoming the problem of obtaining tissue samples from asymptomatic hosts. Additionally, in medicine, as in the agri-food industry, several challenges remain to be addressed, first of all, the development of sensitive, easy-to-use and inexpensive techniques to facilitate large-scale detection and tracing of VBNC *Lm*. Detection techniques based on PCR, DNA sequencing, or mass spectrometry, are improving and their development is crucial, as is the development of techniques demonstrating the viability of these non-culturable microorganisms. Second, it is necessary to identify the factors affecting the recovery and regrowth of VBNC cells. Finally, the pathogenic potential of VBNC forms must be properly assessed.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AL, HB: Writing–original draft preparation. AL, EM, HB: Writing–review and editing. AL, EM: Table preparation. HB: Figure preparation. EM, HB: Funding acquisition. HB: Supervision and Conceptualization. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by grants from ANR PERMALI (N°ANR-20-CE35-0001-01) and iXcore Foundation (2015) to HB, and INRAE-MICA division (AAP 2019-2020) to EM.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Lilliana Radoshevich (University of Iowa) for critical reading and corrections of this manuscript. We would also like to thank Lise Chaumont, Filipe Carvalho, Alessandro Pagliuso, and Mounia Kortebi, for helpful discussions. We would like to thank the INRAE-MICA division, the iXcore Research Foundation, ANR and Université Paris Saclay for financial support.

REFERENCES

Afari, G. K., and Hung, Y. C. (2018). Detection and Verification of the Viable But Nonculturable (VBNC) State of Escherichia Coli O157:H7 and Listeria Monocytogenes Using Flow Cytometry and Standard Plating. *J. Food Sci.* 83, 1913–1920. doi: 10.1111/1750-3841.14203

Angelo, K. M., Jackson, K. A., Wong, K. K., Hoekstra, R. M., and Jackson, B. R. (2016). Assessment of the Incubation Period for Invasive Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1487–1489. doi: 10.1093/cid/ciw569

Arvaniti, M., Tsakanikas, P., Papadopoulou, V., Giannakopoulou, A., and Skandamis, P. (2021). Listeria Monocytogenes Sublethal Injury and Viable-But-Nonculturable State Induced by Acidic Conditions and Disinfectants. *Microbiol. Spectr.* 9, e0137721. doi: 10.1128/Spectrum.01377-21

Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R., and Oliver, J. D. (2015). Viable But Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infect. Immun.* 83, 4194–4203. doi: 10.1128/IAI.00404-15

Ayrapetyan, M., Williams, T., and Oliver, J. D. (2018). Relationship Between the Viable But Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *J. Bacteriol.* 200, 1–15. doi: 10.1128/JB.00249-18

Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., et al. (2006). Campylobacter Jejuni Loss of Culturability in Aqueous Microcosms and Ability to Resuscitate in a Mouse Model. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 83–91. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.015

Bagatella, S., Tavares-Gomes, L., and Oevermann, A. (2021). Listeria Monocytogenes at the Interface Between Ruminants and Humans: A Comparative Pathology and Pathogenesis Review. *Vet. Pathol.*, 3009858211052659. doi: 10.1177/03009858211052659

Bernardo, R., Duarte, A., Tavares, L., Barreto, A. S., and Henriques, A. R. (2021). Listeria Monocytogenes Assessment in a Ready-To-Eat Salad Shelf-Life Study Using Conventional Culture-Based Methods, Genetic Profiling, and Propidium Monoazide Quantitative PCR. *Foods* 10 (235), 1–14. doi: 10.3390/foods10020235

Besnard, V., Federighi, M., and Cappelier, J. M. (2000). Development of a Direct Viable Count Procedure for the Investigation of VBNC State in Listeria Monocytogenes. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 77–81. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00771.x

Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F., and Cappelier, J. M. (2002). Environmental and Physico-Chemical Factors Induce VBNC State in Listeria Monocytogenes. *Vet. Res.* 33, 359–370. doi: 10.1051/vetres:2002022

Bierne, H., Milohanic, E., and Kortebi, M. (2018). To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double Life of Listeria Monocytogenes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 136. doi: 10.3389/fcimb.2018.00136

Brauge, T., Faille, C., Leleu, G., Denis, C., Hanin, A., and Midelet, G. (2020). Treatment With Disinfectants may Induce an Increase in Viable But Non Culturable Populations of Listeria Monocytogenes in Biofilms Formed in Smoked Salmon Processing Environments. *Food Microbiol.* 92, 103548. doi: 10.1016/j.fm.2020.103548

Brauge, T., Faille, C., Sadovskaya, I., Charbit, A., Benezech, T., Shen, Y., et al. (2018). The Absence of N-Acetylglucosamine in Wall Teichoic Acids of Listeria Monocytogenes Modifies Biofilm Architecture and Tolerance to Rinsing and Cleaning Procedures. *PloS One* 13, e0190879. doi: 10.1371/journal.pone.0190879

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. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.853533.x

Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naitali, M., and Briandet, R. (2015). Biofilm-Associated Persistence of Food-Borne Pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.015

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., and Whiting, R. C. (2017). A Review of Listeria Monocytogenes: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-Response, Ecology, and Risk Assessments. *Food Control* 75, 1–13. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016

Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S., Garrec, N., Zundel, E., Velge, P., et al. (2005). Avirulence of Viable But Non-Culturable Listeria Monocytogenes Cells Demonstrated by *In Vitro* and *In Vivo* Models. *Vet. Res.* 36, 589–599. doi: 10.1051/vetres:2005018

Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S. M., Velge, P., and Federighi, M. (2007). Avirulent Viable But Non Culturable Cells of Listeria Monocytogenes Need the Presence of an Embryo to Be Recovered in Egg Yolk and Regain Virulence After Recovery. *Vet. Res.* 38, 573–583. doi: 10.1051/vetres:2007017

Chae, M., and Schraft, H. (2001). Cell Viability of Listeria Monocytogenes Biofilms. *Food Microbiol.* 18, 103–112. doi: 10.1006/fmic.2000.0374

Charlier, C., Disson, O., and Lecuit, M. (2020). Maternal-Neonatal Listeriosis. *Virulence* 11, 391–397. doi: 10.1080/21505594.2020.1759287

Charlier, C., Leclercq, A., Cazenave, B., Desplaces, N., Travier, L., Cantinelli, T., et al. (2012). Listeria Monocytogenes-Associated Joint and Bone Infections: A Study of 43 Consecutive Cases. *Clin. Infect. Dis.* 54, 240–248. doi: 10.1093/cid/cir803

Charlier, C., Perrodeau, E., Leclercq, A., Cazenave, B., Pilmis, B., Henry, B., et al. (2017). Clinical Features and Prognostic Factors of Listeriosis: The MONALISA National Prospective Cohort Study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 510–519. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7

Chiara, M., Giulia, T., Federica, B., Diego, M., Robin, D., Fausto, G., et al. (2021). Listeria Monocytogenes Sensitivity to Antimicrobial Treatments Depends on Cell Origin. *Sci. Rep.* 11, 21263. doi: 10.1038/s41598-021-00767-9

Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C.Jr., and Wekell, M. M. (1990). Listeria Species in a California Coast Estuarine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2007–2011. doi: 10.1128/aem.56.7.2007-2011.1990

Cunningham, E., O'byrne, C., and Oliver, J. D. (2009). Effect of Weak Acids on Listeria Monocytogenes Survival: Evidence for a Viable But Nonculturable State in Response to Low pH. *Food Control* 20, 1141–1144. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.03.005

De Goffau, M. C., Lager, S., Sovio, U., Gaccioli, F., Cook, E., Peacock, S. J., et al. (2019). Human Placenta Has No Microbiome But Can Contain Potential Pathogens. *Nature* 572, 329–334. doi: 10.1038/s41586-019-1451-5

De Medeiros Barbosa, I., Tayse Da Cruz Almeida, E., Alves Gomes, A. C., and Leite De Souza, E. (2020). Evidence on the Induction of Viable But Non-Culturable State in Listeria Monocytogenes by Origanum Vulgare L. And Rosmarinus Officinalis L. Essential Oils in a Meat-Based Broth. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 62, 1–10. doi: 10.1016/j.ifset.2020.102351

Descoeudres, N., Jouneau, L., Henry, C., Gorrichon, K., Derré-Bobillot, A., Serror, P., et al. (2021). An Immunomodulatory Transcriptional Signature Associated With Persistent Listeria Infection in Hepatocytes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 761945. doi: 10.3389/fcimb.2021.761945

Desneux, J., Biscuit, A., Picard, S., and Pourcher, A. M. (2016). Fate of Viable But Non-Culturable Listeria Monocytogenes in Pig Manure Microcosms. *Front. Microbiol.* 7, 245. doi: 10.3389/fmicb.2016.00245

Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., et al. (2020). Induction, Detection, Formation, and Resuscitation of Viable But Non-Culturable State Microorganisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 149–183. doi: 10.1111/1541-4337.12513

Dorey, A., Marinho, C., Piveteau, P., and O'byrne, C. (2019). Role and Regulation of the Stress Activated Sigma Factor Sigma B (Sigma(B)) in the Saprophytic and Host-Associated Life Stages of Listeria Monocytogenes. *Adv. Appl. Microbiol.* 106, 1–48. doi: 10.1016/bs.aambs.2018.11.001

Dreux, N., Albagnac, C., Federighi, M., Carlin, F., Morris, C. E., and Nguyen-The, C. (2007). Viable But Non-Culturable Listeria Monocytogenes on Parsley Leaves and Absence of Recovery to a Culturable State. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1272–1281. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03351.x

Dungal, N. (1961). Listeriosis in Four Siblings. *Lancet* 2, 513–516. doi: 10.1016/S0140-6736(61)92955-5

Dutta, N. K., and Karakousis, P. C. (2014). Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 343–371. doi: 10.1128/MMBR.00010-14

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19, e06406. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406

Fall, N. S., Sarr, M., Diagne, N., Bassene, H., Sokhna, C., Lagier, J. C., et al. (2020). Listeria Monocytogenes Detected in Vaginal Self-Samples of 2 Women After Spontaneous Miscarriage, Senegal, West Africa. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 393–394. doi: 10.1007/s10096-019-03739-0

Fares, E., Mccloskey, C. B., Gutierrez, A., Princiotta, M., Salinas, L. J., and Drevets, D. A. (2018). Vaccine Strain Listeria Monocytogenes Bacteremia Occurring 31 Months After Immunization. *Infection.* 47, 489–492. doi: 10.1007/s15010-018-1249-7

Fleischmann, S., Robben, C., Alter, T., Rossmanith, P., and Mester, P. (2021). How to Evaluate Non-Growing Cells-Current Strategies for Determining Antimicrobial Resistance of VBNC Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 10 (115), 1–24. doi: 10.3390/antibiotics10020115

Fredriksson-Ahomaa, M., London, L., Skrzypczak, T., Kantala, T., Laamanen, I., Bistrom, M., et al. (2020). Foodborne Zoonoses Common in Hunted Wild Boars. *Ecohealth* 17, 512–522. doi: 10.1007/s10393-020-01509-5

Friesema, I. H., Kuiling, S., van der Ende, A., Heck, M. E., Spanjaard, L., and Van Pelt, W. (2015). Risk Factors for Sporadic Listeriosis in the Netherlands 2008 to 2013. *Eurosurveillance* 20, 15–19. doi: 10.2807/1560-7917.ES2015.20.31.21199

Gahan, C. G., and Hill, C. (2014). Listeria Monocytogenes: Survival and Adaptation in the Gastrointestinal Tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 9. doi: 10.3389/fcimb.2014.00009

Gample, S. P., Agrawal, S., and Sarkar, D. (2019). Evidence of Nitrite Acting as a Stable and Robust Inducer of Non-Cultivability in Mycobacterium Tuberculosis With Physiological Relevance. *Sci. Rep.* 9, 9261. doi: 10.1038/s41598-019-45652-8

Gao, H., and Liu, C. (2014). Biochemical and Morphological Alteration of Listeria Monocytogenes Under Environmental Stress Caused by Chloramine-T and Sodium Hypochlorite. *Food Control* 46, 455–461. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.016

Gengenbacher, M., and Kaufmann, S. H. (2012). Mycobacterium Tuberculosis: Success Through Dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 514–532. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x

Giao, M. S., and Keevil, C. W. (2014). Listeria Monocytogenes Can Form Biofilms in Tap Water and Enter Into the Viable But Non-Cultivable State. *Microb. Ecol.* 67, 603–611. doi: 10.1007/s00248-013-0364-3

Giovannini, A., Cancellotti, F. M., Turilli, C., and Randi, E. (1988). Serological Investigations for Some Bacterial and Viral Pathogens in Fallow Deer (Cervus Dama) and Wild Boar (Sus Scrofa) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *J. Wildl. Dis.* 24, 127–132. doi: 10.7589/0090-3558-24.1.127

Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C., and Helaine, S. (2019). Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 359–385. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115650

Goncalves, F. D., and De Carvalho, C. C. (2016). Phenotypic Modifications in Staphylococcus Aureus Cells Exposed to High Concentrations of Vancomycin and Teicoplanin. *Front. Microbiol.* 7, 13. doi: 10.3389/fmicb.2016.00013

Goulet, V., King, L. A., Vaillant, V., and De Valk, H. (2013). What Is the Incubation Period for Listeriosis? *BMC Infect. Dis.* 13, 11. doi: 10.1186/1471-2334-13-11

Gray, M. L., and Killinger, A. H. (1966). Listeria Monocytogenes and Listeric Infections. *Bacteriol. Rev.* 30, 309–382. doi: 10.1128/br.30.2.309-382.1966

Gray, M. L., Seeliger, H. P. R., and Potel, J. (1963). Perinatal Infections Due to Listeria Monocytogenes. Do These Affect Subsequent Pregancies ? *Clin. Pediatr.* 2, 614–623.

Gray, M. L., Singh, C., and Thorp, F. Jr. (1955). Abortion, Stillbirth, Early Death of Young in Rabbits by Listeria Monocytogenes. I. Ocular Instillation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89, 163–169. doi: 10.3181/00379727-89-21746

Gray, M. L., Stafseth, H. J., Thorp, F., Sholl, L. B., and Riley, W. F. (1948). A New Technique for Isolating Listerellae From the Bovine Brain. *J. Bacteriol.* 55, 471–476. doi: 10.1128/jb.55.4.471-476.1948

Grif, K., Hein, I., Wagner, M., Brandl, E., Mpamugo, O., Mclauchlin, J., et al. (2001). Prevalence and Characterization of Listeria Monocytogenes in the Feces of Healthy Austrians. *Wien. Klin. Wochenschr.* 113, 737–742.

Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M. P., and Allerberger, F. (2003). Incidence of Fecal Carriage of Listeria Monocytogenes in Three Healthy Volunteers: A One-Year Prospective Stool Survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 16–20. doi: 10.1007/s10096-002-0835-9

Gu, G., Bolten, S., Mowery, J., Luo, Y., Gulbronson, C., and Nou, X. (2020). Susceptibility of Foodborne Pathogens to Sanitizers in Produce Rinse Water and Potential Induction of Viable But Non-Culturable State. *Food Control* 112, 107138. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107138

Hafner, L., Pichon, M., Burucoa, C., Nusser, S. H. A., Moura, A., Garcia-Garcera, M., et al. (2021). Listeria Monocytogenes Faecal Carriage Is Common and Depends on the Gut Microbiota. *Nat. Commun.* 12, 6826. doi: 10.1038/s41467-021-27069-y

Highmore, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A., and Keevil, C. W. (2018). Viable-But-Nonculturable Listeria Monocytogenes and Salmonella Enterica Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio* 9, 1–12. doi: 10.1128/mBio.00540-18

Hurtado, A., Ocejo, M., and Oporto, B. (2017). Salmonella Spp. And Listeria Monocytogenes Shedding in Domestic Ruminants and Characterization of Potentially Pathogenic Strains. *Vet. Microbiol.* 210, 71–76. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.003

Hutchins, C., Sayavedra, L., Diaz, M., Gupta, P., Tissingh, E., Elumogo, C., et al. (2021). Genomic Analysis of a Rare Recurrent Listeria Monocytogenes

Prosthetic Joint Infection Indicates a Protected Niche Within Biofilm on Prosthetic Materials. *Sci. Rep.* 11, 21864. doi: 10.1038/s41598-021-01376-2

Hydeskov, H. B., Amar, C. F. L., Fernandez, J. R., John, S. K., Macgregor, S. K., Cunningham, A. A., et al. (2019). Listeria Monocytogenes Infection of Free-Living Western European Hedgehogs (Erinaceus Europaeus). *J. Zoo Wildl. Med.* 50, 183–189. doi: 10.1638/2018-0093

Iida, T., Kanzaki, M., Nakama, A., Kokubo, Y., Maruyama, T., and Kaneuchi, C. (1998). Detection of Listeria Monocytogenes in Humans, Animals and Foods. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 1341–1343. doi: 10.1292/jvms.60.1341

Inoue, S., Iida, T., Tanikawa, T., Maruyama, T., and Morita, C. (1991). Isolation of Listeria Monocytogenes From Roof Rats (Rattus Rattus) in Buildings in Tokyo. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 521–522. doi: 10.1292/jvms.53.521

Kaprelyants, A. S., Gottschal, J. C., and Kell, D. B. (1993). Dormancy in Non-Sporulating Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 10, 271–285. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05871.x

Kaprelyants, A. S., Mukamolova, G. V., and Kell, D. B. (1994). Estimation of Dormant Micrococcus Luteus Cells by Penicillin Lysis and by Resuscitation in Cell-Free Spent Culture Medium at High Dilution. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 347–352. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06662.x

Kaptchouang Tchatchouang, C. D., Fri, J., De Santi, M., Brandi, G., Schiavano, G. F., Amagliani, G., et al. (2020). Listeriosis Outbreak in South Africa: A Comparative Analysis With Previously Reported Cases Worldwide. *Microorganisms* 8 (135), 1–18. doi: 10.3390/microorganisms8010135

Kleemann, P., Domann, E., Chakraborty, T., Bernstein, I., and Lohoff, M. (2009). Chronic Prosthetic Joint Infection Caused by Listeria Monocytogenes. *J. Med. Microbiol.* 58, 138–141. doi: 10.1099/jmm.0.004234-0

Klein, M., Brown, L., Ashbolt, N. J., Stuetz, R. M., and Roser, D. J. (2011). Inactivation of Indicators and Pathogens in Cattle Feedlot Manures and Compost as Determined by Molecular and Culture Assays. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 200–210. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01098.x

Knudsen, G. M., Ng, Y., and Gram, L. (2013). Survival of Bactericidal Antibiotic Treatment by a Persister Subpopulation of Listeria Monocytogenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7390–7397. doi: 10.1128/AEM.02184-13

Kortebi, M., Milohanic, E., Mitchell, G., Pechoux, C., Prevost, M. C., Cossart, P., et al. (2017). Listeria Monocytogenes Switches From Dissemination to Persistence by Adopting a Vacuolar Lifestyle in Epithelial Cells. *PloS Pathog.* 13, e1006734. doi: 10.1371/journal.ppat.1006734

Kramer, B., and Muranyi, P. (2014). Effect of Pulsed Light on Structural and Physiological Properties of Listeria Innocua and Escherichia Coli. *J. Appl. Microbiol.* 116, 596–611. doi: 10.1111/jam.12394

Kumar, S. S., and Ghosh, A. R. (2019). Assessment of Bacterial Viability: A Comprehensive Review on Recent Advances and Challenges. *Microbiology*. 13, 706–721. doi: 10.1099/mic.0.000786

Lamont, R. J., and Postlethwaite, R. (1986). Carriage of Listeria Monocytogenes and Related Species in Pregnant and Non-Pregnant Women in Aberdeen, Scotland. *J. Infect.* 13, 187–193. doi: 10.1016/S0163-4453(86)93121-X

Leclercq, A., Oevermann, A., Danguy-Des-DeíSerts, R., Granier, S., Hammack, T., Jinneman, K., et al. (2014). "Listeria Monocytogenes," in *OIE Terrestrial Manual* (Paris: World Organization for Animal Health (Oie)).

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., and Faucher, S. P. (2014). The Importance of the Viable But Non-Culturable State in Human Bacterial Pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258

Lindback, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M., and Rorvik, L. M. (2010). The Ability to Enter Into an Avirulent Viable But Non-Culturable (VBNC) Form Is Widespread Among Listeria Monocytogenes Isolates From Salmon, Patients and Environment. *Vet. Res.* 41, 8. doi: 10.1051/vetres/2009056

López-Gálvez, F., Tudela, J. A., Allende, A., and Gil, M. I. (2019). Microbial and Chemical Characterization of Commercial Washing Lines of Fresh Produce Highlights the Need for Process Water Control. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 51, 211–219. doi: 10.1016/j.ifset.2018.05.002

Low, J. C., and Donachie, W. (1997). A Review of Listeria Monocytogenes and Listeriosis. *Vet. J.* 153, 9–29. doi: 10.1016/S1090-0233(97)80005-6

Lyautey, E., Hartmann, A., Pagotto, F., Tyler, K., Lapen, D. R., Wilkes, G., et al. (2007). Characteristics and Frequency of Detection of Fecal Listeria Monocytogenes Shed by Livestock, Wildlife, and Humans. *Can. J. Microbiol.* 53, 1158–1167. doi: 10.1139/W07-084

Macgowan, A. P., Marshall, R. J., Mackay, I. M., and Reeves, D. S. (1991). Listeria Faecal Carriage by Renal Transplant Recipients, Haemodialysis Patients and Patients in General Practice: Its Relation to Season, Drug Therapy, Foreign Travel, Animal Exposure and Diet. *Epidemiol. Infect.* 106, 157–166. doi: 10.1017/S0950268800056521

Mascola, L., Sorvillo, F., Goulet, V., Hall, B., Weaver, R., and Linnan, M. (1992). Fecal Carriage of Listeria Monocytogenes–Observations During a Community-Wide, Common-Source Outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 15, 557–558. doi: 10.1093/clind/15.3.557

Matereke, L. T., and Okoh, A. I. (2020). Listeria Monocytogenes Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review. *Pathogens* 9 (528), 1–12. doi: 10.3390/pathogens9070528

Maynaud, G., Pourcher, A. M., Ziebal, C., Cuny, A., Druilhe, C., Steyer, J. P., et al. (2016). Persistence and Potential Viable But Non-Culturable State of Pathogenic Bacteria During Storage of Digestates From Agricultural Biogas Plants. *Front. Microbiol.* 7, 1469. doi: 10.3389/fmicb.2016.01469

Mclauchlin, J., Aird, H., Amar, C., Barker, C., Dallman, T., Lai, S., et al. (2021). An Outbreak of Human Listeriosis Associated With Frozen Sweet Corn Consumption: Investigations in the UK. *Int. J. Food Microbiol.* 338, 108994. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108994

Mclauchlin, J., Audurier, A., and Taylor, A. G. (1991). Treatment Failure and Recurrent Human Listeriosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 27, 851–857. doi: 10.1093/jac/27.6.851

Mitchell, G., Brouillette, E., Seguin, D. L., Asselin, A. E., Jacob, C. L., and Malouin, F. (2010). A Role for Sigma Factor B in the Emergence of Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants and Elevated Biofilm Production Resulting From an Exposure to Aminoglycosides. *Microb. Pathog.* 48, 18–27. doi: 10.1016/j.micpath.2009.10.003

Moreno, Y., Sánchez-Contreras, J., Montes, R. M., García-Hernández, J., Ballesteros, L., and Ferrús, M. A. (2012). Detection and Enumeration of Viable Listeria Monocytogenes Cells From Ready-to-Eat and Processed Vegetable Foods by Culture and DVC-FISH. *Food Control* 27, 374–379. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.04.017

Muchaamba, F., Eshwar, A. K., Von Ah, U., Stevens, M. J. A., and Tasara, T. (2020). Evolution of Listeria Monocytogenes During a Persistent Human Prosthetic Hip Joint Infection. *Front. Microbiol.* 11, 1726. doi: 10.3389/fmicb.2020.01726

Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Young, D. I., Young, M., and Kell, D. B. (1998). A Bacterial Cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8916–8921. doi: 10.1073/pnas.95.15.8916

Mukamolova, G. V., Murzin, A. G., Salina, E. G., Demina, G. R., Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., et al. (2006). Muralytic Activity of Micrococcus Luteus Rpf and Its Relationship to Physiological Activity in Promoting Bacterial Growth and Resuscitation. *Mol. Microbiol.* 59, 84–98. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04930.x

Mukamolova, G. V., Turapov, O. A., Young, D. I., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., and Young, M. (2002). A Family of Autocrine Growth Factors in Mycobacterium Tuberculosis. *Mol. Microbiol.* 46, 623–635. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03184.x

Muller, H. E. (1990). Listeria Isolations From Feces of Patients With Diarrhea and From Healthy Food Handlers. *Infection* 18, 97–99. doi: 10.1007/BF01641423

Nikitushkin, V. D., Demina, G. R., Shleeva, M. O., and Kaprelyants, A. S. (2013). Peptidoglycan Fragments Stimulate Resuscitation of "Non-Culturable" Mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, 37–46. doi: 10.1007/s10482-012-9784-1

Noll, M., Trunzer, K., Vondran, A., Vincze, S., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., et al. (2020). Benzalkonium Chloride Induces a VBNC State in Listeria Monocytogenes. *Microorganisms* 8 (184), 1–10. doi: 10.3390/microorganisms8020184

Oevermann, A., Di Palma, S., Doherr, M. G., Abril, C., Zurbriggen, A., and Vandevelde, M. (2010). Neuropathogenesis of Naturally Occurring Encephalitis Caused by Listeria Monocytogenes in Ruminants. *Brain Pathol.* 20, 378–390. doi: 10.1111/j.1750-3639.2009.00292.x

Oliver, J. D. (2010). Recent Findings on the Viable But Nonculturable State in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 415–425. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x

Olszewska, M. A., Panfil-Kuncewicz, H., and Łaniewska-Trokenheim, L. (2015). Detection of Viable But Nonculturable Cells of Listeria Monocytogenes With the Use of Direct Epifluorescent Filter Technique. *J. Food Saf.* 35, 86–90. doi: 10.1111/jfs.12130

Overney, A., Chassaing, D., Carpentier, B., Guillier, L., and Firmesse, O. (2016). Development of Synthetic Media Mimicking Food Soils to Study the Behaviour of Listeria Monocytogenes on Stainless Steel Surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 7–14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.034

Overney, A., Jacques-Andre-Coquin, J., Ng, P., Carpentier, B., Guillier, L., and Firmesse, O. (2017). Impact of Environmental Factors on the Culturability and Viability of Listeria Monocytogenes Under Conditions Encountered in Food Processing Plants. *Int. J. Food Microbiol.* 244, 74–81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.012

Palacios-Gorba, C., Moura, A., Leclercq, A., Gomez-Martin, A., Gomis, J., Jimenez-Trigos, E., et al. (2021). Listeria Spp. Isolated From Tonsils of Wild Deer and Boars: Genomic Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 87 (6), 1–9. doi: 10.1128/AEM.02651-20.

Pandey, M. K., Rani, R., and Agrawal, S. (2005). An Update in Recurrent Spontaneous Abortion. *Arch. Gynecol. Obstet.* 272, 95–108. doi: 10.1007/s00404-004-0706-y

Pang, M., Xie, X., Bao, H., Sun, L., He, T., Zhao, H., et al. (2018). Insights Into the Bovine Milk Microbiota in Dairy Farms With Different Incidence Rates of Subclinical Mastitis. *Front. Microbiol.* 9, 2379. doi: 10.3389/fmicb.2018.02379

Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Asakura, H., and Makino, S. I. (2006). Resuscitation of the Viable But Non-Culturable State of Salmonella Enterica Serovar Oranienburg by Recombinant Resuscitation-Promoting Factor Derived From Salmonella Typhimurium Strain LT2. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 241–247. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.022

Parsons, C., Niedermeyer, J., Gould, N., Brown, P., Strules, J., Parsons, A. W., et al. (2019). Listeria Monocytogenes at the Human-Wildlife Interface: Black Bears (Ursus Americanus) as Potential Vehicles for Listeria. *Microb. Biotechnol.* 13 (3), 706–721. doi: 10.1111/1751-7915.13509

Peddireddy, V., Doddam, S. N., and Ahmed, N. (2017). Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front. Immunol.* 8, 84. doi: 10.3389/fimmu.2017.00084

Pfeffer, J. M., Strating, H., Weadge, J. T., and Clarke, A. J. (2006). Peptidoglycan O Acetylation and Autolysin Profile of Enterococcus Faecalis in the Viable But Nonculturable State. *J. Bacteriol.* 188, 902–908. doi: 10.1128/JB.188.3.902-908.2006

Pinto, D., Almeida, V., Almeida Santos, M., and Chambel, L. (2011). Resuscitation of Escherichia Coli VBNC Cells Depends on a Variety of Environmental or Chemical Stimuli. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1601–1611. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x

Pinto, D., Santos, M. A., and Chambel, L. (2015). Thirty Years of Viable But Nonculturable State Research: Unsolved Molecular Mechanisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 61–76. doi: 10.3109/1040841X.2013.794127

Pinto, D., Sao-Jose, C., Santos, M. A., and Chambel, L. (2013). Characterization of Two Resuscitation Promoting Factors of Listeria Monocytogenes. *Microbiology* 159, 1390–1401. doi: 10.1099/mic.0.067850-0

Quereda, J. J., Moron-Garcia, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., Garcia-Del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., et al. (2021). Pathogenicity and Virulence of Listeria Monocytogenes: A Trip From Environmental to Medical Microbiology. *Virulence* 12, 2509–2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526

Radoshevich, L., and Cossart, P. (2017). Listeria Monocytogenes: Towards a Complete Picture of Its Physiology and Pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 32–46. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., and Shinoda, S. (2014). Current Perspectives on Viable But Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front. Public Health* 2, 103. doi: 10.3389/fpubh.2014.00103

Rappaport, F., Rabinovitz, M., Toaff, R., and Krochik, N. (1960). Genital Listeriosis as a Cause of Repeated Abortion. *Lancet* 1, 1273–1275. doi: 10.1016/S0140-6736(60)92253-4

Ravagnani, A., Finan, C. L., and Young, M. (2005). A Novel Firmicute Protein Family Related to the Actinobacterial Resuscitation-Promoting Factors by Non-Orthologous Domain Displacement. *BMC Genomics* 6, 39. doi: 10.1186/1471-2164-6-39

Robben, C., Fister, S., Witte, A. K., Schoder, D., Rossmanith, P., and Mester, P. (2018). Induction of the Viable But Non-Culturable State in Bacterial Pathogens by Household Cleaners and Inorganic Salts. *Sci. Rep.* 8, 15132. doi: 10.1038/s41598-018-33595-5

Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Stessl, B., Rossmanith, P., and Mester, P. (2019). A Fast and Easy ATP-Based Approach Enables MIC Testing for Non-Resuscitating VBNC Pathogens. *Front. Microbiol.* 10, 1365. doi: 10.3389/fmicb.2019.01365

Rollins, D. M., and Colwell, R. R. (1986). Viable but Nonculturable Stage of Campylobacter jejuni and Its Role in Survival in the Natural Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 531–538. doi: 10.1128/aem.52.3.531-538.1986

Romana, C., Salleras, L., and Sage, M. (1989). Latent Listeriosis may Cause Habitual Abortion Intrauterine Deaths, Fetal Malformations. When Diagnosed and Treated Adequately Normal Children Will Be Born. *Acta Microbiol. Hung.* 36, 171–172.

Rosser, A., Stover, C., Pareek, M., and Mukamolova, G. V. (2017). Resuscitation-Promoting Factors Are Important Determinants of the Pathophysiology in Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 621–630. doi: 10.1080/1040841X.2017.1283485

Roszak, D. B., Grimes, D. J., and Colwell, R. R. (1984). Viable But Nonrecoverable Stage of Salmonella Enteritidis in Aquatic Systems. *Can. J. Microbiol.* 30, 334–338. doi: 10.1139/m84-049

Rothenburger, J. L., Bennett, K. R., Bryan, L., and Bollinger, T. K. (2015). Septicemic Listeriosis in Wild Hares From Saskatchewan, Canada. *J. Wildl. Dis.* 51, 503–508. doi: 10.7589/2014-06-159

Salina, E. G., Grigorov, A. S., Bychenko, O. S., Skvortsova, Y. V., Mamedov, I. Z., Azhikina, T. L., et al. (2019). Resuscitation of Dormant "Non-Culturable" Mycobacterium Tuberculosis Is Characterized by Immediate Transcriptional Burst. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 272. doi: 10.3389/fcimb.2019.00272

Sauders, B. D., Wiedmann, M., Desjardins, M., Fenlon, C., Davenport, N., Hibbs, J. R., et al. (2001). Recurrent Listeria Monocytogenes Infection: Relapse or Reinfection With a Unique Strain Confirmed by Molecular Subtyping. *Clin. Infect. Dis.* 33, 257–259. doi: 10.1086/321821

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., et al. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States–Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15. doi: 10.3201/eid1701.P11101

Schlech, W. F. (2019). Epidemiology and Clinical Manifestations of Listeria Monocytogenes Infection. *Microbiol. Spectr.* 7, 1–12. doi: 10.1128/9781683670131.ch50

Setlow, P., and Johnson, E. A. (2019). "Spores and Their Significance," in *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, 5th Edn*. Eds. M. P. Doyle, F. Diez-Gonzalez and C. Hill (Washington, DC: ASM Press), 23–64.

Sevellec, Y., Torresi, M., Felix, B., Palma, F., Centorotola, G., Bilei, S., et al. (2020). First Report on the Finding of Listeria Mnocytogenes ST121 Strain in a Dolphin Brain. *Pathogens* 9 (802), 1–13. doi: 10.3390/pathogens9100802

Shleeva, M., Goncharenko, A., Kudykina, Y., Young, D., Young, M., and Kaprelyants, A. (2013). Cyclic AMP-Dependent Resuscitation of Dormant Mycobacteria by Exogenous Free Fatty Acids. *PloS One* 8, e82914. doi: 10.1371/journal.pone.0082914

Signoretto, C., Lleo, M., and Canepari, P. (2002). Modification of the Peptidoglycan of Escherichia Coli in the Viable But Nonculturable State. *Curr. Microbiol.* 44, 125–131. doi: 10.1007/s00284-001-0062-0

Signoretto, C., Lleo, M. M., Tafi, M. C., and Canepari, P. (2000). Cell Wall Chemical Composition of Enterococcus Faecalis in the Viable But Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1953–1959. doi: 10.1128/AEM.66.5.1953-1959.2000

Tasara, T., and Stephan, R. (2006). Cold Stress Tolerance of Listeria Monocytogenes: A Review of Molecular Adaptive Mechanisms and Food Safety Implications. *J. Food Prot.* 69, 1473–1484. doi: 10.4315/0362-028X-69.6.1473

Telkov, M. V., Demina, G. R., Voloshin, S. A., Salina, E. G., Dudik, T. V., Stekhanova, T. N., et al. (2006). Proteins of the Rpf (Resuscitation Promoting Factor) Family Are Peptidoglycan Hydrolases. *Biochemistry (Mosc)* 71, 414–422. doi: 10.1134/S0006297906040092

Truchado, P., Gil, M. I., Larrosa, M., and Allende, A. (2020). Detection and Quantification Methods for Viable But Non-Culturable (VBNC) Cells in Process Wash Water of Fresh-Cut Produce: Industrial Validation. *Front. Microbiol.* 11, 673. doi: 10.3389/fmicb.2020.00673

Truong, H. N., Garmyn, D., Gal, L., Fournier, C., Sevellec, Y., Jeandroz, S., et al. (2021). Plants as a Realized Niche for Listeria Monocytogenes. *Microbiologyopen* 10, e1255. doi: 10.1002/mbo3.1255

Weber, A., Potel, J., Schafer-Schmidt, R., Prell, A., and Datzmann, C. (1995). [Studies on the Occurrence of Listeria Monocytogenes in Fecal Samples of

Domestic and Companion Animals]. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 198, 117–123.

Weindl, L., Frank, E., Ullrich, U., Heurich, M., Kleta, S., Ellerbroek, L., et al. (2016). Listeria Monocytogenes in Different Specimens From Healthy Red Deer and Wild Boars. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 391–397. doi: 10.1089/fpd.2015.2061

Wery, N., Pourcher, A. M., Stan, V., Delgenes, J. P., Picard-Bonnaud, F., and Godon, J. J. (2006). Survival of Listeria Monocytogenes and Enterococcus Faecium in Sludge Evaluated by Real-Time PCR and Culture Methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 131–136. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01946.x

Whitesides, M. D., and Oliver, J. D. (1997). Resuscitation of Vibrio Vulnificus From the Viable But Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1002–1005. doi: 10.1128/aem.63.3.1002-1005.1997

Wideman, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G., and Jarvis, N. A. (2021). Detection and Potential Virulence of Viable But Non-Culturable (VBNC) Listeria Monocytogenes: A Review. *Microorganisms* 9 (194), 1–11. doi: 10.3390/microorganisms9010194

Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Walecka-Zacharska, E., Korkus, J., and Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive Response of Listeria Monocytogenes to the Stress Factors in the Food Processing Environment. *Front. Microbiol.* 12, 710085. doi: 10.3389/fmicb.2021.710085

Wolfe, B., Kerr, A. R., Mejia, A., Simmons, H. A., Czuprynski, C. J., and Golos, T. G. (2019). Sequelae of Fetal Infection in a Non-Human Primate Model of Listeriosis. *Front. Microbiol.* 10, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2019.02021

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., and Colwell, R. R. (1982). Survival and Viability of Nonculturableescherichia Coli Andvibrio Cholerae in the Estuarine and Marine Environment. *Microb. Ecol.* 8, 313–323. doi: 10.1007/BF02010671

Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M., and Hirai, K. (2000). Incidence of Listeria Monocytogenes in Wild Animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 673–675. doi: 10.1292/jvms.62.673

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W., and Ding, T. (2017). Current Perspectives on Viable But Non-Culturable State in Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* 8, 580. doi: 10.3389/fmicb.2017.00580

Zolfaghari, M., Rezaei, M., Mohabbati Mobarez, A., Forozandeh Moghaddam, M., Hosseini, H., and Khezri, M. (2020). Virulence Genes Expression in Viable But Non-Culturable State of Listeria Monocytogenes in Fish Meat. *Food Sci. Technol. Int.* 26, 205–212.x. doi: 10.1177/1082013219877267

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Lotoux, Milohanic and Bierne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANNEXE II

Tableau récapitulatif des exemples de bactéries à niches cytosoliques et vacuolaires avec les déterminants moléculaires impliqués

Bactéries	Mode(s) de vie intracellulaire	Niches et adaptations	Déterminants bactériens impliqués	Hôte	Références
Lm	Cytosolique	Rupture de la vacuole d'entrée *Actin-based motility* (ABM)	LLO, PlcA, PlcB ActA, InlC	Hépatocytes, cellules épithéliales, trophoblastiques, fibroblastes	Cossart, 2011
	Vacuolaire	**(Voir Partie B.3.2)**			
Francisella	Cytosolique	Rupture de la vacuole d'entrée Réplication dans le cytoplasme Dissémination	T6SS (IglI) et GadC IglD, RipA Trogocytose	Macrophage	Barker et al., 2009 ; Ramond et al., 2014 ; Steele et al., 2016
	Vacuolaire (FCV)	Vacuole secondaire Après 20h d'infection Post réplication cytosolique Double membrane LAMP1 positive LC3 positive Dépendante autophagie	MglA, *stringent starvation protein* (SspA), HtpG, CarA, RubA	Macrophage	Checroun et al., 2006 ; Bent et al., 2013 ; Rivera et al., 2020
Mycobacterium	Cytosolique	Activation de la phospholipase de l'hôte A_2	T7SS (ESAT-6) PtpA, SapM	Macrophage Cellules dendritiques	Soldati & Neyrolles, 2012 ; Russel 2013
	Vacuolaire (MtbCV)	Dérive de la vacuole d'internalisation Blocage de la fusion avec les endosomes tardifs pH 7	ManLAM, LAM (exclu V-ATPase de la vacuole) ESX T7SS (SapM, PtpA) PtkA, PknG	Macrophage	Kumar & Valdivia, 2009 ; Augenstreich & Briken, 2020
Salmonella	Cytosolique	Rupture de la vacuole d'entrée	SPI1-T3SS (YdgT, CorA, RecA)	Cellules épithéliales	Wrande et al., 2016 ; Castanheira et al., 2017
	Vacuolaire (SCV)	pH 4-5 LAMP1 positive Cathépsine D négative M6PR négative Lgp positive	T3SS1, TR3SS2 (SpoB)	Cellules épithéliales	Steele-Mortimer et al., 2008
Shigella	Cytosolique	Rupture de la vacuole d'entrée *Actin-based motility* (ABM)	T3SS (IpaB, IpaC, IpgC) IcsA	Cellules épithéliales, macrophages	Patel & Galan, 2005 ; Mellouk & Enninga, 2016 ; Yoshida et al., 2006

Rickettsia	Cytosolique	Rupture de la vacuole d'entrée *Actin-based motility* (ABM)	Hemolysin C PlcA, PlcD RickA	Cellules épithéliales	Rahman et al., 2013 ; Mellouk & Enninga, 2016)
Burkholderia	Cytosolique	Rupture de la vacuole d'entrée *Actin-based motility* (ABM)	T3SS (BsaZ, BsaQ, BsaU, BipD, BopA) BimA	Cellules épithéliales	Stevens et al., 2005 ; Alwood et al., 2011)
Legionella	Vacuolaire (LCV)	Dérive de la vacuole d'internalisation Blocage de la fusion avec les endosomes tardifs Vacuole qui dérive du RE associée avec des protéines polyubiquitinées pH 6-7	Dot/Icm-T4SS (DrrA/SidM, LidA, VipD, LepB, MavE)	Macrophage, amibes	Isberg et al., 2009 ; Hubber & Roy, 2010 ; Vaughn & Kwaik, 2021)
Coxiella	Vacuolaire (CCV)	Dérive de la vacuole d'internalisation Selon les souches : blocage de la fusion avec les endosomes tardifs ou tolérantes aux conditions acides pH 5 LAMP1 positive Cathépsine D positive	T4SS (AnkF, CstK, CvpF, CvpB, NopA)	Macrophage	von Bargen et al., 2012 ; Miller et al., 2019 ; Vaughn & Kwaik, 2021)
Chlamydia	Vacuolaire	Dérive de la vacuole d'internalisation Interactions avec l'hôte pour échapper à l'endocytose Interception du trafic des spingomyéline (SM) des vésicules de l'appareil de Golgi et exploitation de la protéine CERT, et du cholestérol pH 6-7	T3SS (CT229, CT166, CT694, IncD)	Cellules épithéliales	Soldati & Neyrolles, 2012 ; Russel 2013

ANNEXE III

Extraction des ARNs bactériens à partir de cellules infectées

Lyse des cellules:

- Lavage des cellules infectées avec du PBS chaud (10 ml pour les T75 et 25 ml pour les p600).
- Lyse des cellules infectées avec 10 ml pour les T75 et 20 ml pour les p600 d'une solution contenant : 0.1% SDS, 1% phénol acide et 19% éthanol dans de l'eau ➔placer la flasque dans la glace pour 30min.
- Grattez avec le scrap les cellules lysées.
- Centrifugation pendant 30min/12000rpm à 4°C.
- Aspiration du surnageant.
- Conservation des culots bactériens à -80°C jusqu'à utilisation.

Extraction des ARNs:

- Lavage des culots bactériens avec 1 mL de tampon SET (50mM Nacl, 5 mM EDTA et 30 mM Tris-HCl (pH7)).
- Centrifugation 16000×g/ 30 min à 4°C
- Resuspendre les culots dans 400µL de la solution A (Glucose 10%, Tris 12.5 mM pH7.6, EDTA 10 mM) et mélanger (vortex) avec 60 µL d'EDTA 0.5M.
- Transférer les culots resuspendus dans des tubes contenant 0,6g de billes de silice et 500µL d'acid phenol et mélanger.
- Lyse mécanique des bactéries par le Fastprep (vitesse 6/30secondes x3).
- Centrifugation 10min à 14000rpm à 4°C.
- La phase aqueuse est transférée dans un tube de 2mL contenant 1mL de QIAzol (Qiagen) mélanger.
- Incuber 3min/RT
- Addition de 200 µL de chloroforme et mélanger doucement pendant 15 seconde
- Incuber à RT pendant 3 min.
- Centrifugation à 16000g pendant 15 min à 4°C.
- Transfert de la phase aqueuse supérieure (représente 60% du volume de QIAzol pipeté) contenant l'ARN dans un nouveau tube.
- L'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité par l'addition de 500µL d'isopropanol et incubé (3h à -20°C).
- Centrifugation des tubes pendant 30 min à 13000rpm à 4°C.
- Aspiration du surnageant.
- Lavage des culots avec 1 mL d'éthanol 75% froid.
- Centrifugation pendant 20 min à 14000rpm à 4°C.
- Aspiration de l'éthanol et laisser l'éthanol s'évaporer (les culots deviennent translucides).
- Resuspendre les culots d'ARN séchés avec 40 µL d'eau RNase free.

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Titre : Déterminants moléculaires impliqués dans la phase de persistance intracellulaire de la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*

Mots clés : *Listeria monocytogenes*, vacuole, persistance, génomique comparative, pathogène intracellulaire.

Résumé : *Listeria monocytogenes* (*Lm*) est une bactérie pathogène intracellulaire responsable d'une grave maladie d'origine alimentaire, la listériose. Si les mécanismes associés à la listériose invasive ont fait l'objet de nombreux travaux, ceux impliqués dans le portage asymptomatique chez l'homme et les animaux sont peu compris et très peu étudiés. Plusieurs mécanismes pourraient y contribuer, notamment la capacité de *Lm* à adopter un état *viable but not culturable* (VBNC) ou à entrer en dormance dans des vacuoles de persistance intracellulaire. Lors d'une infection prolongée dans des cellules épithéliales humaines (hépatocytes et trophoblastes), *Lm* passe d'un état réplicatif à un état métabolique ralenti au sein de vacuoles aux propriétés lysosomales, les LisCV. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés mais corrèlent avec la disparation du facteur de motilité ActA à la surface des bactéries.

L'objectif de ma thèse était de mieux comprendre les mécanismes associés à la formation des LisCV via 2 axes : (i) L'étude de la variabilité du phénotype de persistance intracellulaire selon la diversité génétique et écologique de *Lm* et (ii) L'étude de la reprogrammation transcriptionnelle des bactéries lors de la transition entre la phase précoce réplicative et la phase tardive de persistance au sein des LisCV.
Nous avons caractérisé 106 souches appartenant aux 2 lignées majeures de l'espèce (22 complexes clonaux, CC), dans notre modèle d'infection à long terme de cellules placentaires JEG-3, pour leur capacité à réaliser les étapes-clés du processus infectieux (entrée, dissémination cytosolique et persistance). Nous avons mis en évidence que la formation des LisCV était une propriété générale de l'espèce. Seuls 4 variants (V1 à V4), présentant des phénotypes de dissémination ou de persistance altérés, ont été identifiés. Ces variants appartiennent à des CCs prévalents dans les aliments mais rarement associés à des cas cliniques (CC9 et CC121), qui ont la particularité de produire une InlA-tronquée et dont la capacité d'invasion est fortement réduite.

En plus de la mutation dans *inlA*, V1 présentait des défauts dès la phase précoce liés à une mutation encore non décrite dans *hly,* conduisant à la synthèse d'une LLO tronquée non fonctionnelle. .V2 présentait un phénotype "hyper-persistant" avec de larges vacuoles, lié à la perte du gène *gshF*, co-activateur de PrfA, régulateur transcriptionnel des gènes de virulence. V3 et V4 montraient des phénotypes "hypo-persistants" comparables et spécifiques à la phase tardive, avec des LisCV plus petites, des bactéries plus associées à l'actine et plus d'ActA détecté à la surface bactérienne. V3 et V4 sont génétiquement proches et partagent 6 mutations qui pourraient être responsables du phénotype et constituer des marqueurs importants de persistance.

Afin de mettre en évidence la reprogrammation transcriptionnelle des bactéries lors de la transition vers la phase de persistance intravacuolaire, nous avons obtenu les transcriptomes des bactéries extracellulaires en phase exponentielle de croissance, des bactéries intracellulaires en phases précoce (réplicatives dans le cytosol) et tardive (en persistance dans les LisCVs). Nous avons observé une reprogrammation massive des gènes lors de la phase tardive, avec une surexpression des gènes associés au stress acide et une répression de certains gènes de division et du métabolisme, cohérent avec les conditions dégradatives des LisCV et une vie ralentie des bactéries intravacuolaires. Nous avons étudié des mutants de délétion de gènes spécifiquement induits lors de la phase tardive et cherché à mettre au point un système de détection des bactéries vacuolaires via des gènes « senseurs ».

L'ensemble de ces résultats suggèrent des mécanismes actifs de formation des LisCV par *Lm* qui pourraient contribuer au portage asymptomatique et à la persistance de *Lm* dans les tissus et expliquer les périodes d'incubation parfois longues du pathogène.

Title : Molecular determinants involved in the intracellular persistence phase of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*

Keywords : *Listeria monocytogenes*, vacuole, persistence, comparative genomics, intracellular pathogen.

Abstract : *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is an intracellular pathogenic bacterium responsible for a severe foodborne disease, listeriosis. While the mechanisms associated with invasive listeriosis have been extensively explored, those involved in asymptomatic carriage in humans and animals are poorly understood and very little studied. Several mechanisms may contribute to this, including the ability of *Lm* to adopt a viable but not culturable (VBNC) state or to enter dormancy in intracellular persistence vacuoles. Upon prolonged infection in human epithelial cells (hepatocytes and trophoblasts), *Lm* shifts from a replicative state to a slow metabolic state within vacuoles with lysosomal properties, the LisCVs. The underlying mechanisms are not elucidated but correlate with the disappearance of the motility factor ActA on the surface of the bacteria.

The objective of my thesis was to better understand the mechanisms associated with the formation of LisCVs *via* two axes: (i) the study of the variability of the intracellular persistence phenotype according to the genetic and ecological diversity of *Lm* and (ii) the study of the transcriptional reprogramming of bacteria during the transition from the early replicative phase to the late persistence phase within LisCVs.

We characterized 106 strains belonging to the 2 major lineages of the species (22 clonal complexes, CC), in our model of long-term infection of JEG-3 placental cells, for their ability to perform the key steps of the infectious process (entry, cytosolic dissemination and persistence). We established that the formation of LisCVs was a general property of the species. Only 4 variants (V1 to V4) with altered dissemination or persistence phenotypes were identified. These variants belong to CCs prevalent in foods but rarely associated with clinical cases (CC9 and CC121).

These CCs have the particularity of producing a truncated InlA that strongly reduces their invasion capacity. In addition to the mutation in *inlA*, V1 showed defects from the early phase related to a yet undescribed mutation in *hly*, leading to the synthesis of a truncated non-functional LLO. V2 showed a "hyper-persistent" phenotype with large vacuoles, linked to the loss of the *gshF* gene, co-activator of PrfA, transcriptional regulator of virulence genes. V3 and V4 showed comparable "hypo-persistent" phenotypes specific to the late stage, with smaller LisCVs, more actin-associated bacteria and more ActA detected on the bacterial cells surface. V3 and V4 are genetically close and share 6 mutations that could be responsible for the phenotype and the impaired genes might be important markers of persistence.
In order to highlight the transcriptional reprogramming of bacteria during the transition to the intravacuolar persistence phase, we obtained the transcriptomes of extracellular bacteria in exponential growth phase, and intracellular bacteria in early (replicating in the cytosol) and late (persisting in LisCVs) phases. We observed a massive reprogramming of genes in the late phase, with overexpression of genes associated with acid stress and repression of some divisional and metabolic genes, consistent with the degradative conditions of LisCVs and a slower life of intravacuolar bacteria. We studied deletion mutants of genes specifically induced during the late phase and sought to develop a system for detecting vacuolar bacteria via "sensor" genes.

All these results suggest active mechanisms of LisCVs formation by *Lm* that may contribute to the asymptomatic carriage and persistence of *Lm* in tissues and explain the sometimes-long incubation periods of the pathogen.