## Table des matières

**Résumé français** ... iii
**Résumé anglais (Abstract)** ... iv
**Résumé allemand (Zusammenfassung)** ... v
**Table des matières** ... vii
**Liste des figures** ... xi
**Liste des tableaux** ... xiii
**Liste des annexes** ... xiii
**Sigles et acronymes** ... xiv
**Terminologie et néologismes** ... xv
**Remerciements** ... xvi
**Avant-propos** ... xviii

**INTRODUCTION** ... 1

**CHAPITRE 1** ... 3
**CONTEXTUALISATION** ... 3
1.1. Problématiques causées par la présence de bactéries du genre *Listeria* ... 3
1.1.1. Solutions ... 6
1.1.2. But et hypothèses de l'étude ... 7
**REVUE DE LA LITTÉRATURE** ... 9
1.2. *LISTERIA* ... 9
1.2.1. *Listeria monocytogenes* ... 9
1.2.2. Historique ... 10
1.2.3. Classification ... 11
1.2.4. Composition de la paroi cellulaire ... 14
1.2.5. *Listeria* dans l'environnement ... 17
1.2.6. Résistances aux contraintes environnementales et mécanismes ... 17
1.2.6.1. Résistance à l'ammonium quaternaire ... 19
1.2.6.2. Résistance aux antibiotiques ... 23
1.2.6.3. Résistance aux phages ... 24
1.2.6.4. Système CRISPR-Cas ... 26
1.2.6.5. Adhésion aux surfaces - formation de biofilms ... 27
1.2.6.6. Communications bactériennes (QS-DS-ES) ... 31
1.2.6.7. Traitements thermiques ... 34
1.2.6.8. pH et agents de conservation ... 34
1.3. Listériose : portrait de la situation mondiale, épidémiologie et recensement ... 35
1.3.1. *Listeria* dans les aliments ... 42
1.3.1.1. Les produits laitiers ... 42
1.3.1.2. Les produits carnés ... 43
1.3.1.3. Les produits marins ... 46
1.3.1.4. Les produits végétaux : fruits et légumes ... 48
1.4. Listériose : maladie infectieuse ... 50
1.5. Mécanismes de virulence ... 55
1.5.1. Sécrétion d'hémolysine ... 57
1.5.2. Invasion cellulaire : implication des gènes de virulence ... 58

1.6. Méthodes d'isolement, de détection et d'identification des *Listeria* ..... 60
1.6.1. Étalement sur gélose et techniques biochimiques ..... 60
1.6.2. Lysotypage et phages à marqueur bioluminescent (phagodétection) ..... 62
1.6.3. Sérotypage ..... 63
1.6.4. PCR Polymerase Chain Reaction : technique moléculaire ..... 65
1.6.5. MDA Molecular Detection Assay : détection moléculaire ..... 66
1.6.6. Ribotypage ..... 66
1.6.7. Sondes nucléiques ..... 66
1.6.8. PFGE Pulsed-Field Gel Electrophoresis : électrophorèse en champ pulsé. 67
1.6.9. MLST MultiLocus Sequence Typing : typage - séquençage multi-sites .... 68
1.6.10. MALDI Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ..... 68
1.6.11. WGS Whole-Genome sequencing : Séquençage complet du génome ..... 70
1.7. Bactériophages ..... 70
1.7.1. Historique des bactériophages ..... 70
1.7.2. Les listériaphages ..... 75
1.7.3. Matrice de similitude, arbre phylogénétique et organigramme ..... 77
1.7.4. Phages A511 et P100 ..... 81
1.7.5. Mécanisme d'infection du phage A511 ..... 82
1.7.6. Cycles : lytique et lysogénique ..... 84
1.7.7. Résistances (physique, chimique) et stabilité des phages ..... 87
1.8. Biocontrôle par les phages : propriétés caractéristiques et critères de sélection... 89
1.8.1. Santé publique, innocuité et sécurité ..... 90
1.8.2. Approbations gouvernementales et commercialisation des phages ..... 91
1.8.3. Utilisations des bactériophages : classement par domaines ..... 95
1.8.4. Domaines : phagorepérage et phagoprophylaxie alimentaire ..... 96
1.8.5. Domaine : phagoassainissement - biofilms ..... 100
1.8.6. Domaine : phagothérapie (phagobiotiques) ..... 101
1.8.7. Isolement et observations des bactériophages ..... 104
1.8.8. Conservation des bactériophages ..... 106
1.9. Défenses des cellules hôtes contre les phages et formulations multiphages ..... 107
1.10. Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle ..... 111
1.11. Immobilisation cellulaire pour production de phages ..... 112
1.11.1. Techniques d'immobilisation ..... 113
1.11.2. Adsorption ..... 113
1.11.3. Polymérisation et agrégation ..... 114
1.11.4. Inclusion ..... 114
1.12. Alginate: polymère naturel avantageux pour une production de phages ..... 115
1.12.1. Composition et propriétés ioniques ..... 116
1.12.2. Technique de production de phages par inclusion de bactéries ..... 117

**CHAPITRE 2** ..... 120
**BIOLOGICAL INACTIVATION OF ADHERING *L. MONOCYTOGENES* BY LISTERIAPHAGES AND A QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND** ..... 120
2.1. Avant-propos : contribution des auteurs ..... 120
2.2. Résumé français ..... 121
2.3. Abstract ..... 122
2.4. Introduction ..... 123

2.5. Materials and Methods ..... 124
2.5.1. Bacteria, phages and media ..... 124
2.5.2. Test surfaces ..... 124
2.5.3. Disinfection procedure ..... 124
2.5.4. Resistance of phages to QUATAL ..... 125
2.5.5. Statistical analysis ..... 125
2.6. Results and Discussion ..... 126
2.6.1. Phage host range ..... 126
2.6.2. Adherence of *L. monocytogenes* to surfaces ..... 126
2.6.3. Disinfection by listeriaphage suspensions ..... 127
2.6.4. Mixed disinfecting solutions ..... 128
2.7. Acknowledgements ..... 130
2.8. References ..... 131

**CHAPITRE 3** ..... 133
**PRODUCTION OF BACTERIOPHAGES BY *LISTERIA* CELLS ENTRAPPED IN ORGANIC POLYMERS** ..... 133
3.1. Avant-propos : contribution des auteurs ..... 133
3.2. Résumé français ..... 134
3.3. Résumé allemand – Zusammenfassung ..... 135
3.4. Abstract ..... 136
3.5. Introduction ..... 137
3.6. Materials and Methods ..... 139
3.6.1. Bacteria, phages and media ..... 139
3.6.2. Alginate gels and cell immobilization by entrapment ..... 139
3.6.3. Morphology of cells immobilized in beads ..... 139
3.6.4. Phage adsorption. ..... 140
3.6.5. Biomass concentration. ..... 140
3.6.6. Phage production ..... 140
3.6.6.1. Free cells. ..... 140
3.6.6.2. Immobilized cells used for single and successive phage propagations ..... 140
3.6.6.3. Statistical analysis ..... 141
3.7. Results and Discussion ..... 141
3.7.1. Morphological observations. ..... 141
3.7.2. Phage adsorption. ..... 142
3.7.3. Biomass concentration. ..... 142
3.7.4. Phage production ..... 143
3.7.4.1. Free cells. ..... 143
3.7.4.2. Immobilized cells used for single and successive phage propagations. ..... 143
3.8. Acknowledgments. ..... 145
3.9. Author contribution. ..... 145
3.10. Absence of conflicts of interest. ..... 145
3.11. References ..... 146

**CHAPITRE 4** ..... 151
**TESTS COMPLÉMENTAIRES** ..... 151
4.1. Hémolyse ..... 151
4.2. Courbe de croissance ..... 152
4.3. Congélation des listériaphages ..... 154
4.4. Activités lytiques des cinq premiers listériaphages répertoriés ..... 155
4.5. Souches résistantes ..... 155
4.6. Influence du pH, de la température et de l'aération ..... 156
4.7. Courbe d'amplification phagique - burst size (effectif viral) ..... 157

**CHAPITRE 5** ..... 160
**DISCUSSION GÉNÉRALE** ..... 160
5.1. Atteinte des objectifs : phagoassainissement ..... 160
5.2. Atteinte des objectifs : phagoproduction par immobilisation ..... 161
5.3. Capacités lytiques sous contraintes, résistance bactérienne et évolution ..... 162
5.4. Nombre de phages libérés et fiches signalétiques ..... 163
5.5. Retour sur la persistance de *L. monocytogenes* dans l'intestin : implication de l'adsorption des phages. ..... 164
5.6. Bilan final ..... 164
5.7. Conclusion et perspectives ..... 165

**BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE** ..... 169
Auteurs ..... 169
Organismes et autres ..... 202

**ANNEXES** ..... 207

## Liste des figures


Figure 1.1. Arbre évolutif caractérisant les *Listeria sensu stricto* et *sensu lato* ..... 12
Figure 1.2. Schématisation de la paroi des bactéries à Gram + ..... 15
Figure 1.3. Structure détaillée de la paroi cellulaire de *L. monocytogenes* ..... 15
Figure 1.4. Ponts interpeptidiques reliant les acides aminés D-Ala et M-DAP chez *L. monocytogenes*) ..... 16
Figure 1.5. Structures moléculaires de la paroi de *L. monocytogenes* : Ribitol-phosphate lié à différents carbohydrates (1/2a, 4a et 4b) ..... 16
Figure 1.6. Inactivation d'un CRISPR-Cas par un anti-CRISPR phagique ..... 27
Figure 1.7. Secteurs touchés : cas de listériose. ..... 36
Figure 1.8. Coûts annuels estimés pour les maladies causées par les cinq principaux pathogènes alimentaires aux États-Unis ..... 39
Figure 1.9. Taux (%) estimés d'hospitalisations causées par différents pathogènes ..... 41
Figure 1.10. Pourcentage des produits alimentaires incriminés dans des cas de listériose invasive de 1980 à 2010 ..... 45
Figure 1.11. Nombre de cas et décès associés aux principales éclosions de listériose invasive de 1980 à 2010 ..... 50
Figure 1.12. Infiltration bactérienne à travers l'épithélium intestinal ..... 51
Figure 1.13. Constitution cellulaire de l'intestin et localisation des globules blancs ..... 51
Figure 1.14. Processus d'infection de *L. monocytogenes* ..... 53
Figure 1.15. Facteurs de risque (listériose). ..... 54
Figure 1.16. Action localisée des facteurs de virulence de *L. monocytogenes* chez la cellule eucaryote ..... 55
Figure 1.17. *L. monocytogenes* : passage de cellule en cellule ..... 56
Figure 1.18. Internalines de *L. monocytogenes* sur des récepteurs d'eucaryotes ..... 59
Figure 1.19. Complexes anticorps/antigène. Test ELISA-dosage en sandwich. ..... 64
Figure 1.20. Procédure MALDI ..... 69
Figure 1.21. Études sur l'utilisation des phages en biotechnologie ..... 74
Figure 1.22. Ordre *Caudovirales* ..... 76
Figure 1.23. Matrice de similitude basée sur des rapprochements protéiniques de 32 listériaphages ..... 79
Figure 1.24. Arbre phylogénétique basé sur les gènes orthologues ..... 80
Figure 1.25. Structure d'un phage, famille *Myoviridae* ..... 81
Figure 1.26. Organigramme classifiant d'importants listériaphages ..... 82
Figure 1.27. Plaque basale du phage A511 ..... 83
Figure 1.28. Cycles lytique et lysogénique ..... 84
Figure 1.29. Cycle lytique (formation et libération des phages) ..... 85
Figure 1.30. Phagogrammes : *Listeria monocytogenes* ..... 90
Figure 1.31. Différents domaines (ϬϬ) d'utilisation des bactériophages (Φ). Néologismes et terminologies entrant dans un protocole de phagocontrôle. ..... 95
Figure 1.32. Bactériophages en action sur un biofilm ..... 101
Figure 1.33. Techniques d'immobilisation cellulaire. ..... 113
Figure 1.34. a) Formules chimiques : acides mannuronique et guluronique.
b) Formation d'un gel d'alginate par association avec des ions calcium. ..... 116
Figure 1.35. Étapes de formation des cellules immobilisées dans des billes d'alginate .. 117

Figure 1.36. Comportement des bactéries immobilisées dans les billes d'alginate et processus d'infection par les phages en surface et dans le milieu ..... 118
Figure 1.37. Rouages d'un système de production de phages par immobilisation cellulaire dans des matrices d'alginate ..... 119
Figure 2.1. Recovery of adhering *L. monocytogenes* cells from contaminated SS and PP surfaces before and after exposure for 1 h to listeriaphages ..... 127
Figure 2.2. Recovery of *L. monocytogenes* 8427 and 10401 from contaminated SS and PP surfaces after exposure for l h to several concentrations of QUATAL ..... 128
Figure 2.3. Recovery of *L. monocytogenes* 8427 and 10401 from SS and PP surfaces after exposure for 1 h to a suspension of listeriaphages ($10^8$ PFU/ml) mixed with several concentrations of QUATAL..... 129
Figure 2.4. Resistance of phage H387 to QUATAL (1 to 100 ppm). Phages were suspended in various concentrations of QUATAL for periods of up to 4 h..... 130
Figure 3.1. Observation of entrapped alginate bacteria. (Left) Visual appearance of alginate beads containing *L. ivanovii* WSLC 3009 ($10^8$ cfu.mL$^{-1}$) in a Petri dish. (Right) Scanning electron micrograph of *L. ivanovii* WSLC 3009 immobilized in alginate beads (x 10 000). ..... 141
Figure 3.2. Transfers of *L. ivanovii* WSLC 3009 immobilized cells in fresh TSB. Each reactivation was followed by an interval of 12 h ..... 142
Figure 3.3. Production of phages A511 and H387 on *L. ivanovii* WSLC 3009 in liquid medium, using a 1 and 0.1 M.O.I. ..... 143
Figure 3.4. Production of phages A511 and H387 on *L. ivanovii* WSLC 3009 immobilized in alginate beads, using a 1 and 0.1 M.O.I. ..... 144
Figure 3.5. Successive productions of the two phages, A511 and H387, on *L. ivanovii* WSLC 3009 using a M.O.I. of 1 ..... 145
Figure 4.1. Courbe de croissance de *L. monocytogenes* IP31 (TSY-B à 28 ºC)..... 153
Figure 4.2. Courbe d'amplification phagique et de décroissance cellulaire. Comportement de la souche *L. monocytogenes* IP31 lors de la production du phage H387 en milieu liquide (M.O.I. de 0,1) à 28 ºC..... 159
Figure 4.3. Courbe d'amplification phagique lors de la production du phage A511 sur la souche *L. ivanovii* 3009 en milieu liquide (M.O.I. de 0,1) à 28 ºC.... 159

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Contenu principal des îlots de pathogénicité chez *L. monocytogenes*. ..... 13
Tableau 1.2. Moyennes annuelles: cas de listérioses ..... 37
Tableau 1.3. Moyennes annuelles des infections mortelles par *L. monocytogenes* : comparaison avec d'autres bactéries pathogènes..... 41
Tableau 1.4. Galerie API (Biomérieux) : Identification de *L. monocytogenes*..... 62
Tableau 1.5. Sérotypes de *Listeria*. Variations dans les protéines structurales et flagellaires et composition des acides téichoïques sérotypes 1/2, 3 et 4..... 63
Tableau 1.6. Premier état taxinomique des listériaphages ..... 77
Tableau 2.1. Variance analysis and interactions as function of sampling method and date (F values). ..... 125
Tableau 4.1. Résultats des tests d'hémolyse effectués sur *L. monocytogenes* (IP31, IP31-A, 8427, 10401) sur *L. innocua* et *L. ivanovii*..... 152
Tableau 4.2. Intensité des lyses formées sur un tapis de *L. monocytogenes* 10401 par le phage H387 après 4 cycles de gel et de dégel à -10 ºC et -80 ºC (phagogrammes : cycles de gel et dégel). ..... 154
Tableau 4.3. Spectre lytique de cinq listériaphages sur huit bactéries du genre *Listeria* ..... 155
Tableau 4.4. Spectres lytiques, de phages individuels et combinés, réalisés sur quatre colonies résistantes (phagogrammes : résistances). ..... 156
Tableau 4.5. Intensité des zones de lyse en fonction du pH et de la température (phage H387 sur *L. monocytogenes* IP31-A). (phagogrammes : influence combinée de la température et du pH). ..... 156
Tableau 4.6. Intensité des zones de lyse sous des conditions aérobies et anaérobies (phagogrammes : oxygénation à 26 ºC). ..... 157

## Liste des annexes

Annexe 1. Réaction de Voges-Proskauer (VP)…….. 207
Annexe 2. Représentation moléculaire de quelques familles d'antibiotiques…… 207
Annexe 3. Cas répertoriés de listériose (Canada-France)……...208
Annexe 4. Politique sur la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments……....209
Annexe 5. Les microfilaments d'actine……..210
Annexe 6. Immobilisation de bactéries dans des billes ou des filets d'alginate……....210
Annexe 7. Formation des réseaux d'alginate…… 211
Annexe 8. Morphologie des bactériophages……...212
Annexe 9. Principaux critères d'un statut GRAS…….…….. 213
Annexe 10. Mécanismes de résistance des bactéries (phages et produits chimiques)..... 213

Rapport-Gratuit.com

## Sigles et acronymes

### Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| ACIA : | Agence canadienne d'inspection des aliments |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| Afssa : | Agence française de sécurité sanitaire des aliments |
| ANI : | Poucentage moyen d'identité nucléotidique (Average Nucleotide Identity) |
| Anses : | Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail |
| AOAC : | Association of Official Agricultural Chemists |
| ASPC : | Agence de la santé publique du Canada |
| ATCC : | American Type Culture Collection |
| $A_w$ : | Activité de l'eau ($a_w$) |
| BLASTp : | Basic Local Alignment Search Tool-protein |
| BPF : | Bonnes pratiques de fabrication |
| CAMP : | Test d'identification des *Listeria* (Christie-Atkins-Munch-Pertersen) |
| $CaCl_2$ : | Chlorure de calcium |
| CCA : | Commission du Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission) |
| CRDA : | Centre de recherche et de développement sur les aliments |
| CYLG : | Casein-yeast-lactate-glucose |
| Db : | Double brin (db) |
| $DO_{600}$ : | Densité optique à 600 nm |
| EDTA : | Ethylènediaminetétraacétate |
| ELISA : | Enzyme linked Immunosorbent Assay |
| FDA : | Food and Drug Administration (USA) |
| Gal : | Galactose |
| Glc : | Glucose |
| GRAS : | Generally Recognized as Safe Status / Généralement reconnu inoffensif |
| HACCP : | Système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (Hazard Analysis Critical Control Point) |
| HPB : | Health Protection Branch (Canada) |
| IgA : | Immunoglobuline A |
| MAPAQ : | Ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec |
| M-DAP : | Diaminopimélique (acide aminé non protéinogène, dérivé de la lysine) |
| M.O.I. : | Multiplicity of infection / Multiplicité d'infection |
| NCBI : | National Center for Biotechnology Information |
| PAM : | Prêt(s)-à-manger |
| PCR : | Polymerase Chain Reaction |
| PEG : | Polyéthylène-glycol |
| PP : | Polypropylène |
| PrfA : | Positive regulatory factor A / Facteur de régulation positive A |
| QUATAL : | Ammonium quaternaire (Quat) |
| Rha : | Rhamnose |
| RPM : | Rotations par minute |
| TSAYE : | Tryptone Soya Agar Yeast Extract |
| TSB : | Trypticase Soy Broth |

| | |
|---|---|
| SS : | Stainless steel / acier inoxydable |
| SUMO : | Small Ubiquitin-like Modifier |
| UFC : | Unité formatrice de colonie / CFU Colony-Forming Unit |
| UFP : | Unité formatrice de plaque (de plage de lyse) / PFU Plaque-Forming Unit |
| UL-P-LC : | Université Laval-P-*Listeria* Collection |
| USDA : | U.S. Department of Agriculture / Département de l'agriculture É.-U. |
| U.V : | Ultra-Violet |
| WSLC : | Weihenstephan *Listeria*-Collection |

---

| | |
|---|---|
| Mm : | MilliMolaire |
| nm : | Nanomètre ($10^{-9}$ m) |
| µl : | Microlitre ($10^{-6}$ l) |

**Terminologie et néologismes**

| | |
|---|---|
| **Phagoadditif :** | Phages ajoutés aux aliments pour limiter la croissance de bactéries. |
| **Phagoassainisseur :** | Nettoyant ou désinfectant à base de phages. (*syn*. bio-désinfectant/ bio-assainisseur; domaine : phagoassainissement) |
| **Phagobiotique :** | Particules phagiques qui éliminent, limitent ou empêchent la croissance des bactéries. Utilisation médicale (domaine : phagothérapie). |
| **Phagogramme :** | Test de culture bactérienne en présence de phages, réalisé sur gélose, en vue de déterminer la sensibilité des bactéries vis-à-vis divers bactériophages. Procédure : dépôt d'une goutte standardisée de phages sur un tapis bactérien, suivi d'une incubation fixe à une température donnée. Évaluation de la clarté et de la définition des zones de lyse. |
| **Phagopesticide :** | Produit à base de phages destiné à éliminer des bactéries causant des maladies chez les plantes. |
| **Phagoprophylaxie :** | Domaine de prévention, faisant appel aux phages, dans le but de limiter le développement et la propagation de bactéries. |
| **Phagorepérage :** | Phagodétection ou lysotypie. Utilisation des phages pour l'identification de bactéries ou de phages à marqueur bioluminescent. |
| **Phagothérapie :** | Utilisation de bactériophages dans les traitements de maladies infectieuses d'origine bactérienne.<br>Phago-nanothérapie : procédé nanologique impliquant les phages. |
| **Phagotraitement :** | Traitements de thérapie ou d'assainissement utilisant les phages. |



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

## Remerciements

Cette recherche de troisième cycle a été effectuée à l'Université Laval, au Département des sciences des aliments de la Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation (FSAA). Elle a été bonifiée par un stage d'études de 10 mois, appuyé par une bourse octroyée par le Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), pour des recherches dans la discipline de la chimie des aliments (Lebensmittelchemie) effectuées au Campus de Freising-Weihenstephan, centre de recherche de l'Université technique de Munich, en Allemagne. Elle a été finalisée au département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique de la Faculté des sciences et de génie de l'Université Laval et encouragée par une bourse attribuée par le Groupe de recherche en écologie buccale (GREB), centre multifacultaire dont les activités de recherche touchent notamment les domaines de la microbiologie-immunologie et le contrôle des infections. Merci aux organismes subventionnaires pour votre aide et votre contribution à l'épanouissement de la science.

Ce travail soutenu n'aurait pu se réaliser sans la contribution d'un grand nombre de collaborateurs qu'il convient de remercier. Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude à mon Directeur de recherche, M. Sylvain Moineau, pour sa confiance, son encadrement et pour ses suggestions indispensables. Ses connaissances dans les domaines de la génétique et de la virologie ont été pour moi une référence solide. Je remercie également M. Jacques Goulet, mon premier directeur de projet, qui a été une source d'inspiration par ses conseils judicieux et son esprit créatif devant certains problèmes techniques. Il m'a donné le premier élan en contribuant grandement à développer mon intérêt pour les listériaphages et en m'orientant jusqu'à mon stage à Munich. Je suis aussi reconnaissante envers la professeure et directrice de programme, Mme Lisa Topolnik, envers Mme Manon Couture, professeure et responsable des évaluations, ainsi qu'envers Messieurs Steve Labrie, Michel Frenette et Mme Gisèle LaPointe, membres du comité d'encadrement et du jury. J'ai grandement apprécié votre professionnalisme et votre accueil chaleureux. Je remercie aussi Mmes Denise Tremblay et Geneviève Rousseau ainsi que M. Simon Labrie pour leur collaboration. Je tiens également à remercier sincèrement feu le Dr Hans-Wolfgang Ackermann, spécialiste des virus bactériens de la Faculté de médecine de l'Université Laval. Le Dr Ackermann a été d'une aide précieuse pour l'observation et la caractérisation des bactériophages au

microscope électronique. Ce fut pour moi un grand honneur de bénéficier de son expertise et de ses connaissances dans le domaine de la virologie. C'est d'ailleurs grâce à ses contacts internationaux que j'ai eu l'opportunité de m'entretenir avec des sommités scientifiques lors d'un Symposium sur les *Listeria*, qui s'est déroulé à Copenhague et lors d'une exposition scientifique à Hanovre. Mes remerciements sont également adressés à toute l'équipe de l'institut Weihenstephan, en Allemagne. Pour ne citer que quelques noms : Prof. Dr S. Scherer, Dr Ralf Zink et Prof. Dr M. J. Loessner, spécialiste hautement reconnu pour ses nombreuses contributions scientifiques entourant le monde des *Listeria* et des listériaphages, et actuellement Professeur au département des Sciences de la santé et de la technologie à Zürich, en Suisse. Je le remercie aussi tout spécialement, ainsi que le Dr Jochen Klumpp du même département, pour la révision de mes textes en allemand.

En terminant, je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes parents, Jeanne et Roland, envers qui je témoigne toute ma gratitude. À mes deux merveilleuses filles, Mélanie et Lauriane, vous êtes mes deux plus grandes réussites et votre intérêt pour les sciences et l'allemand me fait grandement plaisir. Un immense et profond merci à mon conjoint, Alain : tes encouragements, tes attentions, ton soutien et ta compréhension m'ont apporté l'énergie nécessaire pour mener à terme ce travail. Je ne te remercierai jamais assez pour tout l'amour que tu m'apportes chaque jour, pour ton ouverture et aussi pour tes judicieux conseils en informatique lors de mes nombreuses heures passées à l'ordinateur.

Merci à tous,

*Brigitte Roy*

*Même si la vie m'a transportée ailleurs et bien que j'aie accompli autre chose avec grande motivation, mon esprit ne pouvait se détacher de ce passionnant travail qui avait été si près d'être terminé. Après tant d'années, me revoilà, constatant que ma flamme ne s'était jamais éteinte.*

*Felix qui potuit rerum cognoscere causas.*

## Avant-propos

Cette thèse de doctorat contient une revue de la littérature scientifique portant sur les *Listeria*, les listériaphages et les techniques d'immobilisation cellulaire. Elle inclut également deux articles scientifiques : le premier, publié dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*, traite du bio-assainissement de surfaces solides à l'aide de phages; le second, publié dans la revue *Viruses*, fait état du développment d'une nouvelle technique de production de phages par immobilisation cellulaire dans un milieu biphasique via des billes d'alginate. Ces articles scientifiques, présentés dans les chapitres deux et trois, sont rédigés en anglais et introduits par un résumé en français afin de répondre aux exigences de la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'Université Laval. Le résumé introductif de la thèse et le résumé portant spécifiquement sur la technique de production de bactériophages sont en versions française, anglaise et allemande. Toute autre section ne faisant pas l'objet d'une publication est rédigée en français.

# INTRODUCTION

En plus d'une revue de la littérature reposant sur de nombreuses publications scientifiques qui mettent en lumière les connaissances actuelles sur *Listeria monocytogenes* et sur les bactériophages, le **chapitre 1** de cette thèse comporte un aperçu des moyens d'immobiliser les bactéries en vue de développer une nouvelle voie de production de phages. Ce chapitre met aussi en contexte les problématiques reliées à la présence des *Listeria* dans notre quotidien et expose le but et l'hypothèse de l'étude. Dans une approche de solutions, la première partie expérimentale, contenue dans le **chapitre 2**, se concentre sur la vérification de l'efficacité de différents phagoassainisseurs constitués : A) de phages individuels; B) d'un mélange de listériaphages; C) d'un mélange de listériaphages et d'ammonium quaternaire. Cette section, qui a fait l'objet d'une publication dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*, se consacre au développement de nouvelles voies de contournement pour solutionner l'accoutumance et la résistance des *Listeria* aux produits chimiques. Conséquemment, elle a été réalisée afin de pouvoir offrir une solution efficace aux industries aux prises avec des contaminations récurrentes. La technologie des phagoassainisseurs pourrait être implantée plus largement dans les secteurs agroalimentaire et hospitalier pour assainir les surfaces et outils de travail et pour prévenir les contaminations dans les produits prêts à manger. Du même coup, le développement de ces bio-agents permettrait de diminuer les concentrations de produits chimiques actuellement en surutilisation et souvent néfastes pour la santé et l'environnement.

La deuxième partie de l'étude, exposée dans le **chapitre 3** et publiée dans la revue *Viruses*, traite du développement d'une méthode facilitant la production de phages à l'échelle industrielle. L'expérimentation visait la production de phages en continu, par immobilisation cellulaire dans une matrice de polymère. La technique de production de phages s'est donc effectuée à l'aide de cellules de *Listeria* immobilisées dans un polymère d'alginate. La méthode d'immobilisation cellulaire exploitée pourrait solutionner certaines problématiques de mise en marché des phages en réduisant les coûts, par une production en continu et par une rapidité d'opération accrue grâce à la conservation des inoculums bactériens. À cela s'ajoute une protection de la population hôte conduisant à la réduction des risques associés à l'acquisition de caractères de résistance. Le **chapitre 4** regroupe quelques tests

complémentaires et des commentaires qui ont mené à la sélection des listériaphages suivant les différentes conditions physico-chimiques favorisant leur capacité à éliminer les *Listeria* et à supporter diverses contraintes. D'autres tests supplémentaires s'y retrouvent, tels que des courbes de croissance et des estimations du nombre de phages libérés lors d'une production. Le **chapitre 5** se concentre sur l'analyse et la discussion des résultats, sur l'atteinte des objectifs, il expose un bilan final et se termine par la conclusion générale et les perspectives.

# CHAPITRE 1

# CONTEXTUALISATION

## 1.1. Problématiques causées par la présence de bactéries du genre *Listeria*

*Listeria monocytogenes* est une bactérie psychrotrophe responsable de la listériose humaine et animale. Cette bactérie, pathogène intracellulaire facultatif, est la cause de plusieurs décès chez des humains de tous âges. Sa forte virulence repose, en partie, sur sa capacité à produire une hémolysine, sur ses aptitudes à induire la phagocytose, sur sa motilité intracellulaire liée à la polymérisation de filaments d'actine et sur ses facultés de voyager de cellule en cellule par la formation de pseudopodes transcellulaires (Dussurget *et al*., 2004). Lorsque cette bactérie s'installe et se développe dans l'organisme humain, elle affecte plus sérieusement la santé de trois catégories de sujets : l'adulte âgé, les individus dont le système immunitaire est affaibli et également le fœtus ou le nouveau-né, avec répercussions chez la femme enceinte. L'infection se caractérise, en général, par une infection sanguine, la septicémie, et/ou une infection du système nerveux central pouvant engendrer une méningo-encéphalite (Berche, 2005; Courtieu *et al*., 1986). Lors d'une grossesse, la dissémination de cette bactérie à l'intérieur du corps peut provoquer une grossesse abortive, un accouchement prématuré, la venue d'un bébé mort-né ou celle d'un nouveau-né ayant des séquelles neurologiques sévères (Anses, 2016; Doganay, 2003; Rocourt, 1989).

Un solide rapport de causalité, mondialement établi, entre des cas d'intoxication alimentaire à haut taux de mortalité et la présence de *L. monocytogenes* dans certains produits de consommation a marqué les années 80 et 90 (Karunasagar *et al*., 1992; Kittson, 1992). Les agences de la santé publique ont, depuis, classé la listériose comme étant une affection redoutable, les cas graves étant plus susceptibles d'être mortels que ceux des autres intoxications alimentaires. Toutes les éclosions de listériose recensées annuellement dans de multiples pays, depuis près de 40 ans, ainsi que la grande variété de produits alimentaires impliqués, incitent à considérer *L. monocytogenes* comme un pathogène dangereux pour l'humain, et ce même à l'aube des années 2020. En effet, dans sa forme invasive, l'infection demeure potentiellement responsable de la mort de 20 à 30 % des personnes infectées (Anses, 2016). Parallèlement, l'utilisation de désinfectants chimiques pour lutter contre

*L. monocytogenes* dans les usines de transformation alimentaire est en réévaluation constante et, parfois, les concentrations nécessaires pour l'éradiquer doivent être augmentées. Afin de solutionner cette problématique, le développement de bio-assainisseurs fait désormais partie des avenues de choix et devient un enjeu incontournable dans le contexte actuel de résistance bactérienne, en augmentation progressive face aux produits chimiques (Russell, 2004; Ryu & Beuchat, 2005). Force est de constater que l'accroissement des multirésistances bactériennes s'annonce un problème d'envergure dans les secteurs agroalimentaire et hospitalier. Conséquemment, la récidive de certains germes bactériens pathogènes, dans les industries de l'alimentation par exemple, engendre d'importants impacts socio-économiques négatifs. En effet, annuellement, plusieurs aliments sont retirés de la vente en raison de contamination par ce pathogène, ce qui occasionne des frais importants reliés aux soins de santé, en plus d'entraîner parfois la fermeture temporaire ou définitive des entreprises ou d'affecter fortement la confiance des consommateurs, (La Presse, 2008; USDA, 2013).

De surcroît, des recherches démontrant que des bactéries exposées à des désinfectants peuvent devenir plus rapidement résistantes à certains antibiotiques renforcent la nécessité de développer des produits de nature biologique appartenant à une nouvelle génération d'antimicrobiens (Directorate, 2009; Pearce *et al*., 1999). D'un autre côté, l'intérêt marqué envers la diminution de produits chimiques stables dans l'environnement appuie favorablement l'étude et la création d'un désinfectant spécifique, écologique et naturel, puisque les interventions chimiques ne sont pas sans conséquences sur les écosystèmes et la santé humaine. De ce fait, la découverte et le développement d'agents bio-désinfectants sont grandement recherchés et dépendent non seulement de l'évolution des connaissances phylogénétiques sur le microorganisme à inhiber, mais également de l'étude de l'ensemble des paramètres phénotypiques le caractérisant.

Les principaux paramètres connus influençant la croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments sont le pH, l'activité de l'eau ($A_w$), la température, le type de flore bactérienne initialement présent et les agents de conservation utilisés. L'aptitude de ce microorganisme à survivre dans une grande variété d'aliments, sa capacité de multiplication aux températures d'entreposage (2-4 ºC), sa tolérance élevée au sel et sa viabilité en pH acide renforcent

l'obligation d'une surveillance régulière en industrie (Buchanan & Klawitter, 1990; McClure *et al*., 1989). Ainsi, lorsqu'un aliment ne subit aucun traitement thermique sévère avant ou après transformation, le produit fini devient potentiellement vecteur de contamination. Puisque la présence de *L. monocytogenes* dans la nourriture peut mettre en danger la santé publique, le contrôle de ce pathogène est donc requis durant toutes les étapes de transformation : de la réception de la matière première à l'expédition des produits finis. Depuis plusieurs décennies, des mesures de prévention mettant l'accent sur l'hygiène personnelle (nettoyage des mains, utilisation de gants et de filets) ont été enseignées aux ouvriers du secteur agroalimentaire. Toutefois, les campagnes de sensibilisation et d'information ne peuvent parvenir à elles seules à contrôler la présence de ces germes ubiquitaires dans les aliments. Les *Listeria* sont présentes naturellement dans notre environnement et les porteurs sains de ce germe bactérien sont très nombreux dans le règne animal (Anses 2016, Simon, 2013). Il est alors théoriquement impossible d'éviter la contamination de tous les aliments à l'état brut. Malgré toutes les mesures de précaution et de surveillance appliquées, plusieurs usines agroalimentaires sont encore victimes de contamination. Une attention particulière s'impose donc à l'endroit des aliments qui sont les vecteurs primaires de la listériose. Les contaminations alimentaires originent généralement d'un contact direct avec le sol (légumes), d'une contamination animale (lait, fromages, viandes, poissons, crustacés) ou d'une contamination croisée : produits transformés ayant été en contact avec des surfaces de travail colonisées par le microorganisme (saucisses, pâtés, plats cuisinés) (Karounasagar *et al*., 1992; Rossi *et al*., 2011; Schoder *et al*., 2014). Inversement, la matière première contaminée mise en contact avec l'équipement et les zones de travail engendre aussi ce processus de transfert de germes. Les surfaces de travail souillées jouent inévitablement un rôle majeur dans la transmission de bactéries aux aliments. L'élargissement des moyens d'inhibition représente une voie pouvant améliorer le contrôle des *Listeria* et contourner leur résistance envers certains produits utilisés en industrie (Anses, 2011). La récurrence bactérienne et la problématique de progression des résistances doivent être contrôlées le plus tôt possible pour faire face aux conséquences imminentes qu'engendrera l'inefficacité des moyens actuellement employés pour éliminer ce microorganisme.

Rapport-Gratuit.com

### 1.1.1. Solutions

Plusieurs options sont à l'étude dans la lutte biologique contre *Listeria monocytogenes*. Parmi les solutions de biocontrôle figurent : l'utilisation de bactériocines, petits peptides constitués de 20 à 60 acides aminés produits par de nombreuses bactéries; l'emploi d'endolysines, enzymes hydrolytiques libérées par les bactériophages; l'approche du décodage par quorum sensing (QS), en vue de neutraliser ou de brouiller les messages et les communications induisant, par exemple, la formation de biofilms. D'autres voies sont également explorées, dont celles de l'emploi d'antagonismes microbiens favorisant la compétition entre les germes et l'étude des antimicrobiens naturels incluant les bioflavonoïdes, polyphénols reconnus comme molécules bioprotectrices présentes notamment dans la coriandre (CNRS, 2010). Des études convergent vers la conclusion que l'usage simultané d'au moins deux facteurs de conservation représenterait une solution prometteuse et efficace pour mieux contrôler la présence des *Listeria* dans l'alimentation (Djenane *et al*., 2006). L'analyse de l'effet de synergie entre plusieurs moyens d'inhibition utilisables contre les bactéries qui contaminent les surfaces est une avenue qui mérite d'être développée pour solutionner notamment les problèmes de contamination croisée ou de récurrence des microorganismes.

La solution proposée dans cette thèse est l'utilisation d'un bio-assainisseur constitué d'un mélange de listériaphages, dont certaines formulations ont été combinées avec de l'ammonium quaternaire pour vérifier le potentiel synergique. Grâce à leur caractère bactéricide, les listériaphages sont d'excellents agents naturels permettant de contrôler les *Listeria*. Le *modus operandi* de ces particules nucléoprotéiques consiste à s'adsorber spécifiquement à la paroi cellulaire du microorganisme, à transférer leur bagage génétique et à se répliquer dans la cellule hôte. En plus de provoquer la lyse des bactéries pathogènes infectées et de se disséminer dans le milieu environnant, les bactériophages recherchent, suite à leur libération, les bactéries avoisinantes, permettant ainsi de contrôler voire d'éliminer la population microbienne ciblée. Le principe du bio-assainissement repose donc sur la lutte naturelle déjà existante entre les bactériophages et les bactéries. Puisque les listériaphages sont d'excellents prédateurs des *Listeria* et que leur exploitation est de plus en plus acceptée dans le secteur agroalimentaire, la formulation de phagoassainisseurs pour exterminer *L. monocytogenes* sur des surfaces de travail est donc une approche biologique intéressante

(Gutiérrez *et al*., 2017; Roy *et al*., 1993; USFDA, 2006). Les règles d'utilisation et de contrôle des phagoassinisseurs s'apparentent à celles des bio-insecticides et des bio-herbicides. Leur utilisation ne doit pas nuire à la santé humaine et animale, ni à la qualité de l'environnement. Le processus du bio-assainissement est fondé sur l'utilisation d'ingrédients biologiques avec, dans certains cas, un emploi restreint de produits chimiques ou d'additifs. Le développement de ces nouveaux outils de biocontrôle permet de diversifier les créneaux dans le domaine de la désinfection et offre certaines opportunités d'expansion pour les entreprises canadiennes, américaines et européennes déjà impliquées dans les secteurs de l'assainissement et du biocontrôle.

Toutefois, les méthodes conventionnelles de production de bactériophages sont parfois longues et ne permettent pas toujours d'obtenir de fortes concentrations de suspensions virales. Les bio-assainisseurs se doivent d'être produits en quantités et concentrations suffisantes pour accélérer leur développement et pour envisager une production industrielle susceptible de satisfaire un marché international. Pour ces raisons, au cours de cette recherche, une nouvelle technique de production de phages a été développée, parallèlement à l'élaboration de différentes formulations de phagoassainisseurs contenant une variété de bactériophages.

### 1.1.2. But et hypothèses de l'étude

Le but de cette étude est, d'une part, de formuler un bio-assainisseur à base de bactériophages spécifiques aux bactéries du genre *Listeria* et, d'autre part, de développer une technique de production de phages faisant appel à l'immobilisation cellulaire dans des billes d'alginate en vue d'une exploitation à l'échelle industrielle. La première hypothèse émise est qu'une combinaison de plusieurs phages, ou l'utilisation d'une solution hybride contenant de l'ammonium quaternaire et des phages, provoquera un effet synergique lors d'une désinfection de surfaces de type industriel (SS et PP). En deuxième lieu, nous supposons que l'utilisation d'un gel d'alginate comme support d'immobilisation dans un système d'inclusion de bactéries permettra de produire en continu et en grande quantité les particules virales tout en minimisant les risques liés aux manipulations. Le développement de cette nouvelle technique de production pourrait améliorer et encourager la mise en marché des



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

bactériophages, non seulement dans l'industrie agroalimentaire, mais également dans les secteurs médical et pharmaceutique. L'élaboration de nouveaux produits pouvant contourner la problématique croissante des résistances bactériennes aux antibiotiques, aux additifs alimentaires et aux désinfectants chimiques représente donc un enjeu capital pour la santé humaine, et cette lutte doit nécessairement passer par la connaissance des caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques du microorganisme, ainsi que par la compréhension de toutes ses stratégies d'invasion.

# REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1.2. *LISTERIA*

### 1.2.1. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* est un petit bacille à Gram positif, de 0,4 à 0,5 µm de diamètre et de 0,5 à 2 µm de longueur, faisant partie de l'embranchement des *Firmicutes*. Cette bactérie ubiquitaire est très résistante à diverses conditions environnementales hostiles. Elle est capable de proliférer dans différents biotopes comprenant les écosystèmes naturels, les denrées alimentaires, le tractus intestinal des animaux et les surfaces inertes. Les cellules peuvent survivre aux traitements de nettoyage-désinfection et ainsi persister, entre autres, dans les ateliers de production de l'industrie agroalimentaire. *L. monocytogenes* utilise notamment le glucose, le lactose et le rhamnose comme sources de carbone pour subvenir à ses besoins nutritionnels et énergétiques (Fieseler *et al*., 2012). Bien qu'elle possède un caractère aérobe prédominant, elle s'adapte assez facilement à un environnement anaérobe. Cet organisme pathogène halophile, non sporulé, est catalase positif et oxydase négatif (Brenner *et al*., 2006). *L. monocytogenes* sécrète une protéine, l'hémolysine, qui lyse les globules rouges (hématies) et provoque l'apparition de zones translucides autour des colonies se développant sur une gélose-sang. Cette bactérie possède des flagelles péritriches, au nombre de 2 à 5 par cellule, qui lui fournissent une certaine motilité. Le nombre de flagelles est optimal lorsque le microorganisme croît dans un milieu liquide maintenu entre 20 et 25 °C (Anses, 2011). Ces flagelles peuvent être absents lorsque le milieu ambiant est de 37 °C (Farber & Peterkin, 1991).

*L. monocytogenes* possède d'étonnantes capacités d'adaptation au chlorure de sodium. Elle est capable de croître en présence de 10 à 14 % de NaCl (Farber & Peterkin, 1991; Galdiero *et al*., 1997). Des études ont montré qu'elle pouvait même résister à d'importants stress salins pendant 20 heures, se développant dans des milieux ayant une concentration saturée de NaCl allant jusqu'à 40 % (Liu *et al*., 2005). La température optimale de croissance de *L. monocytogenes* est de 37 °C, quoiqu'elle s'adapte à des températures se situant entre 1 et 45 °C. Elle est parfois associée au type mésophile, avec un comportement souvent

psychrotrophe (Djenane *et al*., 2006). Cette bactérie, qui s'acclimate aux températures de réfrigération, se multiplie également en supportant des variations de pH allant de 4 à 9 (Lou & Yousef, 1999). *L. monocytogenes* est habituellement sensible à divers antibiotiques, dont l'ampicilline, la gentamicine, le chloramphénicol, la novobiocine, et elle résiste entre autres à l'acide nalidixique et à la polymixine B (Rocourt, 1991). Elle est détruite à des températures environnant les 60 °C (Afssa, 2000; Wagner & McLauchlin, 2008). En raison de son caractère hautement pathogène chez l'humain et les animaux, découlant de sa grande capacité d'adaptation en conditions de vie défavorables et de son habileté à envahir les cellules eucaryotes, *L. monocytogenes* représente une menace significative pour la sécurité alimentaire et, conséquemment, pour la santé humaine.

### 1.2.2. Historique

*L. monocytogenes* a été identifiée pour la première fois en 1926, à l'université de Cambridge, par Everitt George Dunne Murray, qui lui donna le nom de *Bacterium monocytogenes* à cause de sa capacité à lyser les monocytes (Murray *et al*., 1926). Elle a été détectée lors d'une épizootie chez des lapins. Elle fut renommée, quelques mois plus tard, *Listerella hepatolytica*, jusqu'à ce qu'on lui donne son nom actuel, *Listeria monocytogenes*, en 1940. Elle est restée, jusqu'en 1948, la seule espèce connue du genre *Listeria* et, à cette époque, elle était considérée comme une bactérie corynéforme. Plusieurs années plus tard, d'autres espèces, dont *L. denitrificans* et *L. murrayi*, se sont jointes à ce genre bactérien, mais toutes deux ont été retirées, la première ayant été reclassée dans le genre *Jonesia* et la deuxième ayant perdu, en 1973, son statut d'espèce à cause de sa très grande proximité génétique avec *L. grayi* (Rocourt, 1988). Une parenté entre les genres *Listeria* et *Lactobacillus* a été proposée en 1984 par la caractérisation partielle de l'ARN ribosomique 16S de *L. monocytogenes* (Seeliger & Jones, 1986). L'évolution et la précision des connaissances, ainsi que le perfectionnement des techniques en phylogénétique, ont permis et permettent encore de corriger des confusions causées, parfois, par la très grande proximité entre les genres et les espèces.

### 1.2.3. Classification

Il est maintenant convenu, grâce au séquençage de l'ARN ribosomique 16S des *Listeria*, que ces microorganismes sont plus proches des *Lactobacilles* que des bactéries corynéformes, avec une très grande proximité avec le genre *Brochothrix*. L'étude des *Listeria* est toutefois encore en pleine évolution. En 2017, le genre *Listeria* comprenait 17 espèces : ***Listeria monocytogenes*** (1926), ***Listeria ivanovii*** (1984), *L. grayi* (1966), *L. innocua* (1983), *L. seeligeri* (1983), *L. welshimeri* (1983), *L. marthii* (2010), *L. rocourtiae* (2010), *L. fleischmannii* (2013), *L. weihenstephanensis* (2013), *L. aquatica* (2014), *L. cornellensis* (2014), *L. floridensis* (2014), *L. grandensis* (2014), *L. riparia* (2014), *L. booriae* (2015) et *L. newyorkensis* (2015) (Weller *et al*., 2015). Encore aujourd'hui, seulement *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* sont considérées comme pathogènes, la première étant en mesure d'envahir facilement une très grande variété de cellules humaines et animales, et l'autre infectant principalement les cellules des ruminants, notamment les ovins et les bovins, et très rarement elle manifeste son potentiel infectieux chez l'humain (Chand & Sadana, 1999; Gill *et al*., 1997; Guillet *et al*., 2010, Vázquez-Boland *et al*., 2001). Les deux espèces sont β-hémolytiques et elles se distinguent l'une de l'autre notamment par la capacité qu'a *L. ivanovii* de fermenter le D-ribose (Bertsch *et al*., 2013; Johnson *et al*., 2004; McLauchlin & Rees 2009). En raison d'un cas relativement récent de méningite causée par *L. innocua*, il est à envisager que certaines souches de cette espèce puissent posséder des capacités de virulence (Favaro *et al*., 2014). L'étude des profils phylogénétiques et phénotypiques des nouvelles espèces récemment découvertes met en lumière des similitudes et des disparités entre les espèces, qui renforcent la nécessité de réévaluer la classification actuelle des bactéries appartenant au genre *Listeria*.

Ainsi, les données génétiques définissent clairement deux catégories de *Listeria*. Les ***Listeria sensu stricto***, au nombre de six, possèdent plusieurs facteurs de virulence dont les gènes sont regroupés à l'intérieur d'îlots de pathogénicité (Fig. 1.1; Tabl. 1.1) (Orsi & Wiedmann, 2016). Trois îlots ont été identifés chez les *Listeria* et leur contenu est variable selon l'espèce. Les principaux facteurs de virulence sont encodés sur l'îlot de pathogénicité nommé LIPI-1 et sont sous le contrôle d'une protéine régulatrice nommée facteur de régulation positive A (PfrA). On retrouve, outre le gène activateur de virulence p*rfA*, d'autres gènes codant pour

des phospholipases (PlcA, PlcB), pour une enzyme lytique (Hly), la listériolysine, et pour une métalloprotéase (Mpl) qui, avec la protéine ActA, jouent un rôle dans la polymérisation de l'actine, un constituant majeur du cytosquelette des cellules eucaryotes. Le deuxième îlot

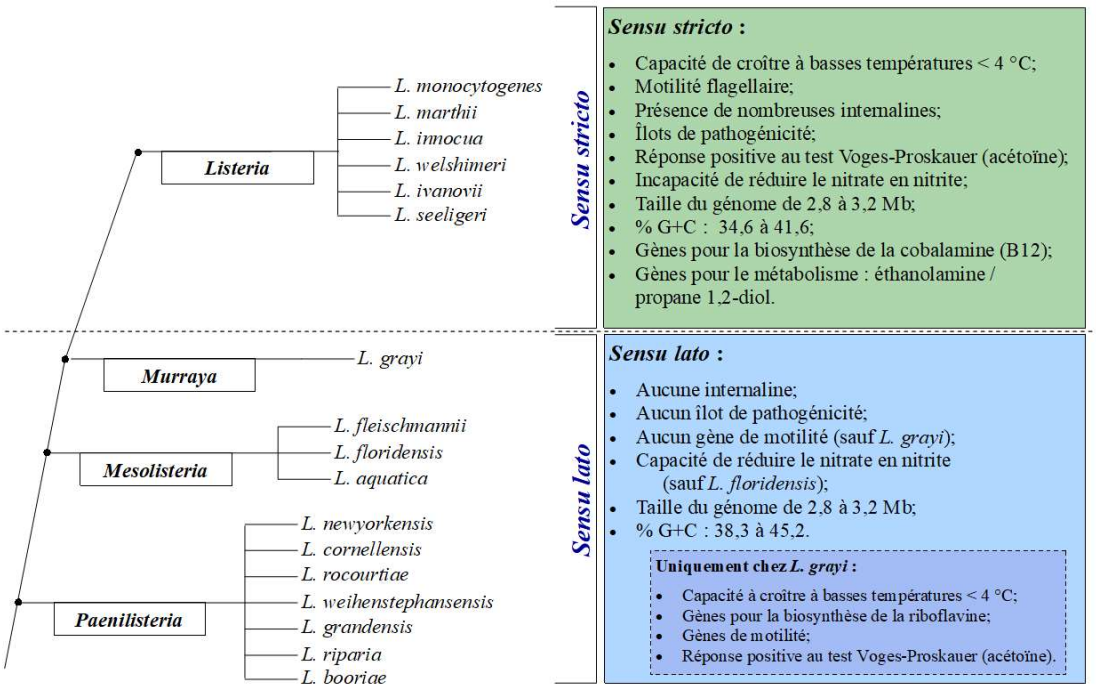



Figure 1.1. Arbre évolutif caractérisant les *Listeria sensu stricto* et *sensu lato*. (Adaptée de Orsi & Wiedmann, 2016)

(LIPI-2) contient des gènes codant pour plusieurs internalines, dont les InlA et InlB reconnue comme les clefs d'entrée dans les cellules hôtes. Ces internalines ont une influence capitale dans le caractère pathogène de *L. monocytogenes* car elles sont en mesure de provoquer une phagocytose induite suite à une internalisation chez des cellules non phagocytaires (Pizarro-Cerdá *et al*., 2002 et 2012). Sur l'îlot deux, on retrouve également un gène codant pour la protéine LntA, qui une fois produite vise le noyau et se fixe à la protéine BAHD1, responsable notamment de la compaction de la chromatine (Cossart, 2015a). Par cette fixation, la LntA prend le contrôle de la compaction de l'ADN et peut ainsi avoir une emprise sur l'expression des gènes. Dans le troisième îlot, un gène codant pour une bactériocine apparentée à celle produite par les streptocoques du groupe A a été identifié (*llsA*), et lorsque présent chez la bactérie, il intensifie sa virulence. Parmi les différentes espèces de *Listeria*, *L. monocytogenes* est celle qui représente la plus grande menace pour l'humain, puisqu'elle possède un grand nombre de facteurs de pathogénicité. La présence de l'ensemble des

Tableau 1.1. Contenu principal des îlots de pathogénicité chez *L. monocytogenes*.

| ***L. monocytogenes* Îlot 1 / LIPI1** | **Îlot 2 / LIPI2** | **Îlot 3 / LIPI3** |
|---|---|---|
| **PrfA** (protéine) :<br>Activateur ou répresseur de gènes. Régulateur transcriptionnel de virulence. | **InlA** (ligand-protéique) :<br>Internalisation surtout dans les cellules épithéliales (récepteur E-Cadhérine). | **LLS** (*llsA*)*<br>Listériolysine S |
| **Hly** (LLO) Listériolysine O :<br>(1) Liaison avec le cholestérol, création de pores sur la membrane et induction d'un déséquilibre ionique.<br>(2) Lyse des phagosomes.<br>(3) Fragmentation des mitochondries, fragilisation du système SUMO et modification des histones. | **InlB** (ligand-protéique) :<br>Internalisation surtout dans les cellules endothéliales et placentaires (récepteur C-Met). | |
| **PlcA** (Phospholipase) :<br>Lyse de la membrane du phagosome. | **InlC** : (ligand-protéique) :<br>Neutralisation des réponses immunitaires | |
| **PlcB** (Phospholipase) :<br>Précurseur de la phospholipase C. Lyse de la membrane du phagosome. | **LntA** : (ligand-protéique) :<br>Interférences avec des fonctions métaboliques de la cellule hôte. Fixation à la protéine BAHD1 dont l'un des rôles est la compaction de la chromatine. | |
| **ActA** (Polypeptide) : polymérisation de l'actine du cytosquelette, propulsion de la bactérie et MVT intracellulaire. | | |
| **Mpl** (Métalloprotéase) : dégradation de l'actine et croissance intracellulaire. | | |

*Bactériocine apparentée à celle produite par les streptocoques du groupe A.

caractères de virulence facilite sa capacité à voyager de cellule en cellule et renforce son habileté à se disséminer à travers les tissus et à envahir sournoisement un grand nombre de nos cellules. Les *Listeria sensu stricto* partagent d'autres caractéristiques communes, dont la capacité de croître à des températures inférieures à 4 °C, une motilité flagellaire (entre 10 et 25 °C), une incapacité à réduire le nitrate en nitrite et une réponse positive au test Voges-Proskauer, confirmant une capacité de produire de l'acétoïne à partir du glucose suivant le cycle du butanediol (annexe 1). Le pourcentage de G+C de ce groupe se situe entre 34,6 et

41,6 % et leur génome, variant de 2,8 à 3,2 Mb, est hautement synténique de par la conservation de l'ordre des gènes à travers les espèces apparentées (Orsi & Wiedmann, 2016). Les *Listeria sensu stricto* ont acquis, lors de leur évolution, des gènes permettant la biosynthèse de la cobalamine (vitamine B12) et l'utilisation de l'éthanolamine et du propanediol comme sources de carbone (Chiara *et al*., 2015). Finalement, on compte parmi les sucres qu'elles peuvent fermenter le D-arabitol, le α-méthyle D-glucoside, la cellobiose, le D-fructose, le D-mannose, le N-acétylglucosamine, le maltose et le lactose (McLauchlin & Rees, 2009; Orsi & Wiedmann, 2016).

Les ***Listeria sensu lato***, au nombre de 11 espèces, ont notamment comme caractéristiques communes : la capacité de transformer le nitrate en nitrite (sauf *L. floridensis*); aucun gène ne codant pour des flagelles, d'où leur absence de motilité (sauf *L. grayi*); aucun gène identifié associé à la production d'internalines. Chez ce groupe, le pourcentage de G+C se situe entre 38,3 et 45,2 % et leur génome varie de 2,8 à 3,2 Mb. Les *Listeria sensu lato* pourraient être séparées en trois taxons distincts : les *Paenilisteria* (presque *Listeria*), les *Mesolisteria* (incapacité à croître à des températures inférieures à 7 °C) et les *Murraya* (espèces très proches des *sensu stricto*) (Fig. 1.1) (Weller *et al*., 2015). La comparaison des séquences génomiques des *Listeria* et du nouveau genre proposé, *Murraya*, démontre un ANI inférieur à 73 %, validant le bien-fondé de créer un nouveau genre (Orsi & Wiedmann, 2016). *L. grayi*, à l'intérieur de ce genre, est très proche évolutivement des *Listeria sensu stricto*. Cette bactérie a fait l'acquisition de gènes la dotant d'une capacité à produire de l'acétoïne à partir du glucose. En plus d'un gain génétique relié à la motilité, elle a intégré un gène atypique qui lui est spécifique, celui de la biosynthèse de la riboflavine. L'identification et l'étude des *Listeria sensu lato* ont conduit à une meilleure compréhension de l'évolution des différents facteurs de virulence retrouvés chez *L. monocytogenes*.

### 1.2.4. Composition de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire de *L. monocytogenes* contient une forte concentration de peptidoglycane pouvant représenter 90 % de la structure, correspondant à une épaisseur de 15 à 30 nm et pouvant compter de 10 à 20 couches de polymères (Fig. 1.2). Cette caractéristique de la paroi est propre aux bactéries à Gram +. On note la présence d'acides téichoïques entrecroisés à

travers cette structure et contribuant à la fixation membranaire, ainsi que de divers glucides neutres, de quelques lipides et de phosphate (Seeliger & Jones, 1986; Delcour *et al.,* 1999). Le peptidoglycane et les acides téichoïques sont maintenues par des unités liantes contenant entre autres du glycérol (Fig. 1.3). Cet agencement biochimique, signature identitaire, assure notamment à la bactérie une protection mécanique contre la pression osmotique. Le peptidoglycane a une organisation structurelle charpentée de trois éléments principaux : un agencement successif de N-acétylglucosamine et de N- actétylmuramique, parties glucidiques reliée par des liaisons covalentes; une partie peptidique, dont la chaîne pentapeptidique et parfois tétrapeptidique est fixée directement à

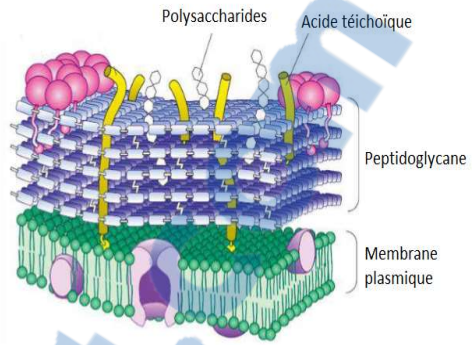



Figure 1.2. Schématisation de la paroi des bactéries à Gram +. (Adaptée de Delcour *et al.*,1999)

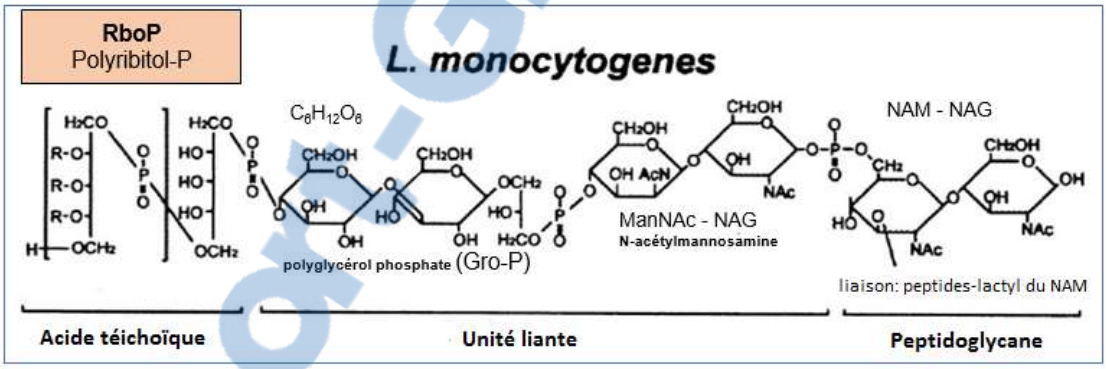



Figure 1.3. Structure détaillée de la paroi cellulaire de *L. monocytogenes*. (Adaptée de Navarre & Schneewind, 1999)

la molécule de N- acétylmuramique; finalement, un pont interpeptidique reliant directement le D-alanine à l'acide aminé non protéinogène, le Méso-Diaminopimélique (Fig. 1.4). Les liaisons interpeptidiques entre les acides aminés, D-Ala et M-DAP assurent la stabilité finale de la structure et cet agencement particulier caractérise la paroi cellulaire de quelques bactéries à Gram +, dont celles appartenant au genre *Listeria* (Navarre & Schneewind, 1999). L'intégrité des différents modules de ce système est vitale pour les cellules et une déstabilisation peut lui être fatale. Les acides téichoïques enchâssés dans cette architecture sont rattachés à divers carbohydrates spécifiques tels que le N-acétylglucosamine (GlcNAc),

Rapport-Gratuit.com

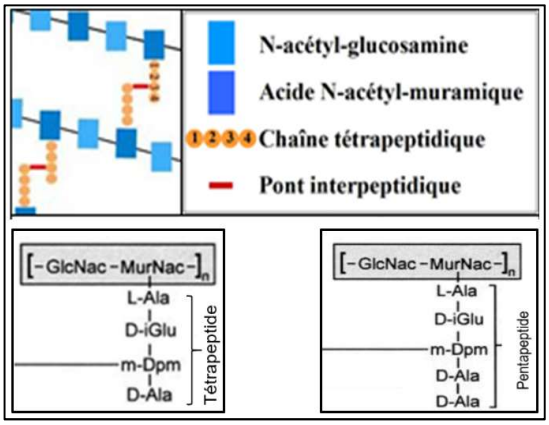



Figure 1.4. Ponts interpeptidiques reliant les acides aminés D-Ala et M-DAP chez *L. monocytogenes*. (Adaptée de Navarre & Schneewind, 1999)

le rhamnose (Rha), le glucose (Glc), ou le galactose (Gal). La grande variabilité des associations possibles entre le peptidoglycane, les acides téichoïques et les différents sucres est souvent responsable des caractéristiques des espèces et même des différences entre les sérovars (Eugster & Loessner, 2011). On retrouve en fait, chez les bactéries à Gram +, deux principaux types de paroi ayant des caractéristiques spécifiques.

En association avec le peptidoglycane, on peut retrouver des acides téichoïques constitués d'un résidu polyribitol lié par un lien phosphodiester (polyribitol-phosphate, RboP) ou d'un résidu de polyglycérol-phosphate (GroP). Des études démontrent que la paroi cellulaire de *L. monocytogenes* contient du polyribitol-phosphate (RboP) enchaîné d'unités de carbohydrates. Les acides téichoïques des sérovars du groupe 1/2a, par exemple, sont caractérisés par la présence de GlcNAc et de Rha sur la chaîne de polyribitol-phosphate ou par la présence de Rha uniquement (Eugster *et al*., 2011). Le sérovar 4 possède une structure d'acides téichoïques, pouvant être plus complexe, dans laquelle on retrouve du GlcNAc relié à la chaîne de polyribitol-phosphate pour le sérovar 4a et du GlcNAc en combinaison avec du Glc et du Gal pour le sérovar 4b (Fig. 1.5). La majorité des souches de *L. monocytogenes* isolées dans la nourriture et dans l'environnement appartiennent aux sérotypes 1/2a, 1/2b et

Figure 1.5. Structures moléculaires de la paroi de *L. monocytogenes* : Ribitol-phosphate lié à différents carbohydrates (exemples pour les sérovars 1/2a, 4a et 4b). (Tirée de Eugster *et al*., 2011)

4b et représentent plus de 95 % des souches épidémiques humaines identifiées dans des cas de listériose (Doumith *et al*., 2004; Pan *et al*., 2009). *A contrario*, les sérotypes 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4d et 4e sont, quant à eux, rarement impliqués dans les cas de listériose chez l'humain.

### 1.2.5. *Listeria* dans l'environnement

*L. monocytogenes* est une bactérie tellurique et saprophyte dont les niches environnementales sont très variées et comprennent tous les types de sols, les lacs, les plantes, la matière organique en décomposition, l'ensilage et les eaux d'égout. Tout comme pour plusieurs autres espèces bactériennes, les environnements humides favorisent son développement (Klausner & Donnelly, 1991). Ce microorganisme infectieux s'établit aisément dans l'intestin de différents animaux, notamment les ruminants, en raison de leurs sources de nourriture puisées directement du sol. Du fait qu'elle est un pathogène invasif qui s'adapte très rapidement aux changements physico-chimiques de l'environnement, elle représente une menace pour la santé humaine, principalement lorsqu'elle contamine les denrées alimentaires. Ses capacités d'adaptation étonnantes et ses nombreux facteurs de virulence sont au centre de nombreuses études.

### 1.2.6. Résistances aux contraintes environnementales et mécanismes

Contrairement à d'autres organismes pathogènes, les *Listeria* réussissent à croître dans des conditions environnementales parfois extrêmes. La tolérance dont elles font preuve envers les traitements thermiques, les variations de pH et de température, les agents de conservation et certains produits désinfectants remet en question les techniques employées pour les éliminer. Pour assurer leur survie, les bactéries sont en mesure de développer plusieurs mécanismes de résistance, contrôlés par divers niveaux d'expression des gènes (annexe 10). Parmi les stratégies de protection, modifier la configuration chimique de leurs protéines de surface leur permet d'empêcher la liaison d'éléments menaçants. Elles sont aussi capables de synthétiser des enzymes qui neutralisent ou dénaturent les substances nuisibles pour leur croissance. Ces enzymes bactériennes (hydrolases et réductases) réalisent des réactions biochimiques (clivage ou addition d'un groupement chimique) qui affaiblissent considérablement l'effet de l'antimicrobien (Muylaert & Mainil, 2012). Également, à



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

l'intérieur de quelques génomes bactériens, la présence de systèmes de restriction-modification ou de systèmes CRISPR-Cas, dont les enzymes patrouilleuses interceptent entre autres les acides nucléiques indésirables, est un mode de défense de plus en plus identifié chez plusieurs souches (Barrangou *et al*., 2007; Hain *et al*., 2012; Kuenne *et al*., 2013). Certains microorganismes vont, pour se protéger d'un agent agresseur, rendre imperméable leur membrane externe par la diminution des porines ou par l'expulsion de glycoprotéines adhérant à la surface externe de leur paroi et masquant, par le fait même, à la fois les molécules de surface et l'entrée des pores. L'utilisation d'un mécanisme de pompes moléculaires, protéines transmembranaires qui expulsent le produit toxique à l'extérieur de la cellule, est aussi une tactique pour assurer leur développement et leur survie en conditions hostiles et menaçantes (Courvalin, 2008; Nikaido, 1994). Les résistances qu'elles se sont constituées sont parfois le résultat de mutations dans un gène localisé dans le chromosome ou sur un plasmide. Elles peuvent aussi provenir : d'un phénomène de conjugaison impliquant l'échange de matériel génétique, souvent le partage de plasmides, par contact direct avec d'autres bactéries; d'un processus de transformation qui implique l'intégration d'ADN libre présent dans le milieu; ou d'un mécanisme de transduction impliquant un transfert d'ADN suite à une infection phagique. Ainsi, certains réarrangements génétiques peuvent engendrer diverses modifications métaboliques bénéfiques pour la croissance des bactéries dans des environnements défavorables.

Divers niveaux d'organisation et d'interaction peuvent aussi consolider l'adaptation à un environnement inhospitalier et conduire à l'établissement de colonies résistantes. En effet, de plus en plus d'études démontrent que des molécules spécialisées produites par les bactéries induisent des réactions synchronisées lorsque la densité cellulaire est élevée. Le quorum sensing représente un mécanisme de communication qui régule l'expression coordonnée de certains gènes bactériens au sein d'une même population, en vue d'une participation à la formation d'un biofilm par exemple. Les échanges d'information et la détection du quorum reposent sur la synthèse et la diffusion d'auto-inducteurs (Rieu *et al*., 2007). Ces molécules indiquent notamment aux bactéries l'état de densité de la population et entraînent des réactions collectives avantageuses pour leur protection et leur développement, telles que la production de glycocalyx ou la libération de toxines (Rieu *et al*., 2007).

### 1.2.6.1. Résistance à l'ammonium quaternaire

L'assainissement des surfaces occupe une place très importante en industrie agroalimentaire et, pour être optimale, cette étape doit avoir lieu après un nettoyage soigneusement réalisé puisque les souillures organiques et les débris alimentaires peuvent neutraliser l'activité des assainisseurs. Parmi les agents désinfectants chimiques utilisés dans les usines pour lutter contre *L. monocytogenes*, on retrouve des produits anioniques et cationiques. Les solutions anioniques (sulfates), qui possèdent un excellent pouvoir moussant et un faible pouvoir microbicide, sont utilisées principalement pour déloger des composés organiques présents sur les surfaces solides (FAO, 1993). Pour leur part, les solutions cationiques, dont l'hypochlorite de sodium, les iodophores et les ammoniums quaternaires, ont un réel pouvoir désinfectant. Afin d'éviter d'altérer les installations par la corrosion, l'emploi de ces produits chimiques dépend de la nature de la surface à désinfecter. Des études portant sur l'efficacité du chlore contre *L. monocytogenes* ont été réalisées et les résultats ont démontré que des concentrations de moins de 50 ppm n'ont pas d'effet antilistérial efficace (Brackett, 1987). On recommande pour ce produit et pour l'ammonium quaternaire, qui est largement utilisé en raison de sa nature non corrosive, des concentrations minimales de 200 ppm pour une élimination complète des germes lors des opérations de désinfection (Gaulin *et al*., 2011). Différents facteurs tels que la température, la pression et le pH doivent être considérés lors de l'assainissement de surfaces. L'ammonium quaternaire, l'iodophore et l'hypochlorite de sodium sont affectés par de trop hautes températures. Ce phénomène serait associé à l'instabilité de ces produits à la chaleur (Gélinas & Goulet, 1983). Le temps de contact des désinfectants influence aussi l'efficacité de l'assainissement et son prolongement améliore l'élimination des microorganismes (Gaulin *et al*., 2011).

Les cibles d'attaque des molécules désinfectantes chez *L. monocytogenes* sont variables, l'altération peut s'effectuer directement sur la membrane pour les ammoniums quaternaires ou sur les acides nucléiques pour les produits acides (Dupuis *et al*., 2002). Outre le fait que les bactéries peuvent posséder des résistances intrinsèques, l'exposition régulière aux agents chimiques provoque la sélection de souches résistantes qui ont acquis de nouvelles caractéristiques génétiques. Ce phénomène est de plus en plus observé et conduit à un plus grand nombre d'études soulignant l'augmentation des résistances de *L. monocytogenes* face

aux assainisseurs (Aase *et al*., 2000; Holah *et al*, 2002). On note désormais que pour venir à bout de ce pathogène, des concentrations élevées de produits chimiques, souvent irritants pour les voies respiratoires et la peau, sont nécessaires. Force est de constater que la progression des tolérances bactériennes requiert donc l'augmentation des concentrations de désinfectants. Le processus conduisant à la résistance débute par une réponse adaptative, qui se transforme en une tolérance, et ce phénomène repose sur des modifications génétiques et biochimiques associées à des stratégies comportementales découlant parfois d'une communication moléculaire.

Comme mentionné précédemment, les cas de résistance sont de plus en plus observés chez un grand nombre de bactéries et *L. monocytogenes* n'y fait pas exception (Aase *et al*., 2000). La problématique de récurrence de *L. monocytogenes* dans les usines de transformation des aliments, et les éclosions de listériose qui en dérivent, se résolvent notamment par l'emploi d'agents d'assainissement efficaces. Toutefois, cette bactérie, de mieux en mieux équipée pour croître suite à des périodes de nettoyage et de désinfection, a développé au fil des ans des résistances à l'ammonium quaternaire (Pan *et al*., 2006). En effet, de 10 à 46 % des souches de *L. monocytogenes* isolées de la nourriture ou des usines de transformation sont considérées tolérantes envers le chlorure de benzalkonium (Aase *et al*., 2000; Soumet *et al*., 2005). Comme les composés d'ammonium quaternaire sont régulièrement utilisés, non seulement dans les usines agroalimentaires comme assainisseurs sur les surfaces de travail pour éliminer les pathogènes, mais aussi dans le secteur hospitalier comme antiseptiques pour lutter contre les infections nosocomiales, la diminution de leur efficacité est donc préoccupante pour la santé publique. Dans ce contexte et en vue d'assurer une distribution d'aliments sécuritaires, il est nécessaire de bien connaître les défenses du pathogène afin de tout mettre en œuvre pour freiner son développement. Les mécanismes moléculaires qui déterminent l'augmentation de la tolérance des *Listeria* envers l'ammonium quaternaire ne sont pas entièrement élucidés. Des études portant sur *L. monocytogenes* et ses mécanismes de résistance envers les produits chimiques ont démontré que la bactérie s'adapte au benzalkonium chloré et aussi à l'acide anionique (Frank & Kooffi, 1990). Des pompes à efflux (MdrL et Lde) exportant activement des produits chimiques grâce à des transporteurs membranaires ont été identifiées chez *L. monocytogenes*. Ces protéines, souvent spécifiques

à une classe d'antimicrobiens, sont parfois actives contre plusieurs substances et peuvent *ipso facto* être responsables de résistances multiples. Le gène *mdrL* (Multi Drug Resistance), impliqué dans l'activation de la pompe, peut être d'origine plasmidique ou chromosomique (Romanova *et al*., 2002).

Selon des études réalisées sur la sensibilité de plusieurs souches de *L. monocytogenes* à l'ammonium quaternaire, la concentration minimale d'inhibition (CMI) pour le sérovar 1/2 est relativement élevée, et les chercheurs ont tenté de démontrer les liens possibles entre la présence de pompes à efflux et la résistance. Les souches étudiées possédaient le gène *mdrL*, et l'absence de plasmide pour certaines souches résistantes et le maintien de la résistance après le retrait des plasmides pour les autres amènent à conclure que la résistance à l'ammonium quaternaire n'est pas d'origine plasmidique pour les souches étudiées, mais pourrait être plutôt associée à des modifications subies au niveau de la paroi cellulaire (Mereghetti *et al*., 2000). D'autres études effectuées sur la présence de ces types de pompes, occasionnellement présents chez des souches de *L. monocytogenes*, indiquent toutefois que ces mécanismes sont partiellement responsables de l'adaptation au chlorure de benzalkonium. Les pompes protéiques (MdrL et Lde) sont aussi en mesure d'évacuer des antibiotiques et du bromure d'éthidium (EtBr), composé organique aromatique possédant un ammonium quaternaire (Godreuil *et al*., 2003; Mata *et al*., 2000). Les conclusions générales convergent toutefois vers le fait que la présence des gènes *mdrL* et *lde* ne peut être à elle seule responsable de la résistance de la bactérie envers les désinfectants, même si leur contribution est notable par une expression génique plus importante (Romanova *et al*., 2006; To *et al*., 2002). Les mécanismes d'altération et de restructuration qui s'opèrent sur la surface bactérienne lors des expositions aux produits chimiques peuvent, dans certains cas, procurer une protection n'ayant aucun lien avec les pompes à efflux. La résistance peut dériver d'une modification physicochimique de la structure, telle que la production de glycocalyx ou la réduction du nombre de porines. La capacité de former des biofilms en générant une couche protectrice de polymères limitant le contact direct des récepteurs bactériens avec le produit chimique ne doit pas être sous-estimée comme mécanisme de défense (To *et al*., 2002). Différents degrés de tolérance ont également été observés, en lien soit avec des modifications structurales de la membrane cellulaire réduisant la perméabilité, soit avec l'acquisition de

gènes de résistance (Casey *et al*., 2014, To *et al*., 2002). Une étude portant sur la caractérisation de plusieurs souches de *L. monocytogenes*, identifiées lors d'éclosions canadiennes entre 1988 et 2010, a révélé la présence de l'îlot LGI1 (*Listeria* genomic island 1), qui contient une combinaison de gènes de résistance à divers agents antimicrobiens (ammonium quaternaire et tétracycline), dont e*mrE*, impliqués dans la régulation des réponses aux stress environnementaux, ainsi que certains gènes de virulence (Gilmour *et al*., 2010). D'autres analyses confirment le lien entre la tolérance de *L. monocytogenes* à l'ammonium quaternaire et la présence du gène *emrE* (*e*rythromycin *r*ibosome *m*ethylase) dans l'îlot génomique LGI1. Les auteurs ont observé qu'en possession de ce gène, *L. monocytogenes* croît plus facilement en présence de ce produit que lorsque ce gène est absent et qu'ainsi, il confère à la bactérie un avantage de survie. La délétion de ce gène engendre une diminution de la concentration minimale d'inhibition (CMI) d'ammonium quaternaire (Kovacevic *et al*., 2015). Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour préciser davantage tous les éléments reliant ce gène à la résistance envers divers produits chimiques.

D'autres découvertes, dont celle du transposon IS*1216*, situé sur le plasmide pLM80 et contenant la cassette de résistance *bcrABC*, semblent confirmer l'implication de gènes précis dans le mécanisme de tolérance de *L. monocytogenes* envers l'ammonium quaternaire (Elhanafi *et al*., 2010). Un autre transposon intégré au chromosome, pouvant conférer à *L. monocytogenes* une résistance envers l'ammonium quaternaire, le Tn*6188*, a été observé chez plusieurs souches. Selon l'étude, les isolats identifiés contenant ce transposon provenaient d'aliments ou d'échantillons puisés dans des usines de transformation. Les souches possédant le Tn*6188* avaient une très haute CMI (28,5 ± 4,7 mg/l) en comparaison avec celles qui en étaient dépourvues (14 ± 3,2 mg/l). Une augmentation significative de l'expression du gène *qacH* (Quaternary Ammonium Compounds) en présence de chlorure de benzalkonium a été observée, majoritairement chez le sérovar 1/2a. La délétion du gène *qacH* a entraîné chez les souches mutantes de *L. monocytogenes* une diminution de la CMI, contrairement aux souches d'origine, et conférait une sensibilité accrue envers le chlorure de benzalkonium (Müller *et al*., 2013). Des gènes de même nature, le *qacA/B* et le *smr* (Small Multidrug Resistance), situés sur des plasmides et codant pour des pompes à efflux qui

confèrent une tolérance à l'ammonium quaternaire, sont aussi présents chez *Staphylococcus aureus* (Bjorland *et al*., 2003; Johnson *et al*., 2013). L'étude du rôle des pompes à efflux dans le mécanisme de résistance de *L. monocytogenes* envers les produits chimiques se poursuit et, de plus en plus, la tolérance se présente comme un phénomène qualifié de multifactoriel.

En raison de leur faible biodégradabilité et de leur toxicité, les produits chimiques affectent les écosystèmes des rivières et la santé des animaux (Thassitou & Arvanitoyannis, 2001). Une grande attention est désormais portée sur la diminution de l'emploi de produits chimiques nocifs pour éviter la pollution environnementale et pour réduire l'apparition de résistance bactérienne.

#### 1.2.6.2. Résistance aux antibiotiques

Depuis plusieurs années déjà, diverses études ont démontré que *L. monocytogenes* peut acquérir des résistances aux antibiotiques via le transfert de plasmides ou d'ADN libre provenant de différentes souches avoisinantes, par des processus de conjugaison ou de transformation (Flamm *et al*., 1984; Pérez-Diaz *et al*., 1982; Speer *et al*.,1992). Les résistances peuvent aussi survenir suite à des déplacements de transposons, fragments linéaires mobiles d'ADN, qui se remanient au sein du chromosome ou des plasmides présents (Muylaert & Mainil, 2012). *L. monocytogenes* demeure actuellement sensible aux antibiotiques tels que les pénicillines (pénicilline G, ampicilline) et les aminoglycosides (gentamicine), et elle est sensible aux quinolones de nouvelle génération (Davis & Jackson, 2009; McLauchlin, 1991; Vogel *et al*., 2006). Toutefois, de plus en plus de souches bactériennes impliquées dans des cas de méningites développent progressivement des résistances envers différentes familles d'antibiotiques, notamment celle des bêtalactamines régulièrement utilisée lors des traitements (Vogel *et al*., 2006). Même si actuellement les bêtalactamines sont encore efficaces contre plusieurs souches de *L. monocytogenes*, il n'est pas impossible que certaines puissent développer et élargir une résistance à la pénicilline par l'acquisition de plasmides codant pour la production de la β-lactamase, enzyme qui hydrolyse l'anneau β-lactame de l'antibiotique. Certaines souches de *L. monocytogenes* sont, depuis quelque temps, résistantes aux tétracyclines (Speer *et al*., 1992, Vela *et al*., 2001). Le gène de résistance *tet(*M) a d'ailleurs été identifié dans leur génome (Filiousis *et al.*, 2009). Un

isolat de *L. monocytogenes* possédant le gène de résistance à l'érythromycine, *erm*(C), un antibiotique de la famille des macrolides souvent utilisé lorsque les patients démontrent des allergies aux bêtalactamines, a été caractérisé (Filiousis *et al*., 2009; Roberts *et al*., 1996). D'autres études corroborent également l'acquisition de gènes de résistance chez *L. monocytogenes* envers la tétracycline et l'érythromycine (Ennaji *et al*., 2008; Granier *et al*., 2011). La bactérie est aussi résistante à la colistine, antibiotique de la famille des polymyxines (Ennaji *et al*., 2008). Ces bactéries tolèrent également l'acide nalidixique présent dans la formulation de milieux sélectifs (Fraser) utilisés pour son isolement. Cet agent chimique est employé à la fois comme antiseptique et désinfectant et est également considéré comme un antibiotique de la classe des quinolones (annexe 2). On constate qu'un grand nombre de souches de *Listeria* sont maintenant multirésistantes aux antibiotiques et ce phénomène évolue continuellement (Gamboa-Marin *et al*., 2013). Les traitements recommandés pour soigner une listériose demeurent l'association de l'ampicilline ou de l'amoxicilline avec un aminoside tel que la gentamicine (Hof, 1991; Krauss *et al*., 2003).

#### 1.2.6.3. Résistance aux phages

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués lors de l'apparition d'une résistance envers un phage. Parmi les processus, il y a la modification des récepteurs bactériens, qui peut empêcher l'adsorption, première étape de l'infection (Fister *et al*., 2016a et b). Le changement de configuration (*Z-E*) ou de conformation (chaise-bateau) des molécules présentes en surface, leur masquage ou leur élimination sont des astuces possibles et profitables chez les bactéries pour contrer les attaques phagiques. Comme mentionné précédemment, l'acide téichoïque, composant important de la paroi cellulaire de *L. monocytogenes*, est constitué d'un squelette de polyribitol-phosphate avec des ramifications glycosidiques. Ces ramifications jouent un rôle important lors des cycles d'infection par les phages. En effet, le N-acétylglucosamine (GlcNAc) et le rhamnose (Rhm), en association avec l'acide téichoïque, assurent la fixation de plusieurs listériaphages à la paroi cellulaire (Bielmann *et al*., 2015). Une déficience du N-acétylglucosamine chez une souche peut entraîner une incapacité pour les phages d'entreprendre une infection (Tran *et al*., 1999). Toutefois, certains listériaphages, dont le A118, peuvent parvenir à infecter la bactérie en se liant au rhamnose malgré une déficience en GlcNAc (Bielmann *et al*., 2015).

D'autres paramètres peuvent influencer la capacité ou l'efficacité d'un phage à infecter une bactérie et à finaliser son cycle lytique avec succès. Les basses températures peuvent affecter le processus d'infection de quelques phages sans même qu'il y ait de modifications des récepteurs, la raison pouvant être en lien avec l'inactivation de certaines enzymes (Kim & Kathariou, 2009).

Une résistance peut, par ailleurs, résulter de la présence d'un phage tempéré qui, en s'intégrant au génome bactérien, participe à l'élaboration d'un système de protection chez la bactérie. Ces prophages peuvent demeurer quiescents durant de très longues périodes avant que cet équilibre ne soit interrompu et que l'enclenchement d'un cycle lytique ne s'amorce (Ravat *et al*., 2015). Le processus de transduction spécifique peut conférer à la bactérie une protection contre les phages et même contre des agents antimicrobiens (Fister *et al*., 2016a et b). En effet, les phages tempérés codent pour une protéine spécialisée, l'intégrase, qui permet l'intégration du génome du phage au chromosome de la bactérie hôte, augmentant le risque de transfert de gènes (Klumpp, & Loessner, 2013). Le listériaphage tempéré A118 possède une intégrase et est capable d'effectuer la transduction. *A contrario*, les phages A511, P100, P35, P40 et P70, notamment, sont virulents, dépourvus d'intégrases et entrent dans le cycle lytique. Dans leur cas, du fait que la terminase reconnaît une séquence spécifique sur l'ADN et que cette reconnaissance, fixe et invariable, est cruciale pour l'empaquetage de l'ADN, ces phages ne peuvent transmettre des gènes de virulence provenant de la bactérie elle-même (Klumpp & Loessner, 2013). Toutefois, même si la lysogénisation observable avec le phage A118 conduit à une résistance envers les autres A118 environnants, la bactérie peut demeurer vulnérable à d'autres types de phages (Loessner *et al*., 1991b). Aucune évidence ne démontre que l'empaquetage de l'ADN de ce phage se ferait par les mécanismes « *cos* ou *pac* ». Du fait qu'aucun de ces sites n'a été identifié, le processus de compaction utilisé dans son cas serait celui de la tête pleine avec production d'extrémités redondantes (Loessner *et al*., 2000). Comme le phénomène de transduction est observable chez les phages tempérés et que ce processus peut engendrer le transfert de facteurs de virulence par intégration de gènes, un important prérequis pour l'application biotechnologique des phages est la sélection de particules ayant un caractère virulent strict, notamment les phages appartenant aux genres P100 et P70.



Rapport-Gratuit.com

Finalement, la présence de gènes codant pour des enzymes de restriction, protéines capables de couper un ADN étranger, figure aussi parmi les moyens d'élimination des phages au sein des bactéries. Des systèmes d'exclusion de bactériophages (Brex), dont le mécanisme repose non pas sur la coupure de l'ADN phagique mais sur la méthylation de l'ADN de l'hôte, peuvent rendre impossible la réplication du virus. Des analyses panmicrobiennes révèlent qu'environ 10 % des génomes séquencés possèdent un système de cassette anti-phages de type Brex capable d'ajouter un groupement méthyle en cas de besoin. La découverte de ce type de mécanisme chez les bactéries est de plus en plus fréquente. Toutefois, certaines familles de phages ont déjà développé des mécanismes anti-Brex qui contournent les protections établies par les bactéries hôtes (Goldfarb *et al*. 2015).

#### 1.2.6.4. Système CRISPR-Cas

Le CRISPR-Cas est un dispositif de ciseaux génétiques défini comme de courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées (clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated proteins). Cet agencement de modules, lorsque présent, se comporte comme un système immunitaire ou comme un système de défense évolutif (Makarova *et al*., 2011). Cette immunité acquise est détectée dans 40 % des bactéries séquencées cumulant, chez ces organismes, les traces des attaques du passé (Lier *et al*., 2015). Le principe du CRISPR-Cas repose sur la capacité qu'ont certaines bactéries de s'approprier une section de l'ADN phagique ou des sections de plasmides contenant, par exemple, des résistances à des antimicrobiens et de les intégrer à leur génome. Ces bouts d'ADN étrangers s'insèrent entre les CRISPRs et représentent des documents de référence qui permettent à la bactérie de reconnaître la présence d'un éventuel assaillant (Barrangou *et al*., 2007). À partir de ce répertoire, un ARN complémentaire lié à une enzyme, une nucléase (Cas), identifie et coupe l'ADN du phage lors de son injection dans le cytoplasme bactérien. Un possible système CRISPR-Cas a été identifié chez les *Listeria*. Des loci ont été localisés chez différentes souches. Le locus I a été repéré chez les *L. monocytogenes* sérovars 1/2a et 4b et chez *L. innocua*, tandis que le locus II a été identifié chez le sérovar 4b. Toutefois, seulement quelques souches possèdent les gènes Cas (Hain *et al*., 2012; Kuenne *et al*., 2013). La distribution des espaceurs laisse supposer que les ancêtres de certaines souches ont perdu les

gènes Cas au cours de leur évolution. Aucune corrélation entre la présence de ce système de défense et la résistance des *Listeria* envers les bactériophages n'a encore été véritablement établie (Kuenne *et al*., 2013). *Ex adverso*, les phages, ayant la capacité d'évoluer et de s'adapter, ont conçu un moyen de contrer les défenses installées à travers les systèmes CRISPR-Cas de leurs hôtes. Des protéines anti-CRISPRs, qui bloquent le système CRISPR-Cas, peuvent être produites par le phage et leur rôle consiste à fermer l'interrupteur pour le CRISPR en se fixant à l'enzyme Cas, évitant le clivage de l'ADN phagique (Fig. 1.6). Différents anti-CRISPRs inhibent le système CRISPR-Cas de *Neisseria meningitidis* (Pawluk *et al*., 2016). En étudiant davantage ce processus, il est possible d'envisager la création de molécules anti-CRISPRs pouvant être artificiellement intégrées dans l'ADN d'un phage dans le but de déjouer le système de protection de la bactérie, le cas échéant.

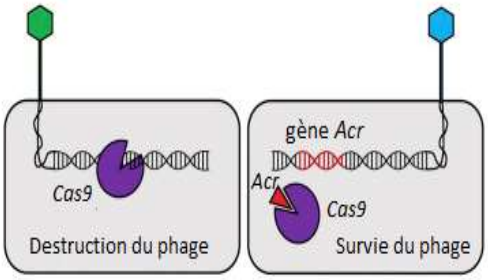



Figure 1.6. Inactivation d'un CRISPR-Cas par un anti-CRISPR phagique. (Tirée de Pawluk *et al*., 2016)

### 1.2.6.5. Adhésion aux surfaces - formation de biofilms

Dans l'environnement des usines de transformation alimentaire, il existe une multitude de matériaux pouvant abriter des organismes bactériens. Certains types de matière sont peu favorables à la colonisation bactérienne. C'est le cas de l'acier inoxydable (SS), qui est généralement utilisé pour les surfaces qui sont en contact direct avec les aliments. On reconnaît à ce matériel une inertie chimique en plus d'une facilité de nettoyage et de désinfection notamment en raison du nombre réduit d'interstices en comparaison avec d'autres types de surfaces. Les égratignures et les fissures sont en effet d'excellents refuges pour les microorganismes et le nettoyage de ces encavures est souvent très difficile. Les matériaux de plastique, en particulier le polypropylène (PP), quoique plus ductiles, sont aussi fréquemment utilisés en industrie alimentaire. Ils servent surtout pour les surfaces venant en contact avec les outils tranchants. Ces matières plastiques ont une bonne inertie face aux produits chimiques, une absence de corrosion et une excellente imperméabilité. Le



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

caoutchouc est aussi un matériau souvent retrouvé, principalement pour les joints d'étanchéité. La cinétique de fixation des bactéries à ces trois types de surfaces dépend à la fois des caractéristiques physiques de ces supports et de leurs propriétés chimiques, dont la charge électrique, le degré d'hydrophobicité et le niveau d'énergie libre. Ces facteurs ont une influence déterminante sur le taux d'adhésion (Briandet *et al*., 1999). En industrie alimentaire, les employés manipulant des produits contaminés par *Listeria* peuvent transporter les germes via le contact de leurs mains sur les objets solides. Des études démontrent que *L. moncytogenes* peut survivre plus d'une heure sur la surface des doigts humains. Le nettoyage des doigts à l'aide de savon n'est pas suffisant pour éliminer tous les germes bactériens. Par contre, l'utilisation d'une solution de chlorhexidine gluconate dans le méthanol serait très efficace pour déloger les *Listeria* présents sur les doigts (Snelling *et al*., 1991).

Il est reconnu que la croissance des bactéries sur les interfaces air-liquide, air-solide et aux jonctions liquide-solide peut provoquer l'apparition de biofilms bactériens et ce phénomène a été identifié avec de nombreuses bactéries, dont *L. monocytogenes.* Cette bactérie, en adhérant aux surfaces, sécrète des polysaccharides extracellulaires induisant la formation de biofilms (Jeong & Frank, 1994; Takahashi *et al*., 2010). Ce phénomène peut entraîner la production de toxines bactériennes en fortes concentrations. Les bactéries, en sécrétant des polymères, donnent aux biofilms une texture visqueuse fortement adhérente qui atténue l'activité d'un désinfectant. À l'échelle microscopique, les biofilms bactériens forment une matrice dont l'architecture assure une stabilité à la colonie par la rétention d'une grande variété d'enzymes qui facilitent la dégradation et l'assimilation des ressources nutritives. L'agglomération, formée de multicouches, procure de nombreux avantages aux cellules regroupées et immobilisées en augmentant notamment leurs capacités métaboliques. Contrairement à un mode de vie planctonique, où elles sont davantage exposées à des situations de vulnérabilité, la vie bactérienne dans une structure de biofilms est plus fréquente dans la nature (Flemming *et al*., 2016). En effet, les bactéries proliférant dans des milieux naturels sont presque toutes fixées à un support solide (Gauthier & Isoard, 1989). L'intérieur d'un biofilm représente pour les bactéries une forteresse où ont lieu diverses réactions, telles que des mutations génétiques, des phénomènes de chélation, de la dégradation enzymatique

accélérée et des processus de dilution, qui conduisent à l'augmentation de la tolérance des bactéries envers les produits antimicrobiens. En plus de bénéficier d'un protectorat contre les agressions extérieures, les cellules réunies profitent d'une plus grande hydratation, d'une moindre exposition au stress, d'une économie d'énergie ainsi que d'un système de communication chimique plus rapide grâce à leur proximité. La forte concentration bactérienne, la croissance principalement sessile et la sécrétion d'exo-polymères conduisent à la formation d'un biofilm stable, qui diminue grandement l'efficacité des produits de nettoyage et de désinfection (Flemming *et al*., 2016).

On s'aperçoit que les bactéries contenues dans les biofilms possèdent des propriétés différentes de celles vivant librement. Une augmentation de la ténacité à survivre, entre autres en raison d'une meilleure protection envers les agents toxiques et les conditions défavorables, est un avantage pour les bactéries et ce phénomène a été constaté chez *L. monocytogenes* (Frank & Kooffi, 1990). Étant donné que *L. monocytogenes* peut former des biofilms autant sur des surfaces biotiques qu'abiotiques, sa présence dans le secteur agroalimentaire est donc reconnue comme un problème notoire (Da Silva & De Martinis, 2013). L'adhérence de ce pathogène à une surface est considérée comme la première étape d'une colonisation. La fixation qui occasionne, dans plusieurs cas, des problèmes lors de l'assainissement industriel débute par une adhésion qui précède un ancrage stable et difficilement réversible. L'attachement réversible implique des forces, dites faibles (types van der Waals et électrostatiques), qui dépendent de la distance entre les bactéries et le support (Marshall, 1992; Strevett & Chen, 2003; Takahashi *et al*., 2010). À cette étape, les attractions cellulaires sont facilement affaiblies par les forces hydrodynamiques d'un liquide moussant, par exemple, mais, progressivement, des forces plus importantes se créent, telles que des liaisons hydrogènes et covalentes. Les liaisons irréversibles sont des interactions de très courtes distances qui impliquent des niveaux d'énergie élevés et dès lors, les cellules, pour être délogées, doivent être soumises à des chocs physiques ou chimiques plus intenses capables de rompre les liaisons en jeu (Brandger *et al*., Goulter *et al*., 2009). D'autres facteurs induisant l'adhésion bactérienne ou s'y opposant peuvent être impliqués dans la formation de biofilms, notamment, la présence de minéraux mono ou bivalents ainsi que l'acidité et la température du milieu (Gauthier & Isoard, 1989).

Les matières hydrophobes n'établissant aucune liaison hydrogène avec l'eau (téflon, polypropylène et caoutchouc) assurent, en général, une fixation bactérienne plus importante que les composés ioniques, tels que les matériaux hydrophiles, chargés positivement (platine) ou encore ceux chargés négativement (verre et plastique) (Gauthier & Isoard, 1989). Le caractère hydrophobe ou hydrophile du germe lui-même peut influencer l'adhésion à divers types de surfaces (Rosenberg, 1984). Des travaux relatent, par exemple, que *Staphylococcus aureus* et certains entéropathogènes (*E. coli*) s'adsorbent aux surfaces grâce à leur caractère hydrophobe (Jonsson & Wadström, 1983; Zhao & Sen, 2012). L'adhérence de *L. monocytogenes* à l'acier inoxydable, au verre, au polypropylène et au caoutchouc a été observée dès les années 90 (Mafu *et al*., 1990). Selon les études, les *Listeria* adhéreraient aux surfaces dans un temps de 20 minutes et indépendamment de la température (4 °C ou 21 °C).

Par ailleurs des travaux sur l'étude des propriétés bactériennes de *L. monocytogenes* démontrent que cette bactérie possède un caractère hydrophile (Briandet *et al*., 1999; Mafu *et al*., 1991). Toutefois, en présence d'acide lactique, *L. monocytogenes* deviendrait plus hydrophobe, augmentant son potentiel de fixation à l'acier inoxydable (Brandger *et al*., 2007). En théorie, le polypropylène et le caoutchouc, en plus d'être des surfaces irrégulières et relativement poreuses, offriraient de meilleures caractéristiques physicochimiques pour l'adhérence des microorganismes que le verre et l'acier inoxydable. Les énergies libres d'interface du polypropylène et du caoutchouc sont inférieures à celles du verre et de l'acier inoxydable. De plus, *L. monocytogenes* offre plus de résistance aux agents assainisseurs lorsqu'elle contamine des surfaces de polypropylène et de caoutchouc que dans le cas des surfaces de verre et d'acier inoxydable (Mafu *et al*., 1991; Roy *et al*., 1993). Cependant, *L. monocytogenes* adhère tout aussi facilement aux surfaces à faible ou grande énergie libre (Mafu et *al*., 1991). Au final, plusieurs facteurs peuvent influencer l'adhésion des bactéries aux surfaces, et la vision d'un système de communication à travers des sociétés bactériennes vient enrichir la compréhension des processus reliés à la formation de biofilm.

### 1.2.6.6. Communications bactériennes (QS-DS-ES)

Les processus conduisant à la formation de biofilms peuvent dépendre de systèmes de communication passant par des signaux chimiques. Le phénomène d'échange de molécules de communication, conduisant à des activités bactériennes concertées en vue de former des biofilms lorsque la densité microbienne atteint un certain seuil, est étudié dans un système appelé quorum sensing (QS). Ce système d'échange d'information d'origine bactérienne repose sur la synthèse et la diffusion de molécules simples ou de signaux électriques dans certains cas. Le QS serait un mécanisme de synchronisation de l'expression ou de la répression de gènes, au sein d'une population bactérienne, en fonction de la densité cellulaire. Des recherches ont fait ressortir que lorsque les molécules de communication se retrouvent à une concentration témoignant d'une densité cellulaire critique, elles induisent des mécanismes provoquant des activités coordonnées chez un grand nombre d'individus. En fonction de la densité cellulaire et des bénéfices apportés à la population, le QS peut induire la formation du biofilm ou l'activation de facteurs de virulence (Parsek & Greenberg, 2005). Le QS est influencé par plusieurs facteurs abiotiques de l'environnement, tels que les paramètres physico-chimiques suivants : le pH, la température et la fluidité, qui stabilisent ou inhibent la communication (Kirisits & Parsek, 2006).

Le diffusion sensing (DS), de son côté, représente une stratégie non coopérative faisant intervenir aussi des signaux moléculaires utilisés, cette fois-ci, principalement pour évaluer la dimension de l'espace et la concentration du milieu. Dans ce concept, les bactéries, parfois de façon individuelle et dans un objectif indépendant d'un groupe, utiliseraient les molécules pour évaluer l'espace environnant afin de mesurer si l'énergie nécessaire pour produire des métabolites (exo-enzymes ou autres) est rentable dans la situation environnementale dans laquelle elles se retrouvent. Cette théorie n'implique pas la contribution des autres bactéries et part du principe que la bactérie « évalue », à l'aide des molécules-signal, si la zone qui l'entoure assurera une concentration adéquate des substances qu'elle s'apprête à sécréter pour atteindre un effet souhaité. Dans le DS, l'objectif est de mesurer la concentration de substances à libérer pour effectuer une action efficace et bénéfique pour la cellule en dépensant le moins d'énergie. Le DS est indépendant de la densité cellulaire et n'implique aucune interaction sociale. La libération de molécules dans le but d'un QS ou d'un DS est un

processus non relié et peut varier de façon indépendante dans le milieu. (Hense *et al*., 2007). L'efficiency sensing (ES) combinerait l'existence du QS et du DS pour expliquer les communications bactériennes, l'expression des gènes pouvant être régulée à la fois par l'un ou l'autre des modèles pour enclencher une virulence, une adaptation, une adhérence, un transfert de gènes ou la production d'enzymes ou de bactériocines (Turovskiy *et al*., 2007). Lors de l'efficiency sensing, les bactéries recueillent à la fois des données sur la densité et la distribution cellulaires, ainsi que sur les limites de diffusion influant sur les substances qu'elles veulent libérer. Le QS et le DS sont des processus pouvant être étroitement liés et dépendants des conditions environnementales.

Les échanges d'information moléculaires qui régissent les communications sont liés à des signaux appelés « auto-inducteurs ». Il existe de nombreuses molécules de communication cellulaire appartenant au système du QS. Bien que, souvent, les molécules utilisées pour communiquer dépendent de l'espèce bactérienne, il est toutefois possible de classer ces systèmes de communication en trois grandes catégories. Le système de communication de type 1 utilise les N-acyle homosérine lactones (NAHL), identifiés auto-inducteurs 1 (AI- 1). Ce premier système de diffusion d'information moléculaire est souvent relié aux signaux chimiques émis et captés par des bactéries à Gram négatif. Le deuxième système d'échange de type 2, observé à la fois chez les bactéries à Gram + et à Gram -, utilise des molécules dérivées des furanones, identifiées auto-inducteurs 2 (AI-2), sous le contrôle du gène *LuxS*. Il est admis que ces molécules sont dites universelles et induisent des communications inter-espèces (Garmyn *et al*., 2009). Les AI-2 ne seraient pas des signaux de communication utilisés par les bactéries du genre *Listeria*, aucun récepteur de ces molécules n'a encore été identifié chez ce genre (Garmyn *et al*., 2009). Le troisième système (type 3), utilisé par les bactéries à Gram +, implique une communication via des peptides linéaires ou cycliques dont les voies de synthèse sont aussi dépendantes du gène *LuxS*. Les auto-inducteurs sont souvent perçus par des récepteurs protéiques intracellulaires ou membranaires (Keller & Surette, 2006). Deux gènes reliés aux systèmes de communication ont fait l'objet de plusieurs études chez différentes espèces bactériennes : *comX* (Competence X) et *agr* (Accessory gene regulator).

Des analyses réalisées sur *L. monocytogenes* démontrent que le gène *comX* est absent du génome, mais que quatre gènes du système *agr* sont présents (Garmyn *et al*., 2009, Rieu *et al*., 2007). L'implication de ces quatre gènes identifiés *agrBDCA* a été étudiée afin de situer leur influence dans la virulence de *L. monocytogenes*. La délétion de *agrA* et *agrD* entraîne une déficience dans les capacités d'adhérence de la bactérie sur le verre, le polypropylène et l'acier inoxydable. Le segment *AgrD* serait un gène précurseur de peptides auto-inducteurs (AIP) et les voies de biosynthèse de ces molécules restent à être davantage détaillées (Garmyn *et al*., 2009). Le système de communication Agr procure des bénéfices aux populations de *L. monocytogenes* et les signaux émis déclenchent des réponses chez les cellules réceptrices. Toutefois, il est difficile de savoir si ce système représente un trait social de la population (Vivant *et al*., 2014). Le rôle du système de communication Agr, dans le mécanisme de virulence de *L. monocytogenes*, via de petits peptides, a aussi été étudié à l'aide d'une souche mutante (Δ*agrD*). Les résultats ont démontré une diminution des capacités d'invasion des bactéries dans des cellules épithéliales intestinales suite à la délétion du gène *agrD*. La mutation au niveau du gène D (Δ*agrD*) provoque un affaiblissement de l'internalisation (InA) et démontre l'importance du système Agr dans l'intensité de la virulence (Riedel *et al*., 2009).

Chez les bactéries du genre *Listeria*, le système AgrA serait impliqué dans un réseau complexe de régulation chargé de la coordination de l'expression des gènes pour une adaptation optimale de la bactérie aux conditions environnementales (Garmyn *et al*., 2009). Les variations des facteurs environnementaux provoquent des changements dans l'expression des gènes, permettant ainsi aux bactéries de s'adapter et de survivre en conditions extrêmes (Gandhi & Chikindas, 2007). Le système Agr fait partie d'une organisation de communication, mais l'hétérogénéité de son expression durant la formation d'un biofilm ne correspond pas à la définition du QS, le phénomène d'échange se rapprocherait davantage à la théorie du diffusion sensing. Des questions demeurent quant au fait que les signaux produits par les bactéries impliqueraient peut-être un besoin d'évaluer la concentration dynamique du milieu plutôt que la nécessité d'une réponse concertée (Turovskiy *et al*., 2007). Puisque de nombreux facteurs influencent l'évolution adaptative, les deux théories (QS et DS) servent d'assises pour l'explication d'un système de

communication visant la survie de la population. Les avantages reliés aux interactions moléculaires sont donc bénéfiques à la fois pour la bactérie seule et pour la colonie. Tout bien considéré, les échanges d'informations et les signaux favorisent, selon plusieurs études, l'adaptation aux conditions environnementales chez un grand nombre de bactéries.

### 1.2.6.7. Traitements thermiques

Même si *L. monocytogenes* tolère certains chocs thermiques, ce germe ne résiste pas à la pasteurisation. Ce procédé de conservation des aliments consiste à chauffer les aliments à une température donnée, variant entre 62 °C et 88 °C, durant une durée déterminée et à refroidir brusquement par la suite. Il est admis que *L. monocytogenes* est fortement affectée lorsqu'elle est soumise, de façon prolongée, à une température de 60 °C. Un chauffage de plusieurs minutes détruit la population microbienne totale de *Listeria* présente dans le lait (Donnelly & Briggs, 1986; Donnelly *et al*., 1986). Dans les cas où *Listeria* a été détectée dans le lait pasteurisé, la contamination était due aux manipulations post-pasteurisation. Désormais, l'utilisation d'une pasteurisation à hautes températures (vers 75 °C) ou à basses températures (vers 65 °C) varie selon le type d'aliment. En général, le lait pasteurisé est maintenant traité à 72 °C pendant 15 à 30 secondes avant de subir un refroidissement rapide. Ce type de pasteurisation-éclair est une méthode de plus en plus utilisée pour les jus de fruits et de légumes, la bière et quelques produits laitiers, car il assure une meilleure conservation de la couleur et du goût des produits. La consommation de lait UHT, dont les paramètres de températures et de temps d'exposition sont fixés entre 140 °C et 150 °C pendant 2 à 5 secondes, n'occasionne aucun risque de transmission de la listériose (Styles *et al*., 1991). Quant à l'entreposage des aliments à basses températures dans des systèmes de réfrigération, si le produit contient de faibles concentrations de *Listeria*, la croissance de ces germes sera très peu affectée, contrairement aux autres bactéries qui seront plus fortement affaiblies.

### 1.2.6.8. pH et agents de conservation

Augmenter l'acidité des aliments en réduisant le pH peut nuire à la croissance des bactéries. La tolérance des *Listeria* envers les variations de pH dépend de la température du milieu ambiant. L'activité de l'eau ($A_w$) du produit et la présence de certains types d'acides, l'acide

acétique notamment, influencent la croissance de *L. monocytogenes*. Il est connu, depuis plusieurs années, que les *Listeria* peuvent croître dans des milieux acides et basiques variant de 4 à 9 sur l'échelle pH. La bactérie survit à un pH de 4,3 si la température est maintenue à 30 °C, par exemple, et à un pH de 5,0 si la température est de 4 °C (Buchanan & Klawitter, 1990). L'inhibition de *L. monocytogenes* dans les aliments est à son maximum lorsque l'on combine un pH < 4,4 et un $A_w$ < 0,92 ou un pH < 5,0 avec un $A_w$ < 0,94 et une concentration de NaCl supérieure à 16 % (CCA, 2009).

La croissance de *L. monocytogenes* dans les produits transformés contenant différents additifs alimentaires est une preuve tangible que cet organisme a développé des tolérances à plusieurs agents de conservation. Le nitrite de sodium, qui est un agent bactériostatique utilisé principalement dans les produits carnés, serait efficace contre *L. monocytogenes* seulement sous certaines conditions (Buchanan & Klawitter, 1990). L'activité antilistériale des nitrites serait amplifiée par la combinaison de certains paramètres physico-chimiques : température basse (1-4 °C), pH acide (5,5-6,0), concentration de sel d'au moins 4,5 % et concentration basse en oxygène. L'exploitation de bactériocines, telles que la nisine et la divergicine M35, produites respectivement par *Lactococcus lactis* et *Carnobacterium divergens*, permet un meilleur contrôle des *Listeria* (Santé Canada, 2016). L'utilisation des bactériophages, des endolysines ainsi que des bactéries lactiques comme antimicrobiens naturels pour la conservation de divers produits est aussi en plein essor et leur combinaison sous forme de mélanges est à l'étude.

### 1.3. Listériose : portrait de la situation mondiale, épidémiologie et recensement

La listériose est une anthropo-zoonose souvent indirecte, puisqu'elle est parfois transmise de l'animal à l'homme via les produits alimentaires (Czuprynski, 2005). Les symptômes de cette infection apparaissent le plus souvent entre 3 et 30 jours après la consommation des aliments contaminés, et parfois même jusqu'à 70 jours (Anses, 2011). Considérant que *L. monocytogenes* serait capable de créer des foyers intracellulaires dormants chez l'humain ou l'animal (Buchanan *et al*., 2017; Kortebi *et al*., 2017), un portage asymptomatique chez les cellules hôtes pourrait expliquer pourquoi la période d'incubation de la listériose est

Rapport-Gratuit.com

parfois longue et pourquoi il est difficile de retracer les produits impliqués ou d'évaluer précisément le nombre de personnes infectées. Les schémas épidémiologiques impliquant *L. monocytogenes* sont souvent en relation avec le sol. Par contact direct avec les cours d'eau, les lagunes et les herbes pouvant abriter ce pathogène, les animaux, y compris l'humain, deviennent porteurs. L'écoulement des eaux souillées le long des terrains transmet les bactéries à de nouvelles surfaces et le cycle recommence. Les terrains ainsi contaminés assurent la survie et la multiplication de *L. monocytogenes*. D'autres intermédiaires peuvent complexifier le cycle épidémiologique originant du sol, entre autres la contamination des végétaux récoltés et de la chair animale préparée, qui est responsable de la présence du microorganisme dans les aliments de consommation et qui conduit à plus de 90 % des cas de listériose humaine. Le cycle contient donc des embranchements pouvant amener l'organisme pathogène dans différents secteurs, tels que les industries de transformation des aliments et les centres de distribution de denrées, les établissements de restauration ainsi que les foyers privés et les hôpitaux (Fig. 1.7). Les contaminations fécales provenant d'humains et d'animaux, ainsi que les insectes, vecteurs de germes, peuvent contribuer à l'élargissement du cycle. Il serait aussi possible d'envisager que les *Listeria* puissent contaminer l'humain et les animaux par des accès aux voies respiratoires (poussières) ou par le contact direct avec une blessure ou avec les régions orbitales. Toutefois, aucun cas n'a été signalé en ce sens. Vu l'étendue des problèmes causés par la présence des *Listeria* dans l'environnement et les nombreuses épidémies recensées dans le monde, plusieurs pays, dont le Canada, les États-Unis, et la France, se sont entendus à la fin des années 80 pour établir un plan de surveillance en se communiquant les informations relatives aux listérioses. Ce système de contrôle a permis, d'une part, d'évaluer la fréquence de la maladie dans quelques régions et, d'autre part, de connaître les liens entre la consommation des denrées contaminées et l'apparition de l'infection chez l'humain. Aujourd'hui, les données microbiologiques et épidémiologiques démontrent bien que la source principale des cas de listériose est de nature alimentaire. *L. monocytogenes* est donc détectée dans une très grande variété d'aliments et

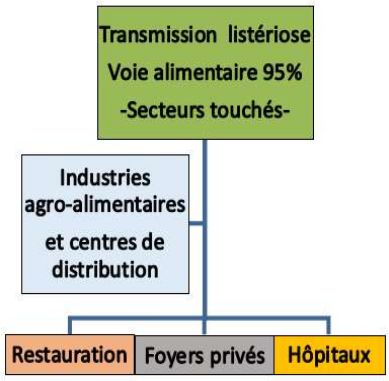



Figure 1.7. Secteurs touchés : cas de listériose.

elle demeure responsable de graves éclosions de listériose dans divers pays (Food Safety News, 2014; Fretz *et al*., 2010b; Gouv. Can., 2016). Cette infection fait désormais souvent l'objet d'un recensement annuel et les instances gouvernementales, qui régissent le contrôle de la qualité des aliments et qui veillent à la sécurité alimentaire, sont maintenant en mesure de mieux évaluer les variations du nombre de cas reliés à cette intoxication.

En général, le taux de mortalité, qui varie de 20 à 30 %, se maintient ou est à la hausse annuellement dans les pays industrialisés, malgré toutes les mesures mises en place pour assurer l'élimination de ce microorganisme dans le secteur agroalimentaire. Au Canada, les cas de listériose répertoriés ont légèrement augmenté au cours des années (annexe 3). Plusieurs pays européens ont également fait mention de hausses annuelles des cas de listériose déclarés et ont renforcé leur niveau de surveillance. À l'échelle canadienne, les cas de listériose sont soumis à une déclaration obligatoire qui stipule que les cas de listériose invasive doivent faire l'objet d'un suivi de déposition. On rapporte annuellement 150 cas en moyenne, dont une quarantaine de décès, contre 1600 cas aux États-Unis pour 260 décès (Gouv. Can., 2016) (Tabl. 1.2). La première éclosion de listériose canadienne d'envergure,

Tableau 1.2. Moyennes annuelles : cas de listérioses. (Can., É.-U., Allem. et France)

| Listériose / recensement | Canada 36 M | États-Unis 325 M | Allemagne 83 M | France 67 M |
|---|---|---|---|---|
| | •150 cas<br>•40 décès | •1600 cas<br>•260 décès | •500 cas<br>•138 décès | •315 (250-380)<br>•63 décès |

- SC : Santé Canada. www.hc-sc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011
- InVS : Institut de veille sanitaire. http://invs.santepubliquefrance.fr/
- CNR : Centre national de référence des *Listéria* (Institut Pasteur). www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux
- ECDC : European center of disease prevention and control. http://ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx
- EFSA : Agence européenne pour la sécurité des aliments. http://www.efsa.europa.eu/fr
- EPA : United States Environmental Protection Agency. https://www.epa.gov/
- FDA : Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/
- USDA : Department of Agriculture. https://www.usda.gov/
- RKI : Robert Koch Institute. http://www.rki.de/EN/Content/Institute/institute_node.html

qui a suscité une prise de conscience des liens directs impliquant cette intoxication et la consommation d'aliments contaminés, a eu lieu en 1981, en Nouvelle-Écosse, dans les Maritimes. Les infections ont été provoquées par l'ingestion de salade de chou contaminée et



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

ont entraîné 41 cas d'infection déclarés, menant à 17 décès. En 2008, une autre éclosion majeure a eu lieu, celle-ci directement reliée à la consommation de viandes de charcuterie PAM produites dans deux chaînes de production d'une usine de Toronto (ACIA, 2008). Cette contamination a affecté 56 consommateurs et causé la mort de 21 d'entre eux (Ministère de la santé Ont., 2008). Au Québec, la listériose est une infection à déclaration obligatoire et une cinquantaine de cas y sont déclarés à chaque année (Gouv. Qc., 2016). La politique canadienne du contrôle de ce microorganisme repose sur une collaboration entre trois grands paliers : Santé Canada (SC), l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) et l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC). Santé Canada élabore et établit, en collaboration avec l'ACIA, les normes en matière de salubrité des aliments, et les deux fournissent également, avec l'ASPC, des services d'analyse en laboratoire, tout en effectuant des enquêtes sur la salubrité des aliments. Ces organismes s'assurent que les industries alimentaires respectent les balises fixées concernant la salubrité alimentaire et qu'elles appliquent les normes du système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (HACCP). Cette méthode préventive d'assurance de la salubrité, recommandée par la Commission du *Codex Alimentarius*, organisation internationale de normalisation des Nations Unies pour la salubrité des aliments, permet de guider, de corriger et de prévenir, entre autres, les dangers biologiques d'origine alimentaire tout au long des processus de production (CCA, 2009). L'élaboration d'un programme de surveillance nommé FoodNet Canada, anciennement connu sous le nom de C-EnterNet, permet, d'autre part, d'effectuer le suivi des maladies, dont celles en lien avec tous les agents pathogènes d'origine alimentaire (ASPC, 2013).

Aux États-Unis, *L. monocytogenes* est devenue une vraie préoccupation pour l'industrie agroalimentaire à partir de 1985, après une éclosion de listériose en Californie à la suite de la consommation de fromage dont le lait avait été inadéquatement pasteurisé. C'est au cours de cette période que la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis a établi des règles de surveillance de ce pathogène et que les spécialistes de l'époque ont commencé à proposer qu'une tolérance zéro soit fixée afin d'assurer la sécurité des consommateurs. En Italie, en Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande), en Autriche et en Chine, le seuil de tolérance du nombre de germes est aussi fixé à zéro UFC/25g d'aliment (Lupo, 2014). La

USFDA (U.S. Food and Drug Administration) et le USDA (U.S. Department of Agriculture), qui imposent le seuil de tolérance de zéro *Listeria* dans tous les aliments destinés à la consommation humaine, soulignent que cette norme stricte permet de protéger certaines personnes à risque, telles que les femmes enceintes, les personnes âgées et les individus immunodéprimés. Cependant, cette exigence soulève beaucoup d'opposition puisque tous les aliments crus peuvent naturellement porter les germes. Ainsi, lorsqu'un aliment ne subit aucun traitement thermique sévère avant ou après transformation, le produit fini devient une source de contamination potentielle. La listériose est, aux États-Unis, une maladie à déclaration obligatoire depuis l'année 2000 et la surveillance s'effectue via le réseau FoodNet (Foodborne Diseases Active Surveillance Network) en collaboration avec le Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2003).

Du côté économique, l'industriel confronté à la contamination de ses produits par la *Listeria* étant susceptible de subir des pertes économiques énormes, il doit tout mettre en œuvre pour éviter la présence ce pathogène indésirable et souvent récidivant. Aux États-Unis, par exemple, en 2013, l'estimation des coûts relatifs aux éclosions de listériose s'est élevée à plus de 2,8 milliards de dollars en soins de santé et d'hospitalisation (USDA, 2013) (Fig. 1.8). Du côté canadien, selon une étude, les pertes encourues lors de l'éclosion de listériose de 2008 ayant impliqué le rappel de 220 produits et provoqué la mort de plusieurs personnes se

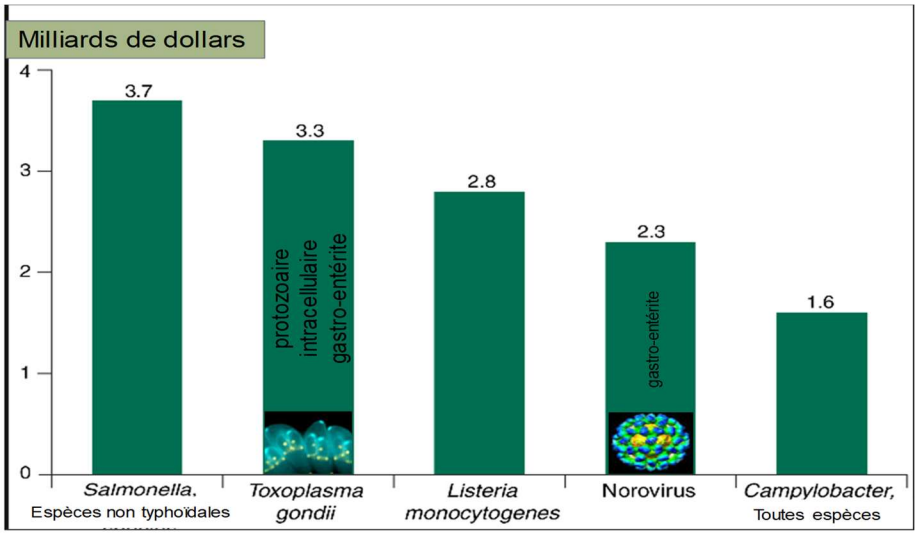



Figure 1.8. Coûts annuels estimés pour les maladies causées par les cinq principaux pathogènes alimentaires aux États-Unis. (Adaptée de USDA, 2013)

chiffrent à environ 77 millions de dollars pour l'entreprise à elle seule (arrêt de la chaîne de production, rappel des produits à risque, frais de décontamination, publicité, etc.) (Thomas *et al*., 2015). Incluant ces pertes, selon la même étude, les coûts totaux se sont élevés à plus de 240 millions de dollars (détection et inspections, soins de santé, frais associés aux décès, coûts pour l'entreprise). Des politiques de resserrement du contrôle des *Listeria* ont été établies dans l'industrie alimentaire canadienne par Santé Canada, l'ACIA et l'ASPC, notamment en 2011, avec un renforcement des inspections. Au Canada et dans plusieurs pays européens, dont la France et l'Allemagne, les organismes gouvernementaux suggèrent de recenser et d'effectuer des mesures correctives ou préventives pour les aliments contaminés par *L. monocytogenes* à partir d'une détection de 100 UFC/g d'échantillons (annexe 4) (Santé Canada, 2011).

En Europe, plusieurs pays possèdent des laboratoires de référence pour la surveillance de la listériose (Afssa, 2000; De Valk *et al*., 2005). En France, la listériose humaine est une maladie à déclaration obligatoire, depuis 1998. Le système de surveillance français repose donc, depuis vingt ans, sur la compilation d'informations via une fiche de déclaration obligatoire qui fournit des renseignements notamment sur les symptômes, sur les aliments consommés et sur l'âge du patient atteint de listériose. Les souches prélevées sont souvent analysées directement dans les laboratoires hospitaliers, lieu du prélèvement, mais également analysées au Centre National de Référence (CNR) des *Listeria*, situé à l'Institut Pasteur de Paris, qui collabore directement avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). L'Anses, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, dirige également plusieurs laboratoires d'analyse alimentaire de référence pour l'Union européenne. Selon cet organisme, plus de 300 cas de listériose, en moyenne, sont enregistrés en France à chaque année. D'autres pays emboîtent le pas en matière de déclaration obligatoire des cas de listériose. On peut penser à l'Allemagne et à la Russie, qui en ont fait une maladie à déclaration obligatoire depuis l'année 2000. Également, Hong Kong a établi, depuis 2008, l'obligation de signaler l'apparition de cette infection directement à son centre de protection de la santé publique (CHP, 2010). En 2016, des données annualisées de l'ASPC faisaient ressortir que *L. monocytogenes*, même si moins fréquente que d'autres pathogènes (notamment *Campylobacter* et *Salmonella*), entraînait le deuxième plus haut nombre de

décès et le plus haut taux de mortalité (Tabl. 1.3). Toujours aux États-Unis, en 2011, selon une étude aussi faite pour le compte du CDC, *L. monocytogenes* arrive première concernant les taux d'hospitalisation parmi d'autres pathogènes reconnus comme causant des toxi-infections alimentaires (Fig. 1.9) (Scallan *et al.*, 2011).

Tableau 1.3. Moyennes annuelles des infections mortelles causées par *L. monocytogenes* : comparaison avec d'autres bactéries pathogènes. (ASPC, 2016)

| Pathogène | Infections | Décès | % mortalité |
|---|---|---|---|
| *Campylobacter spp.* | 145 000<br>Hospitalisations<br>565 | 5 | < 1 |
| *Salmonella* | 88 000<br>Hospitalisations<br>925 | 17 | < 1 |
| ***L. monocytogenes*** | 178<br>Hospitalisations<br>150 | 35 | **20 %** |

C'est donc en raison du haut niveau de mortalité et des nombreux recours aux soins de santé que la présence de *L. monocytogenes* est considérée comme un important problème de santé publique. Le fait qu'un aliment contenant des bactéries du genre *Listeria* ne présente aucune altération visible ou odeur spécifique crée parfois un faux sentiment de sécurité et empêche le consommateur de suspecter la contamination du produit (CDC, 2003). Il arrive, rarement, que les personnes en bonne santé soient gravement touchées par une listériose. Et fait à noter, près de 4 à 20 % de la population humaine possède une flore intestinale comportant certaines bactéries du genre *Listeria* (Rocourt,1989).

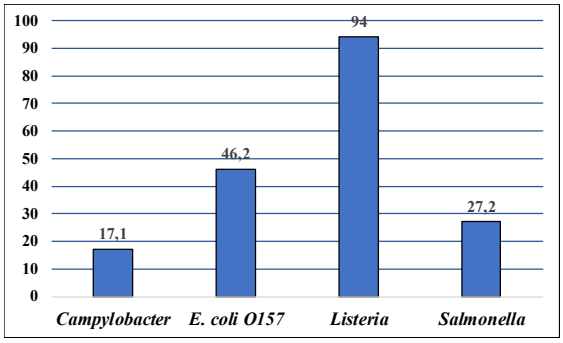



Figure 1.9. Taux (%) estimés d'hospitalisations causées par différents pathogènes. (Données sources: Scallan *et al*., 2011)

### 1.3.1. *Listeria* dans les aliments

La présence de *L. monocytogenes* dans le secteur agroalimentaire affecte les produits de consommation et, ultimement, la santé humaine. Élucider les cycles de propagation et identifier rapidement sa présence est un enjeu primordial pour contrer les éclosions tout en évitant les pertes pour les entreprises concernées. La surveillance de *L. monocytogenes*, qui a d'abord porté sur les produits laitiers, s'est rapidement étendue aux produits carnés, aux produits marins et aux végétaux. Pour assurer un contrôle efficace des *Listeria* dans les aliments, un suivi est requis non seulement avant la mise en marché des produits, mais aussi durant toutes les étapes de la transformation.

#### 1.3.1.1. Les produits laitiers

Les produits laitiers sont souvent incriminés dans les cas de listériose humaine. Un fait à constater est que le lait cru contient sporadiquement de fortes concentrations de *Listeria*. Certains fromages fabriqués à partir de lait cru sont donc susceptibles de contenir un nombre relativement élevé du bacille pathogène. En effet, le niveau de *Listeria* présent dans des fromages contaminés naturellement peut atteindre jusqu'à $10^7$ UFC/g (Farber & Peterkin, 1991). Les fromages à pâte molle sont des milieux propices à la croissance des *Listeria*, contrairement aux fromages à pâte ferme. En plus d'être exposé aux risques de contamination de la matière première, le fromage subit de nombreuses étapes de transformation qui ont peu d'impact sur la destruction de ce germe. Ainsi, les *Listeria* peuvent aisément survivre lors du saumurage et de la maturation de plusieurs variétés de fromages. Le potentiel de croissance de cet organisme, dans les fromages de type Brie, Feta et Camembert, a déjà été démontré (Genigeorgis *et al*., 1991). Cependant, le dénombrement des *Listeria* dans le fromage de type parmesan décroît linéairement et plus rapidement que dans les autres variétés de fromages (Yousef & Marth, 1990). On constate encore aujourd'hui des cas de mortalité par ingestion de fromage abritant *L. monocytogenes*. À cet effet, en août 2008, le ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec (MSSS) annonçait une éclosion de listériose sur le territoire québécois et le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) est intervenu par des rappels massifs des fromages concernés. Plus de 300 détaillants ont procédé à l'élimination de tous les fromages visés (Protecteur du citoyen,

2009). Durant les années 2009-2010, en Autriche, en Allemagne et en République Tchèque, du fromage cottage « Quargel » a été responsable de 34 cas d'infection dont 8 décès (Fretz *et al*., 2010a et b).

Des études ont mis en évidence que les composantes du lait peuvent fournir une protection aux bactéries contre les fluctuations thermiques. *L. monocytogenes,* soumise à une congélation en présence de différents composants laitiers, dont le lactose, la caséine et les matières grasses, démontre un taux de viabilité cellulaire plus élevé que lors d'une congélation ordinaire. La présence de ces éléments diminue le point de congélation des cellules en suspension, atténue la forme et la dimension des cristaux de glace et réduit ainsi le taux d'éclatement des cellules (EL-Kest & Marth, 1991). D'autres produits laitiers transformés, notamment diverses variétés de mayonnaise à base d'œufs et de crème, ont fait l'objet d'études microbiologiques et ont confirmé que *L. monocytogenes* peut survivre dans ce type de produits (Glass & Doyle 1991). *Listeria* peut également se développer dans le beurre, la crème glacée ainsi que le yogourt. En 2015, une éclosion de listériose originant de la consommation de crème glacée a eu lieu aux États-Unis, une dizaine de personnes ont été hospitalisées et deux en sont décédées (Pouillot *et al*., 2016). La facilité qu'a *Listeria* de survivre et de se multiplier dans les produits laitiers démontre que l'industrie laitière doit se méfier des contaminations par cette espèce bactérienne.

#### 1.3.1.2. Les produits carnés

La croissance des *Listeria* dans les produits carnés dépend de plusieurs facteurs, dont le pH, le type de tissu et la flore microbienne initialement présente (Glass & Doyle, 1989). Plusieurs cas de listériose impliquant l'ingestion de jambon, de poulet, de porc et de saucisses contaminés ont été rapportés aux États-Unis, au Canada, au Royaume-Uni et dans de nombreux autres pays. Par leur $A_w$ élevée, ces aliments sont d'excellents milieux pour le développement de *L. monocytogenes*. La pathogénicité de *L. monocytogenes* pour les animaux domestiques ou sauvages est bien connue, puisque les listérioses animales ont été les premiers cas rapportés d'infection. D'ailleurs, les animaux d'élevage sont les plus fréquemment touchés en raison de leur contact direct avec le sol et les plantes, et ils

représentent en plus d'excellents foyers de propagation de par leur proximité. Du fait que *L. monocytogenes* est résistante à la congélation, aux concentrations élevées de sel, aux nitrites et aux acides, et qu'elle peut également se développer à de basses températures et dans des milieux peu oxygénés tels que les paquets de viande emballée sous vide, les produits carnés représentent un vecteur important de transmission de la listériose. Par ailleurs, les bovins, les porcins, les caprins, les volailles et les ovins peuvent tous représenter, dès leur entrée dans une usine en vue de l'abattage, une source de contamination. Ces animaux peuvent être des porteurs sains de *Listeria* et ils sont souvent mis en cause lors de la contamination du personnel, du matériel et des surfaces de travail.

Les contaminations animales peuvent être soit agoniques (dissémination des germes lors de l'abattage), soit *post mortem* (contamination durant la préparation des carcasses). Souvent, une contamination superficielle des carcasses est responsable de la propagation microbienne dans les ateliers de découpe ou les chambres d'entreposage. Même si, en général, la contamination est présente en surface de la viande, dans certains cas l'intérieur des muscles peut être infecté (Johnson *et al*., 1990). Les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b sont les plus souvent détectés dans ce type de produit et les plus propices à transmettre la listériose chez les humains. Ils sont toutefois les plus sensibles aux infections phagiques (Klumpp & Loessner, 2013; Ward *et al.*, 2004). Les produits transformés de la viande, auxquels on ajoute des agents antimicrobiens comme le lactate de potassium ou de sodium, deviennent des matrices moins propices à la prolifération de *L. monocytogenes* (ILSI, 2005). De plus en plus populaires, les antimicrobiens de nature biologique, qui entraînent une baisse du pH, sont désormais approuvés et appliqués dans divers produits. En effet, des bactéries lactiques produisant des acides lactique ou propionique sont utilisées fréquemment dans les produits carnés. L'utilisation de bactériocines fait aussi partie de la bio-artillerie antimicrobienne (Berry *et al*., 1991; Tahiri *et al*., 2004; Veskovic-Moracanin & Martinovic, 2006), et l'application de bactériophages est maintenant de plus en plus autorisée. Des inhibiteurs naturels, tels que de la poudre de céleri (source de nitrite) et du vinaigre (acide acétique), peuvent aussi être ajoutés aux produits transformés. Malgré toutes les précautions, les produits de la viande sont souvent liés à des éclosions de listériose.

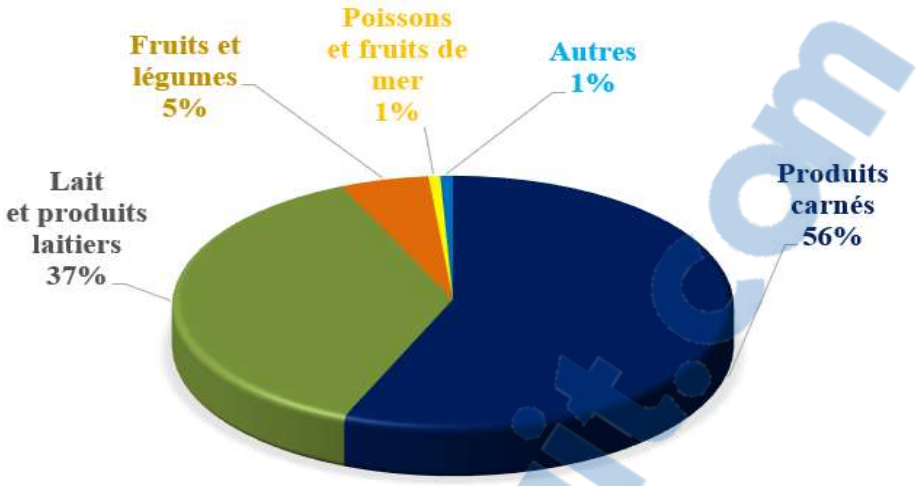



Figure 1.10. Pourcentage des produits alimentaires incriminés dans des cas de listériose invasive de 1980 à 2010 (Amérique, Europe, Australie et Nouvelle-Zélande). (Données sources, Santé Canada, 2011)

Selon une compilation des aliments ayant causé des cas de listériose sur une période de 30 ans, les produits carnés sont de loin, avec plus de 50 % des cas, les produits les plus à risque de transmettre la maladie en raison de différents facteurs incluant la grande consommation mondiale de ces denrées (Fig. 1.10). Les produits de la viande transformée de la catégorie prêts-à-manger sont en effet très populaires et largement consommés dans les pays industrialisés. Bien que des niveaux de contamination se situant entre $10^4$ et $10^5$ UFC/g aient déjà été rapportés dans les produits carnés, les concentrations généralement détectées sont de l'ordre de 100 à $10^3$ UFC/g. Une étude australienne réalisée sur 175 échantillons de viandes emballées sous vide, obtenus d'un marché d'alimentation, a démontré que plus de 93 produits étaient contaminés par *Listeria* et plus de 1000 UFC/g de *L. monocytogenes* ont été détectées dans sept des échantillons (Grau & Vanderlinde, 1992). Le comportement de *L. monocytogenes*, lors de la fabrication de saucisses de type Frankfurters emballées sous vide, a été étudié et les résultats ont démontré que les étapes de transformation, comprenant une fermentation, entraînent une diminution de la population bactérienne par un facteur de deux log. Suite à une contamination *in vitro*, le compte initial est passé de $10^6$ à $10^4$ UFC/ml en fin de fabrication (Bunčić *et al*.,1991). Cette constatation démontre toutefois que les étapes de transformation ne permettent pas d'exterminer *L. monocytogenes* dans le produit, à moins d'une contamination initiale très faible. Le poulet peut également être un excellent substrat pour les *Listeria*. Les sérovars bactériens impliqués dans la contamination de ce type

Rapport-Gratuit.com

d'aliment sont les mêmes que pour les autres types de viandes. Une analyse comparative a démontré que *Pseudomonas fluorescens* est inhibée plus efficacement que *L. monocytogenes* dans le poulet entreposé sous atmosphère modifiée (Marshall *et al*., 1991). En 2002, aux États-Unis, plus de 45 personnes ont été infectées par *L. monocytogenes* après la consommation de dinde tranchée (charcuterie) et 10 décès ont été confirmés (CDC, 2002). Comme mentionné précédemment, au Canada, en 2008, une problématique similaire a eu lieu après que 56 personnes ayant consommé de la viande de charcuterie ont été contaminées par le germe et que de ce groupe, 21 personnes sont décédées. Le rapport officiel de l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC) a confirmé que les produits en cause étaient des produits de viandes prêts-à-manger traités dans les installations de Maple Leaf en Ontario et que, de toutes les provinces, l'Ontario a été la plus touchée, avec 41 des cas de maladie et 16 décès (Ministère Santé Ont., 2008). Cette éclosion a suscité un immense intérêt médiatique et représente encore aujourd'hui un cas de santé publique d'envergure auquel on se réfère. En juillet 2010, Santé Canada diffusait un rappel d'aliments incluant de la dinde transformée et autres produits carnés (saucisse, bœuf et jambon) contenant ou pouvant contenir *L. monocytogenes* et ayant été distribués dans plusieurs provinces canadiennes (Gouv. Can., 2010). Plus récemment, au Danemark, en 2014, 38 personnes ont été contaminées par *L. monocytogenes* suite à la consommation de produits de charcuterie contaminés. De ce nombre, 15 personnes sont décédées (Food Safety News, 2014). Des études révèlent que plusieurs souches isolées, à même les produits carnés, sont résistantes à certains antibiotiques (Yücel *et al*., 2005).

#### 1.3.1.3. Les produits marins

Plusieurs études, effectuées dans divers pays, portant sur la croissance de *L. monocytogenes* dans les produits de la mer, ont démontré que ces denrées sont hautement susceptibles d'abriter le bacille pathogène. La présence de *L. monocytogenes* a été confirmée dans une très grande étendue d'aliments marins. Une étude américaine réalisée sur 57 échantillons, comprenant des crevettes, du crabe, des queues de homards, du poisson et du surimi à base de fruits de mer, a conduit à l'identification de 15 prélèvements positifs à *L. monocytogenes* (Weagant *et al*., 1988). La consommation de poisson cru (sushi) ou légèrement fumé, par

exemple, peut être responsable de cas de listériose. Ces produits non cuits et non traités, peuvent transmettre rapidement la maladie. De plus, l'entreposage de ces denrées à 4 °C ne retarde pas la croissance du bacille comme celle d'autres espèces contaminantes. On observe aussi que la croissance des *Listeria* dans le saumon fumé entreposé à 4 °C est extrêmement rapide (Guyer & Jemmi, 1991). Le microorganisme se développe durant la transformation du produit et sa multiplication se poursuit lors de l'entreposage.

Aux États-Unis, en 2004, des études ciblant quatre entreprises de transformation de poissons fumés ont confirmé la présence de *L. monocytogenes* en moyenne dans 3,8 % des échantillons de poissons crus et dans 12,8 % des échantillons provenant directement des ateliers et du personnel lui-même (Thimothe *et al*., 2004). Une étude sur la présence de *L. monocytogenes* dans une autre usine américaine produisant des filets de poisson frais révèle que sur 315 échantillons, plus de 21 % étaient positifs à ce pathogène (Chen *et al*., 2010). Un grand nombre d'échantillons de produits marins fumés et marinés (377) ont été analysés lors d'une étude suisse et, parmi la variété d'aliments inspectés, 47 produits étaient contaminés par *L. monocytogenes* (Jemmi, 1990). De multiples études mettent au jour des contaminations élevées et souvent récurrentes ou persistantes des produits de la mer. En Espagne, en 2001, du poisson fumé analysé (truite et saumon) a révélé la présence de *L. monocytogenes* dans 22,3 % des échantillons prélevés (Dominguez *et al*., 2001). En Islande, en 2005, un échantillonnage effectué dans des entreprises de transformation de saumon fumé à froid a démontré que plus de 11 % des écouvillons prélevés dans l'atelier, sur le personnel, dans la matière première et dans les produits finis confirmaient la présence *L. monocytogenes* (Gudmundsdottir *et al*., 2005). Au Brésil, en 2008, une équipe de chercheurs a démontré que de la matière première infectée par *L. monocytogenes* contribue au maintien du cycle de contamination des produits de la mer qui sont mis sur le marché (Cruz *et al*., 2008). Elle a également mis en évidence d'autres sources de contamination telles que les couteaux, les tapis de convoyeurs, les bassins de saumurage et aussi le personnel de travail. En Irlande, en 2010, des analyses révèlent la présence de la bactérie dans 24,5 % des échantillons provenant d'une usine de production de saumon fumé, et elles ont aussi mis en évidence que la matière première est souvent impliquée dans l'origine d'une contamination par *L. monocytogenes* (Dass *et al*., 2010). Finalement, en septembre 2016, du saumon



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

sauvage fumé distribué dans les provinces canadiennes et contaminé par la bactérie *L. monocytogenes* a été rappelé par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA, 2016b). Toutes les analyses bactériennes réalisées depuis plus de trente ans sur divers produits marins mettent en évidence que ces denrées alimentaires véhiculent régulièrement *L. monocytogenes*. Le développement de nouvelles mesures préventives pour limiter et contrôler la présence de *L. monocytogenes* demeure essentiel dans ce secteur agroalimentaire. Diverses études ont été réalisées afin de déterminer quelles sont les origines de la contamination des produits de la pêche par ce microorganisme. Les principales sources de contamination sont souvent reliées directement à la matière première, à une contamination qui a lieu en cours de procédé, notamment provoquée par des souches persistantes dans l'usine ou des souches émanant d'une contamination croisée via le personnel ou le matériel d'opération utilisé (Fonnesbech Vogel *et al*., 2001; Reij & Den Aantrekker, 2004).

Les taux recensés et disponibles de listériose relative aux produits marins, généralement compilés en occident, peuvent paraître faibles, mais ils ne sont pas tout à fait représentatifs de la réalité (Fig. 1.10 et Fig. 1.11). En effet, les produits de la mer sont souvent consommés en très grande quantité dans des régions du monde où il n'y a aucune surveillance de la listériose. Parallèlement, les consommateurs occidentaux sont mieux sensibilisés aux modes de préparation sécuritaires des produits de la mer : la cuisson adéquate de ces produits élimine les germes pathogènes. Toutefois, l'engouement croissant envers les produits marins consommés crus, tels les sushis, les tartares, les sashimis, les makis et autres produits préparés dans différentes saumures, représente un risque supplémentaire d'intoxication puisqu'ils ne subissent aucun traitement thermique. La préparation de ces produits en milieu industriel ou traditionnel devient ainsi préoccupante pour les services de la santé publique.

#### 1.3.1.4. Les produits végétaux : fruits et légumes

À cause de la présence naturelle de *L. monocytogenes* dans les sols, du contact direct des végétaux avec la terre, ainsi que du fait que ces denrées sont parfois consommées sans aucun traitement thermique, les fruits et les légumes sont des aliments prédisposés à véhiculer ce germe pathogène. Les radis, la laitue et les pommes de terre sont des végétaux pouvant être

contaminés (CDC, 2016). Les asperges, les choux-fleurs et les salades transformées sont aussi des milieux propices au développement de *L. monocytogenes* (Farber & Peterkin, 1991; Heisick *et al*., 1989). Selon une étude réalisée en 2005, la bactérie peut survivre même dans les fraises congelées durant plus de trois semaines (Flessa *et al*., 2005). Le comportement de *Listeria* dans les tomates fraîches et transformées a aussi été étudié et, selon les résultats, la croissance de *Listeria* dans la tomate transformée n'est pas influencée par les traitements de chloration ou l'emballage sous atmosphère modifiée à 3 % $O_2$ et à 97 % $N_2$ (Beuchat & Brackett, 1991). En effet, la population de *Listeria* présente dans ce type de produit peut survivre 14 jours à 5 °C. Cependant, la population bactérienne présente dans le ketchup aux tomates vendu commercialement diminue rapidement. Contrairement aux végétaux faiblement acides, tels que le brocoli, la laitue, et l'asperge, la tomate n'est pas un milieu favorisant le développement de *L. monocytogenes*. Néanmoins, la présence de cet organisme dans la tomate fraîche et transformée en fait un vecteur potentiel de listériose. Même si les concentrations de *L. monocytogenes* sont moindres dans les produits végétaux, il n'en demeure pas moins que l'importante éclosion de 1981, responsable de 41 infections et 17 décès dans les provinces maritimes canadiennes, fut causée par l'ingestion de choux contaminés (Gouv. Can, 1981). Quelques cas de listériose ont permis de démontrer que cette maladie pouvait être contractée par l'ingestion d'aliments contaminés par des produits végétaux. Les fruits et légumes représentent le troisième groupe en importance impliqué dans des cas de décès suite à la consommation d'aliments contaminé par *L. monocytogenes* (Fig. 1.11). En 2011, une épidémie aux États-Unis s'est déclarée suite à une contamination de cantaloups. Le bilan fait mention de 147 personnes infectées (CDC, 2011) et, au final, de 33 décès. En janvier 2016, à Ottawa, un important rappel concernant différents produits de salades coupées et de légumes-feuilles s'est effectué parce que ces produits pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes* (ACIA, 2016a). Les volumes importants de légumes mangés crus ou blanchis comptent parmi les facteurs de transmission de la maladie. De toute évidence, à peu près tous les types d'aliments permettent à *L. monocytogenes* de se développer et d'infecter l'humain. Cette caractéristique renforce l'importance du contrôle de ce pathogène dans toutes les catégories d'industries œuvrant dans l'agroalimentaire.

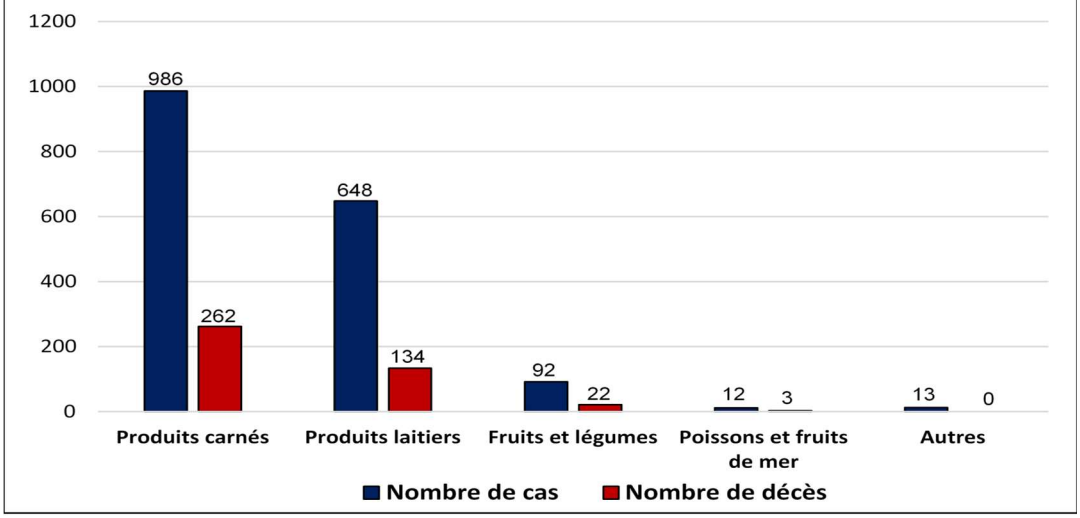



Figure 1.11. Nombre de cas et décès associés aux principales éclosions de listériose invasive de 1980 à 2010 (Amérique, Europe, Australie et Nouvelle-Zélande). (Données sources : Santé Canada, 2011)

### 1.4. Listériose : maladie infectieuse

La listériose met en cause l'invasion du sang et de divers tissus par des bactéries appartenant à des sérotypes de *L. monocytogenes*. Ces microorganismes, parasites intracellulaires facultatifs, sont capables de se multiplier dans les macrophages et de s'introduire dans une grande variété de cellules non phagocytaires telles que les entérocytes, les hépatocytes et les cellules endothéliales (Berche, 2005). Habituellement, le processus pouvant mener à l'apparition d'une listériose débute par l'ingestion d'aliments contaminés. La paroi du système digestif représente donc la principale porte d'entrée de la bactérie (Farber & Peterkin, 1991; Schlech *et al*., 1983). La muqueuse intestinale, constituée d'un système de défense très organisé, offre une protection contre de nombreux pathogènes auxquels elle est exposée. À cet endroit, pour parvenir à s'étendre dans l'organisme, *L. monocytogenes* doit franchir différents niveaux de sécurité dont les composantes peuvent être de nature chimique, physique et immunologique. Chez les sujets immunocompétents, l'acidité gastrique, la production efficace de mucus, les bactéries commensales à même le microbiote, ainsi que la présence d'immunoglobulines (IgA), bloquent les bactéries pathogènes ingérées et, la plupart du temps, le système immunitaire neutralise ces microorganismes infectieux avant qu'ils ne puissent déclencher une infection (Tennant *et al*., 2008).

Toutefois, lorsque l'aliment est fortement contaminé ou lorsque les parois intestinales présentent des lésions, les bactéries déjouent plus facilement les systèmes de sûreté et peuvent parvenir à s'infiltrer à l'intérieur de l'organisme (Fig. 1.12). Par surcroît, lorsque la santé de l'individu est précaire, une diminution de l'activité des globules blancs peut survenir

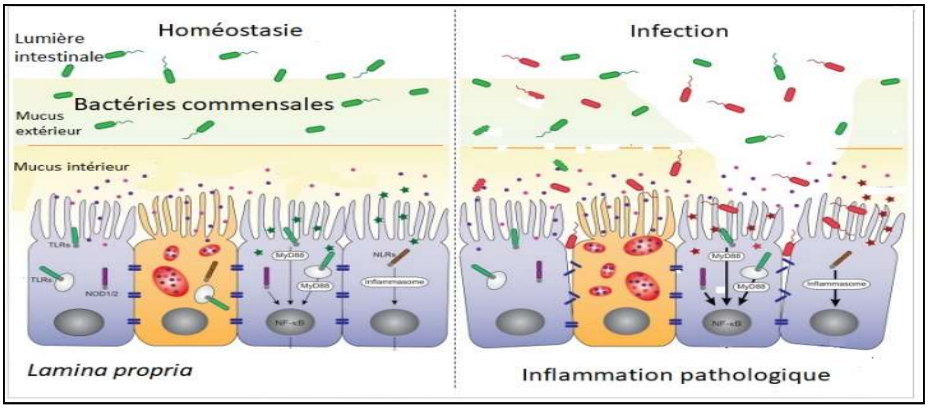



Figure 1.12. Infiltration bactérienne à travers l'épithélium intestinal (homéostasie et infection). (Tirée de Muniz *et al*., 2012)

et nuire à l'homéostasie cellulaire. La barrière physique, constituée de cellules épithéliales, pour être pleinement efficace, doit être recouverte de mucus contenant un enchevêtrement de polysaccharides et de protéines. Ce mucus gélatineux, cumulé le long des différentes cellules jointées constituant l'épithélium digestif (caliciformes, de Paneth, entérocytes et cellules M), possède un pH variable selon l'activité du microbiote et contient de nombreux peptides antimicrobiens (défencines), sécrétés par différentes cellules et, plus spécifiquement, par les cellules de Paneth situées à la base des cryptes intestinales (Fig. 1.13). Sous la paroi épithéliale, derrière les cellules appelées les cellules M (*microfold*), se trouvent des plaques

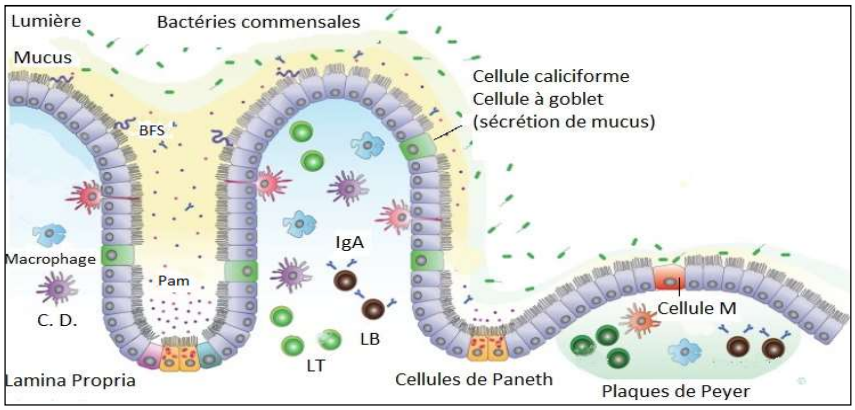



Figure 1.13. Constitution cellulaire de l'intestin et localisation des globules blancs (barrières physiques et immunologiques). (Tirée de Muniz *et al*., 2012)

à intervalles réguliers, les plaques de Peyer. Elles contiennent d'abondants globules blancs (lymphocytes B et T, macrophages et cellules dendritiques). À cet emplacement, les cellules M jouent un rôle majeur de protection contre l'envahissement par des pathogènes, car avec les plaques, elles représentent une ligne de défense à la fois physique et immunitaire contre les agents infectieux. En plus de former une barrière cellulaire, puisque fermement liées aux entérocytes, les cellules M peuvent déclencher une réponse immunitaire en collaborant avec les cellules dendritiques. Par coopération, elles permettent de neutraliser les intrus présents dans la lumière intestinale en transportant leurs antigènes vers les tissus sous-jacents, dans le secteur des plaques de Peyer. De façon paradoxale toutefois, les cellules M peuvent servir aussi de voie d'entrée pour de nombreux microorganismes pathogènes, dont *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* et *Listeria* (Tran Van Nhieu & Cossart, 2001).

La barrière intestinale représente malgré tout une surface fortement organisée qui bloque, en général, l'entrée des microbes vers la *lamina propria*, tissu conjonctif de soutien situé sous les épithéliums de la muqueuse digestive. Les nombreuses cellules immunitaires, notamment les plasmocytes (lymphocytes B activés), circulent de façon permanente de part et d'autre de cette frontière. L'apparition d'une immunodéficience peut conduire les plasmocytes à produire une plus faible concentration d'immunoglobulines (Ig), entraînant une réduction des capacités du système immunitaire à éliminer une infection comme la listériose. Les IgA produites par les plasmocytes, et présentes en forte concentration dans les muqueuses, constituent un autre niveau de sécurité que *L. monocytogenes* doit franchir pour réussir son invasion. En effet, les IgA, par fixation, jouent un rôle fondamental dans la neutralisation des bactéries pathogènes présentes dans la lumière intestinale, en protégeant entre autres les cellules M contre l'adhérence bactérienne. Ces immunoglobulines, en plus d'informer les cellules dendritiques de la présence d'antigènes indésirables, favorisent la formation de biofilms de la flore commensale qui, en formant un écran, protègent davantage la paroi intestinale (Denning *et al*., 2007; Mantis *et al*., 2011). Le mucus, colonisé et enrichi par les espèces commensales, est un milieu compétitif qui limite le contact des pathogènes avec le tissu cellulaire (Muniz *et al*., 2012). Une baisse de sécrétions de mucus favorise le contact et l'adhérence de bactéries pathogènes aux différentes cellules qui tapissent la paroi interne de l'intestin. En l'absence de mucus et d'une flore intestinale active, les germes tels que

*L. monocytogenes*, situés dans le tube digestif, peuvent parvenir à se disséminer à travers l'organisme d'abord par contact avec l'épithélium, les cellules M ou les entérocytes, et même via les cellules dendritiques et les macrophages présents à proximité. Lors d'une infection, les *Listeria* qui n'auront pas été éliminées circulent dans les voies sanguines, parfois à travers les monocytes, et peuvent infecter les hépatocytes et les cellules de la rate (Fig. 1.14). Les globules blancs peuvent donc propager à leur insu le pathogène (Rocourt & Jacquet, 2000).

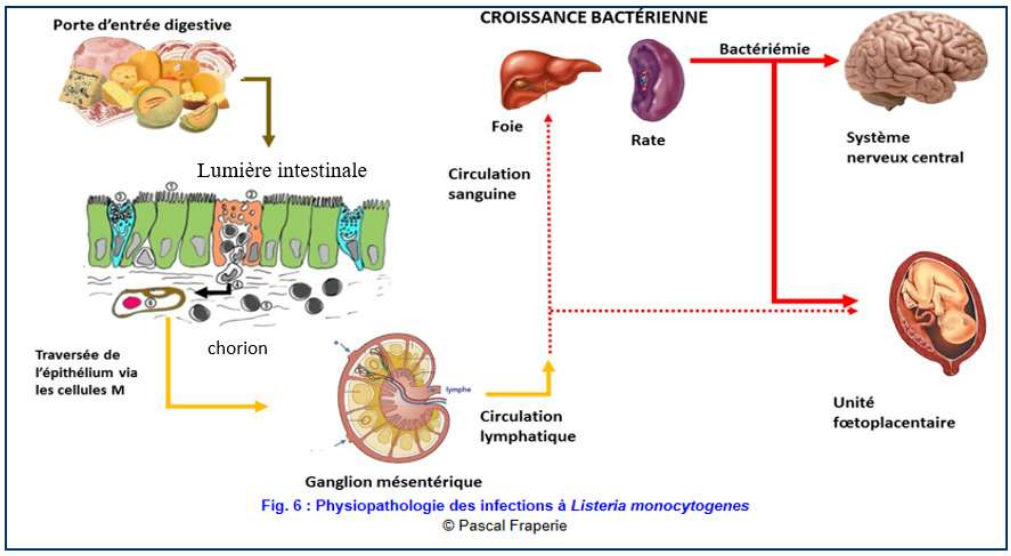



Figure 1.14. Processus d'infection de *L. monocytogenes*. (Adaptée de Microbiologie médicale.fr Pascal Fraperie)

Du fait que *L. monocytogenes* est également en mesure de traverser les barrières placentaire et hémato-encéphalique, elle représente une menace importante pour le fœtus, les personnes âgées et les individus immunodéprimés. Elle peut, engendrer une infection du fluide amniotique et des membranes fœtales, appelée chorioamniotite (Berche, 2005). Cette infection peut entraîner des risques de contamination du fœtus par voie transplacentaire et causer l'avortement spontané, la naissance d'un enfant mort-né ou présentant des déficiences cérébrales, des paralysies ou des malformations congénitales. La listériose fœto-maternelle ne cause généralement pas de problèmes physiques graves chez la mère porteuse. Les symptômes rapportés sont des diarrhées, des crampes abdominales et des nausées (Anses, 2016).

Lorsque le système n'a pas été en mesure de neutraliser les bactéries, elles se disséminent dans les réseaux sanguins et parviennent à atteindre différentes cellules endothéliales, voies d'accès notamment au système nerveux central. *Listeria* se propage dans les méninges en longeant les nerfs crâniens et peut facilement causer une inflammation de l'encéphale et donner lieu à une méningo-encéphalite pouvant causer des séquelles importantes chez l'adulte, et parfois chez les enfants (Rocourt, 1989). Le développement d'une méningite ou d'une méningo-encéphalite s'accompagne de symptômes tels que des maux de tête persistants (céphalées), de la fièvre, des troubles respiratoires, des tremblements, des convulsions et une rigidité de la nuque. La maladie est souvent insidieuse et similaire à un syndrome pseudo-grippal. L'apparition d'une septicémie peut également être responsable de malaises ou conduire au décès de l'individu par un arrêt des fonctions vitales. Dans ce cas, *Listeria* infecte d'abord le foie ou la rate, endommage les tissus avant d'atteindre le flux sanguin et d'infecter l'hôte dans une plus grande mesure. Plus rarement, les infections se présentent sous forme d'hépatite aiguë, l'inflammation du foie n'étant pas toujours décelée (Al-Dajani & Khatib, 1983; Lopez-Prieto *et al*., 2000). Sous sa forme non envahissante, la listériose se manifeste par des symptômes typiques de la gastro-entérite, notamment de la fièvre, de la diarrhée et des vomissements (Doganay, 2003). Certaines conditions prédisposent l'humain à être atteint d'une listériose. Outre les sujets sensibles mentionnés précédemment, les alcooliques, les diabétiques, les malades atteints du SIDA ainsi que les cancéreux sont d'autres catégories d'individus vulnérables. Des variations anodines du microbiote entraînant une diminution de l'acidité gastrique peuvent également être un facteur favorisant la prolifération de *Listeria* dans le tractus gastro-intestinal. L'apparition de la maladie et la guérison du patient dépendent de plusieurs facteurs, dont l'état général du malade, son immunité naturelle, la dose de l'inoculum ingéré, la virulence de la souche et les traitements appliqués (Fig. 1.15). La dose minimale de *Listeria* conduisant à une infection chez l'humain est donc un facteur difficilement quantifiable en raison de ces différents paramètres qui influencent le développement des bactéries. D'autre part, il est possible que de faibles

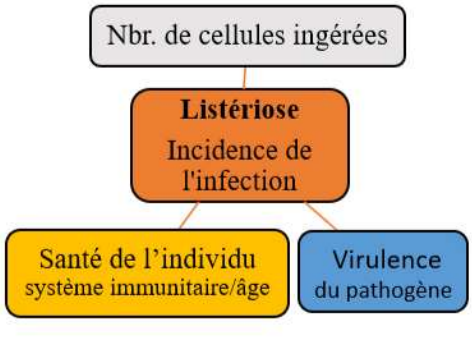



Figure 1.15. Facteurs de risque (listériose).

concentrations, de l'ordre de $10^2$ à $10^4$ UFC/g, déclenchent une listériose, principalement chez les sujets dont les défenses immunitaires sont affaiblies (Farber & Peterkin, 1991; McLauchlin, 1991). Ainsi, la dose infectieuse varie selon la virulence du sérovar et selon tous les facteurs de risque présents chez l'individu.

### 1.5. Mécanismes de virulence

Le haut potentiel invasif de *L. monocytogenes* repose d'abord sur sa facilité à persister dans l'intestin grâce à sa capacité de produire une hydrolase à sels biliaires. Toutefois, le facteur de virulence le plus déterminant de cette bactérie est son exotoxine, la listériolysine O (LLO), qui se démarque par ses activités multifonctionnelles. Dès son approche, en direction de la cellule à infecter, et avant même de procéder à une internalisation en vue d'entreprendre son entrée dans la cellule, la bactérie libère la LLO, qui effectue des perforations membranaires sur la cellule hôte, perturbant systématiquement le contenu ionique du cytosol. C'est le début de l'opération de sabotage. En effet, cette enzyme s'infiltre et prépare le terrain en vue de l'invasion en déstabilisant, par une déphosphorylation, les histones (Fig. 1.16). Elle va aussi directement fragmenter les mitochondries, site important de production d'énergie chez la cellule eucaryote, et s'attaquer aux enzymes de la machinerie SUMO, impliquées dans la

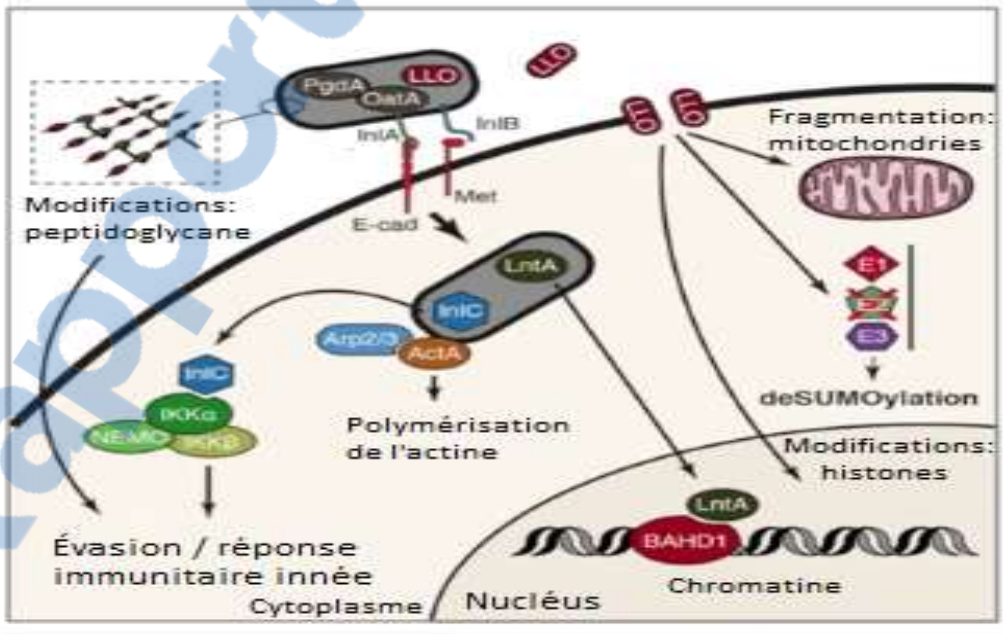



Figure 1.16. Action localisée des facteurs de virulence de *L. monocytogenes* chez la cellule eucaryote. (Tirée de Cossart, 2015a)

Rapport-Gratuit.com

gestion du métabolisme de la cellule, en effectuant une déSUMOylation qui affecte l'une des enzymes de ce système, la Ubc9 (Johnson, 2004; Meulmeester & Melchior, 2008). Pendant ce temps, la bactérie, à l'aide de ses internalines, provoque une phagocytose induite qui la conduit à l'intérieur même de la cellule hôte. Elle se retrouve dans une vacuole, en situation de danger, et s'empresse alors de produire à nouveau la listériolysine O. Grâce à cette exotoxine, elle s'échappe du phagosome duquel elle est captive.

La production de la LLO et de phospholipases (A et B) fragilisent et perforent la membrane de la vacuole. En se libérant rapidement, la bactérie évite le contact avec les enzymes de digestion de la cellule eucaryote. Ainsi, les lysosomes, organites spécialisés dans la neutralisation des agents infectieux, ne peuvent former de phagolysosome, étape clef d'une élimination microbienne. Les bactéries, ayant contourné le système de digestion et d'élimination, se multiplient ensuite dans le cytoplasme (Fig. 1.17). Débute alors le cycle d'infection de la cellule. *L. monocytogenes*, libre dans le cytoplasme, se multiplie très rapidement en utilisant le glycérol au lieu du glucose, évitant l'affaiblissement trop rapide de la cellule parasitée (Chatterjee *et al*., 2006). Elle poursuit son invasion en polymérisant l'actine du cytosquelette de la cellule eucaryote (annexe 5). Durant ce processus, les monomères d'actine G s'associent en filaments à l'une des extrémités de la bactérie, entraînant une polarisation avec libération d'électrons par la transformation de l'ATP en ADP. Cette émission d'énergie assure le déplacement intracellulaire et propulse les bactéries vers des cellules adjacentes. La force produite par l'effet comète est suffisante pour déformer la membrane de la cellule hôte (Fig. 1.17). La formation d'un pseudopode qui s'étire jusqu'à la cellule voisine crée par protrusion une double membrane, qui subira une dénaturation par l'action de la listériolysine combinée à l'activité de phospholipases. *Listeria* réinitie ensuite ce cycle, sans s'exposer à l'extérieur de la cellule hôte, évitant une circulation dans les

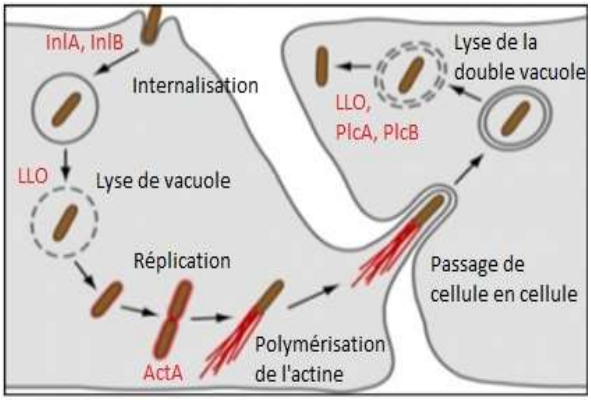



Figure 1.17. *L. monocytogenes* : passage de cellule en cellule. (Adaptée de Pizarro-Cerdá *et al*., 2012)

espaces intercellulaires. Ce procédé lui permet de dissimuler sa présence ainsi que sa localisation, notamment aux polynucléaires ou autres cellules phagocytaires pouvant l'éliminer. Les *Listeria,* présentes dans les macrophages qui ont rejoint la rate et le foie, se multiplient et sont de nouveau déversées dans le sang. Cette remarquable capacité à se développer dans la plupart des cellules non phagocytaires de l'organisme et, étonnamment, dans les macrophages est un des facteurs déterminants de sa virulence (De Chastellier & Berche, 1994). Depuis plus de 20 ans, plusieurs facteurs de virulence présents chez *L. monocytogenes* ont été identifiés et étudiés. Ces découvertes ont facilité la compréhension des divers processus reliés à ses capacités d'invasion, la conduisant ainsi à devenir une référence en matière de propagation intracellulaire.

### 1.5.1. Sécrétion d'hémolysine

L'hémolysine O (LLO) de *L. monocytogenes* a été caractérisée comme étant une protéine extracellulaire de poids moléculaire de 60 000 Da. Cette protéine capable de se fixer au cholestérol des membranes cellulaires a une activité optimale à pH acide et elle est neutralisée à pH 7 (Farber & Peterkin, 1991; Gormley *et al*., 1989). La LLO est une bactériocine qui détériore les structures cellulaires par la formation de pores. *L. ivanovii* et *L. seeligeri* produisent une hémolysine similaire, mais à des concentrations différentes. *L. ivanovii* produit 10 fois plus d'hémolysine que *L. monocytogenes*, tandis que *L. seeligeri* en produit 10 fois moins. Cette hémolysine de type βêta, en référence à sa capacité de lyse complète des cellules sanguines, fut considérée pendant plusieurs années comme le facteur unique de virulence des *Listeria*. La production d'hémolysine par le microorganisme semble liée à la composition minérale du milieu et elle est favorisée lorsque le milieu contient de très faibles concentrations de fer (Cowart & Foster, 1981). Une perte de la capacité de produire l'hémolysine serait associée à une diminution de la virulence (Gaillard *et al*., 1986). Ces constatations suggèrent un effet létal plus important lorsque la concentration d'hémolysine est plus élevée. L'hémolysine est requise pour la survie du microorganisme dans les cellules, mais n'est pas essentielle à sa pénétration (Kuhn *et al*., 1988). Pour entraîner des dommages pathologiques, plusieurs facteurs de virulence se coordonnent. De ce fait, le potentiel invasif de *L. monocytogenes* est un phénomène multifactoriel qui s'enchaîne suivant les conditions du milieu. Le haut niveau de pathogénicité qu'elle possède repose, en grande partie, sur sa



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

capacité de parasiter aussi bien les cellules phagocytaires que les cellules non phagocytaires. Comme vu précédemment, ce pouvoir invasif est régi par plusieurs facteurs tels que sa capacité d'induire la phagocytose; sa rapidité de libération du phagosome, évitant la fusion avec les lysosomes et, de ce fait, sa neutralisation; son déplacement intracellulaire découlant de sa capacité à polymériser l'actine; et son pouvoir de déSUMOylation et de fragmentation des mitochondries (Cossart, 2015a).

### 1.5.2. Invasion cellulaire : implication des gènes de virulence

L'infection de l'organisme par *L. monocytogenes* implique différentes étapes telles que l'adhésion, la phagocytose, la pénétration et la multiplication dans les cellules hôtes (Ralovich, 1989a et b). De nombreux gènes sont rattachés à ces différents processus, mais le gène *bsh* (bile salt hydrolase), identifié chez *L. monocytogenes, L. ivanovii* et *L. seeligeri* (Dusurget *et al*., 2002) et absent chez d'autres souches apparentées, leur est crucial pour perdurer dans l'intestin en raison d'une neutralisation des sels biliaires (Cossart, 2015b; Glaser *et al*., 2001). Après avoir traversé la barrière intestinale, *L. monocytogenes* se retrouve dans les tissus conjonctifs de la *lamina propria*, contenant de nombreuses cellules de défense. Il arrive qu'elle parvienne à déjouer les cellules phagocytaires et à les parasiter. Ces sentinelles deviennent alors des refuges où les microorganismes sont à l'abri du système immunitaire, capables d'agir ensuite comme un cheval de Troie. Les cellules parasitées protègent les *Listeria* et leur permettent une incubation pouvant s'étendre à plus de deux mois avant l'apparition de symptômes inquiétants.

La première étape de l'infection d'un tissu, l'adhésion, implique l'action de protéines bactériennes de surface, les internalines (Fig. 1.18). Ces protéines prennent contact avec des récepteurs membranaires (E-cadhérine et C-Met), provoquant un processus de phagocytose (Lecuit & Cossart, 2001). Le gène bactérien *InlA* code pour l'internaline A. Cette protéine se fixe au récepteur E-cadhérine de la cellule eucaryote et l'internaline B se fixe au récepteur C-Met (Tran Van Nhieur & Cossart, 2001). Après la pénétration dans la cellule eucaryote, *L. monocytogenes* se retrouve dans un phagosome, vacuole formée suite à un mécanisme de type fermeture éclair (Dortet *et al*., 2009; Tran Van Nhieur & Cossart, 2001). Comme mentionné précédemment, elle s'échappe rapidement de cette enveloppe grâce à la

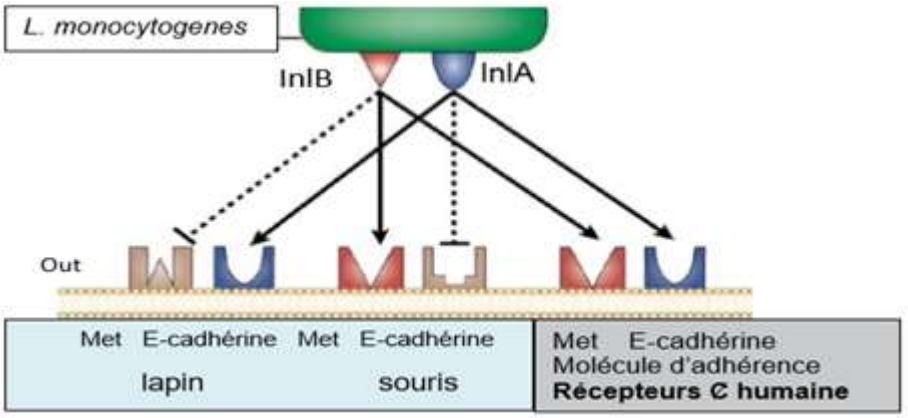



Figure 1.18. Internalines de *L. monocytogenes* sur des récepteurs d'eucaryotes. (Adaptée de Lecuit, 2007)

production de la LLO et de phospholipases. La libération de ces enzymes est contrôlée par les gènes *hly*, *plcA* et *plcB*. Le pathogène libéré se multiplie dans le cytoplasme et polymérise l'actine G (globulaire), constituant du cytosquelette, en actine F (filamentaire). Ce processus est possible grâce à une protéine bactérienne de surface, l'ActA, qui reconnaît l'actine. La synthèse de filaments d'actine assure la motilité de la bactérie et sa vitesse de déplacement, variable selon la nature des cellules infectées, est de 10 à 25 µm par minute (Diakonova *et al*., 2007; Gouin *et al*., 1999; Tran Van Nhieu & Cossart 2001). *L. monocytogenes* est aussi capable de détruire des globules blancs. La production d'une superoxyde dismutase, métalloprotéine qui s'oppose aux ions superoxydes des phagocytes, est un élément amplifiant sa virulence (Kaufmann, 1988). Elle est résistante aux agents antibactériens oxydants (peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ et acide hypochlorique) durant sa phase exponentielle de croissance, lorsque la concentration d'une autre enzyme, la catalase, est à son maximum (Bortolussi *et al*., 1987). En phase stationnaire, la concentration de catalase diminuant pourrait la rendre sensible à ces différents agents inhibiteurs. La catalase joue donc un rôle d'agent protecteur en neutralisant les peroxydes produits par les macrophages. Ce phénomène pourrait contribuer à protéger *L. monocytogenes* lors de son développement intracellulaire. Les souches avirulentes et non hémolytiques de *Listeria* ne peuvent survivre à l'intérieur des cellules hôtes et se font détruire plus facilement par les globules blancs. Des études ont mis en évidence que lorsque la bactérie devient pathogène, des régions de son génome s'expriment et d'autres deviennent silencieuses. Les chercheurs ont analysé l'ensemble des ARNs de la bactérie et ont constaté qu'en conditions de pathogénicité, lorsqu'elle se situe

dans l'intestin ou le sang, différents groupes de gènes dits de virulence sont exprimés. Ce sont notamment des gènes codant pour des protéines dont le rôle est de rompre des membranes cellulaires (*hly*) ou de faciliter des mouvements intracellulaires (*actA*) (Toledo *et al*., 2009). Ces derniers sont régulés par l'activateur et répresseur de virulence, le gène *prfA*.

### 1.6. Méthodes d'isolement, de détection et d'identification des *Listeria*

*L. monocytogenes* est un microorganisme pathogène de l'humain, connu depuis plus de 90 ans. L'évolution des techniques spécifiques pour sa détection a forcément suivi l'avancement des connaissances en biologie moléculaire. Trouver le moyen d'identifier les *Listeria*, non seulement au niveau du genre, mais plus précisément au niveau de l'espèce, tout en différenciant les espèces pathogènes (*L. monocytogenes* et *L. ivanovii*) des autres bactéries avirulentes, est un objectif primordial. Cette section fait le survol des progrès qu'ont connus les différentes techniques de caractérisation des *Listeria* en vue d'obtenir des méthodes rapides et précises. Les premières méthodes exploitées sont celles de l'étalement sur boîte de Pétri, les techniques biochimiques et le lysotypage. Par la suite, diverses techniques immunologiques, dont le sérotypage et les techniques génétiques incluant la PCR, la détection moléculaire MDA, le ribotypage, les sondes nucléiques, le polymorphisme fragmentaire en gradient électrophorèse (PFGE), le MLST Multi-sites ainsi que la spectroscopie de masse MALDI et la cartographie génomique (WGS), ont été développées. Actuellement, l'accent est mis sur le perfectionnement des techniques de spectroscopie de masse et de séquençage génomique par cartographie, ainsi que sur des méthodes de CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Small Palindromic Repeats). Ces techniques de biologie moléculaire, développées pour un repérage éclair de *L. monocytogenes* dans les aliments, améliorent la prévention des infections puisqu'elles permettent un temps de réaction et de réorganisation favorisant le retrait rapide des produits agroalimentaires contaminés.

#### 1.6.1. Étalement sur gélose et techniques biochimiques

L'isolement et la détection de *L. monocytogenes* contenue dans les aliments, par des méthodes classiques, nécessitent des étapes d'enrichissement essentielles pour dénombrer suffisamment de bactéries sur les milieux gélosés. L'une des premières techniques employées

afin d'isoler sélectivement les bactéries psychrotrophes, dont *Listeria* fait partie, consistait à incuber, à basse température (4 °C), une fraction de l'aliment broyé dans un bouillon nutritif pendant près de cinq semaines. Des prélèvements du milieu étaient ensuite soumis à une incubation à 37 °C pour confirmer la présence de l'organisme pathogène. Afin de détecter même les bactéries fragilisées par divers stress, dont l'exposition à des températures extrêmes ou à des étapes de saumurage, de nombreux bouillons d'enrichissement et de milieux sélectifs ont été élaborés en fonction de la complexité des matrices alimentaires, d'un faible nombre de *Listeria* et d'une flore bactérienne parfois diversifiée. Une étude comparative sur divers milieux d'enrichissement, visant à faire ressortir les meilleurs constituants pour la croissance spécifique des *Listeria*, démontre qu'un plus grand nombre de cellules bactériennes contenues dans des échantillons de lait cru fut dénombré sur les milieux OXFORD et PALCAM (Lund *et al*., 1991). Les milieux de culture contenant des agents chimiques sélectifs, tels que l'acide nalidixique et l'acriflavine, ont permis de mieux sélectionner les bactéries du genre *Listeria* qui ont la capacité de croître en leur présence. L'utilisation préalable de ces agents sélectifs lors de l'étape de l'enrichissement en bouillon de culture est toujours nécessaire.

Malgré les succès obtenus par les techniques d'isolement en milieu sélectif, leur utilisation présente plusieurs désavantages en industrie agroalimentaire. En effet, la détection de *Listeria* dans les aliments doit être suffisamment rapide pour permettre le rappel des denrées contaminées avant leur consommation et, idéalement, avant même leur sortie vers les détaillants. Des analyses morphologiques, physiologiques, et biochimiques peuvent parfois être requises afin de garantir la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments. Souvent, le recours à des tests d'identification complémentaires est donc nécessaire afin de corroborer un résultat positif. L'identification du genre, l'appartenance au groupe Gram +, la présence d'une catalase et la motilité flagellaire peuvent être vérifiées. La confirmation de l'espèce peut être déterminée par l'hémolyse, par CAMP-test et par la production d'acide via la fermentation de certains sucres (xylose, rhamnose, α-méthyl-D-mannoside) (Tabl. 1.4). Des tests toujours en application et bien connus sont ceux de la galerie miniaturisée API constituée de 10 analyses qui permettent d'identifier le genre et les espèces de *Listeria*. Les dix microtubes contiennent des substrats nécessaires à la réalisation de tests enzymatiques

Tableau 1.4. Galerie API (Biomérieux) : Identification de *L. monocytogenes*.

| Listeria | hémolyse | Campt test | Ribose | D-MANnitol | D-XYLose | D-RHAmnose | alpha-méthyl-D-mannoside |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Listeria monocytogenes* | + | + | - | - | - | - | + |
| *Listeria innocua* | - | - | - | - | - | +/- | + |
| *Listeria ivanovii subsp ivanovii* | + | - | + | - | + | - | - |
| *Listeria ivanovii subsp londoniensis* | + | - | + | - | + | - | - |
| *Listeria seeligeri* | + | + | - | - | + | - | +/- |
| *Listeria welshimeri* | - | - | - | - | + | +/- | - |
| *Listeria grayi* | - | - | - | + | - | - | + |

ou des fermentations de sucres. Les réactions produites se caractérisent par des changements de coloration lors de l'addition de réactifs. Selon les directives, ce test reconnaît 85 % des 646 souches de *Listeria* (Bille *et al*., 1992).

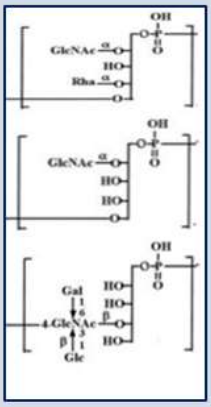
### 1.6.2. Lysotypage et phages à marqueur bioluminescent (phagodétection)

Le lysotypage est une technique qui peut permettre de confirmer l'identification des *Listeria*. Son principe est basé sur la sensibilité des bactéries à des phages de référence. La sensibilité des souches à certains phages repose en partie sur les différences structurales des divers polysaccharides fixés aux acides téichoïques. Le système d'identification de *Listeria* par des bactériophages est reproductible et utilisable de façon routinière (Audurier *et al*., 1984). Des études révèlent que plus de 90 % des sérotypes 1/2 sont identifiables par des phages et que la majorité des isolats appartenant au sérotype 4b sont très sensibles aux bactériophages (Loessner & Busse, 1990a et b). Les avantages d'utiliser la lysotypie sont multiples : les phages sont nombreux et spécifiques pour permettre la subdivision des espèces; les résultats sont faciles à obtenir et reproductibles; la méthode est rapide et permet d'obtenir des résultats en quelques heures; la méthode peut se standardiser; le test est relativement peu coûteux (Ackermann & Dubow, 1987). Les inconvénients sont que les préparations phagiques doivent être d'une grande pureté et de concentration élevée afin d'éviter de faux résultats. Il existe aussi la possibilité d'utiliser des phages à marqueur bioluminescent qui, grâce à l'intégration d'un gène de luciférase dans leur génome, permettent de repérer rapidement des bactéries actives dans divers milieux (Klumpp & Loessner, 2014).

### 1.6.3. Sérotypage

Le sérotypage est un procédé de routine pour la caractérisation des bactéries. Cette technique est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum d'identification et un antigène chez la bactérie. Une agglutination résultant de la formation d'un complexe antigène-anticorps est visible et met en évidence des antigènes structuraux bactériens distincts. Les combinaisons antigène-anticorps (Ag/Ac) formées définissent le sérotype (Tabl. 1.5). Dans la procédure de sérotypage, deux composantes sont

Tableau 1.5. Sérotypes de *Listeria*. Variations dans les protéines structurales et flagellaires et composition des acides téichoïques pour les sérotypes 1/2, 3 et 4. (Adapté de Larpent, 2004 et Promadej *et al*., 1999)

| Espèce | Sérovars | Antigène O (somatique) | Antigène H (flagellaire) |
|---|---|---|---|
| *L. monocytogenes*  | 1/2a | I ; II ; III | A ; B |
| | 1/2b | | A ; B ; C |
| | 1/2c | | B ; D |
| | 3a | II ; III ; IV | A ; B |
| | 3b | | A ; B ; C |
| | 3c | II ; III ; IV ; XII ; XIII | B ; D |
| | 4a | III ; V ; VII ; IX | A ; B ; C |
| | 4b | III ; V; VII ; IX | |
| | 4c | III ; V ; VII | |
| | 4d | III ; V ; VII | |
| | 4e | III ; V ; VI ; VIII ; IX | |
| | 7 | III ; XII ; XIII | |
| *L. ivanovii* | 5 | III ; V ; VI ; VIII ; X | |
| *L. innocua* | 6a | III ; V ; VI ; VII ; IX ; X ; XI | |
| | 6b | III ; XIV | |
| *L. grayi* | | | E |

reconnues : les antigènes **flagellaires** et les antigènes **somatiques** constituants de la structure, dont l'acide téichoïque (polyribitol-phosphate lié de manière covalente au peptidoglycane) et les polysaccharides. Les substitutions glycosidiques sur les unités ribitol-phosphate rendent ce composant variable au niveau structural et antigénique. Les acides téichoïques des sérogroupes 1/2 et 3 sont des polyribitol-phosphates avec des substituts N-acétylglucosamine (GlcNAc) et rhamnose (dans le cas du sérogroupe 1/2) sur le ribitol. Chez les souches du sérogroupe 4, le GlcNAc est incorporé dans les chaînes d'acide téichoïque et contient, selon

le sérovar, des substituts de galactose et/ou de glucose. La sérotypie a permis d'identifier, dans le genre *Listeria*, 17 sérovars, et ce grâce à 15 antigènes somatiques (I à XV) et à 5 antigènes flagellaires (A à E). Les diverses espèces de *Listeria* sont donc classifiées en 17 sérotypes dont 12 sont associés à *L. monocytogenes* (Larpent, 2004; Hyden *et al*., 2016). Les sérovars de *L. monocytogenes* sont regroupés en quatre lignées : **I**: serotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, et 7; **II**: serotypes 1/2a, 1/2c, 3a, et 3c; **III**: serotypes 4a et 4c; **IV**: quelques 4a et 4c, ainsi que certains 4b atypiques (Haase *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2018). Les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b représentent plus de 95 % des souches causant des infections humaines (Doumith *et al*., 2004; Lukinmaa *et al*., 2003).

Des trousses enzymatiques de détection de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) effectuent la fixation d'un antigène de *Listeria*, présent dans un échantillon, sur un anticorps primaire contenu dans la solution (Fig. 1.19). Suite à la formation de ce premier

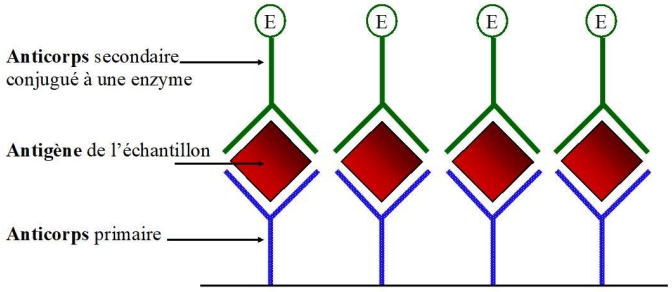



Figure 1.19. Complexes anticorps/antigène. Test ELISA-dosage en sandwich.

complexe anticorps-antigène, un anticorps secondaire spécifique au genre *Listeria*, conjugué à une enzyme, est ajouté. Ce dernier reconnaît le premier complexe déjà formé et va s'y fixer. Ainsi, l'antigène est pris en « sandwich » par les anticorps et, suite à une incubation de quelques minutes en présence d'un substrat chromogène, une coloration apparaît selon le nombre de sandwiches formés (Goldsby *et al*., 2003). Le test d'immunodétection « Vidas *Listeria* », de type ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), est aussi un outil de détection. Ce test permet la détection des *Listeria* en 45 minutes après deux phases d'enrichissement de 22 heures. La limite de détection est comprise entre $10^4$ et $10^5$ bactéries/ml. Également, une trousse de détection appelée « Vidas *Listeria monocytogenes* » permet l'identification de l'espèce. Les méthodes d'enrichissement combinées aux

techniques rapides de détection immunologique sont des moyens efficaces d'identification des *Listeria*. Le sérotypage demeure une méthode utile dans les suivis épidémiologiques en offrant une identification rapide en regard du genre (Rocourt & Jacquet, 2000). Cette technique, toujours reconnue, est donc souvent utilisée pour identifier *L. monocytogenes* en complément des nouvelles techniques moléculaires qui donnent un accès à l'identification de l'espèce de manière plus rigoureuse (Corcoran *et al*., 2006; Gasanov *et al*., 2005; Nucera *et al*., 2010).

### 1.6.4. PCR Polymerase Chain Reaction : technique moléculaire

L'arrivée de nouvelles méthodes d'identification, encore plus rapides et plus spécifiques que les premiers tests de caractérisation élaborés, a permis de mieux contrôler la présence de pathogènes tels que *L. monocytogenes* dans les secteurs alimentaire et hospitalier. La PCR (Polymerase Chain Reaction), qui est une technique visant l'amplification d'une ou de plusieurs séquence(s) d'ADN, de gènes de virulence spécifiques à *L. monocytogenes* notamment, a permis non seulement d'améliorer les tests de détection de cette bactérie pathogène, mais elle a contribué également, avec d'autres méthodes, à la mise à jour de la classification actuelle des *Listeria* (Orsi & Wiedmann, 2016).

Différentes analyses comparatives confirment que les génomes de *Listeria* connus à ce jour sont circulaires et d'une taille d'environ 3 millions de paires de base, avec un taux de G+C de 37 % à 39 % (Jemmi & Stephan, 2006). Le génome de *Listeria* possède un grand nombre de gènes codant pour des facteurs de virulence. C'est en connaissant les gènes de virulence d'une bactérie, ou d'autres gènes spécifiques la caractérisant, qu'il est possible de les utiliser pour réaliser des tests d'identification génétiques. Ainsi, le procédé de la PCR utilise deux amorces oligonucléotidiques spécifiques, qui encadrent une séquence génomique à amplifier pour assurer une identification. Chez *L. monocytogenes*, l'amplification génétique s'effectue à partir d'amorces qui utilisent des séquences du gène de la listériolysine O présentes chez seulement trois espèces (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri*). L'amplification peut aussi s'effectuer sur le gène *prfA* (régulateur de virulence) et/ou sur des gènes flagellaires (Kerouanton *et al*., 2010). La méthode du PCR est une méthode sensible et rapide pour la détection de *L. monocytogenes* dans les aliments (Aznar & Alarcón, 2003).

### 1.6.5. MDA Molecular Detection Assay : détection moléculaire

Un autre système de détection moléculaire, nommé Molecular Detection Assay (MDA), effectue la détection des *Listeria* dans des échantillons alimentaires et environnementaux après une étape d'enrichissement. Le test utilise des boucles d'amplification thermiques pour cibler et récupérer l'ADN de la bactérie et la détection des amplicons s'effectue par bioluminescence. Plusieurs laboratoires américains et canadiens ont comparé la MDA avec la méthode officielle standard d'analyse (OMA) de l'AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) sur différents aliments, et les résultats des tests se sont avérés similaires pour les deux méthodes et parfois même plus précis avec la MDA qu'avec la méthode de référence. Des matrices alimentaires variées et des surfaces environnementales, dont le polypropylène et l'acier inoxydable, ont été évaluées à trois niveaux de contamination différents afin de vérifier la fiabilité de la méthode (Bird *et al*., 2015 et 2017). Les auteurs confirment que cette méthode permet de détecter *Listeria* au niveau de l'espèce dans une large gamme d'aliments et sur de nombreux types de surfaces avec une haute spécificité et une très grande sensibilité.

### 1.6.6. Ribotypage

Le ribotypage est couramment utilisé pour la détection des organismes pathogènes et cette technique peut être facilement standardisée et automatisée pour la détection de *L. monocytogenes*. La procédure moléculaire repose sur l'identification des gènes ribosomaux qui sont des empreintes uniques à chaque bactérie. Des enzymes coupent l'ADN en séquences spécifiques de nucléotides produisant des fragments de différentes longueurs (Corcoran *et al*., 2006; Wiedmann & James, 1996). Une hybridation à l'aide d'une sonde permet l'identification de sous-unités ribosomales 16S et 23S dont la longueur des fragments est évaluée par le positionnement dans un gel électrophorétique d'agarose.

### 1.6.7. Sondes nucléiques

Les sondes nucléiques utilisent une séquence d'ADN ou d'ARN marquée par un composé fluorescent ou une enzyme, pour détecter des séquences complémentaires d'acides

nucléiques. La technique d'AccuProbe Gen-Prob est une méthode rapide utilisée pour la détection de *L. monocytogenes* qui fait intervenir une association spécifique et la formation de complexes stables et repérables (de Filippis & McKee, 2012). Une lyse, conduisant à la libération de l'ARNr 16S des bactéries ciblées, est d'abord effectuée et est suivie d'une combinaison avec une sonde marquée pour former un hybride ARNr/ADN. Le réactif identifie les sondes hybridées et le luminomètre Gen-Prob mesure le signal lumineux émis. D'autres systèmes de détection utilisant également des sondes nucléiques pour la détection des *Listeria*, notamment les tests Gene-Trak (GT), fournissent une identification au niveau du genre et peuvent aussi identifier l'espèce. La procédure de repérage peut être divisée en quatre étapes : la lyse, l'hybridation, la capture de l'hybride et la détection (Raugel, 1999). Le DNA GT 604 et le test DNA 001 détectent $10^2$ *L. monocytogenes* après 48 heures d'enrichissement sur gélose. Ces trousses nécessitent un enrichissement préalable de l'échantillon avant la lyse bactérienne et peuvent être automatisées pour la lecture.

### 1.6.8. PFGE Pulsed-Field Gel Electrophoresis : électrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé est une méthode basée sur la digestion du génome d'un organisme par des enzymes de restriction combinée à une électrophorèse adaptée par réorientation du champ électrique. La PFGE permet l'identification des souches bactériennes et elle est utilisée en épidémiologie, pour connaître notamment les voies de contamination, et en taxinomie, pour caractériser les profils génétiques (Chou & Wang 2006). Lors de la procédure d'identification de *L. monocytogenes* par PFGE, deux enzymes de restriction (Apa1 et Asc1) sont recommandées pour une caractérisation rigoureuse (Chou & Wang, 2006, Nucera *et al*., 2010). Alternativement, deux champs électriques d'orientations différentes sont appliqués, forçant les fragments d'ADN à se séparer en fonction de leur taille dans un gel d'agarose. La migration des fragments les plus petits s'effectue rapidement sur une plus grande distance et les résultats obtenus, sous forme de codes-barres, sont comparés *in silico* et archivés pour l'élaboration d'une base de données. L'accessibilité de ces informations génétiques sur une grande variété de bactéries, incluant *L. monocytogenes*, est possible via un réseautage américain, « PulseNet », qui est en opération depuis les années 2000 (Nucera *et al.,* 2010).



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

### 1.6.9. MLST MultiLocus Sequence Typing : typage - séquençage multi-sites

Le typage par séquençage de sites multiples (MLST), développé dans les années 90, est basé sur le séquençage de quelques gènes (nucléotides) présents au sein d'une espèce. Cette technique génétique, requérant une amplification PCR suivie d'un séquençage d'ADN, s'est perfectionnée au fil des ans et représente une méthode de référence pour l'identification des souches de *Listeria* (Zhang *et al*., 2004). En agroalimentaire cette technique de détection permet une identification fiable et robuste de la bactérie au niveau de l'espèce en ciblant certains facteurs de virulence présents chez *L. monocytogenes*. Dans une étude de développement de la technique MLST, neuf gènes de virulence ont été recherchés, dont plusieurs fournissant un apport dans la capacité que possède *L. monocytogenes* à se propager dans les cellules humaines, notamment la superoxide dismutase (*sod*) et la catalase (*cat*) (Salcedo *et al*., 2003). Les résultats obtenus ont démontré le grand potentiel de cette méthode d'identification et ont conduit les auteurs à la recommander pour la surveillance de *L. monocytogenes*. Une autre étude visant l'utilisation de cette méthode pour différencier les espèces de *Listeria* a été réalisée, cette fois-ci avec seulement six biomarqueurs soumis à un repérage dont d'importants gènes codant pour des internalines, les *InlA* et *InlB* impliquées dans le processus de phagocytose, ainsi que les internalines *InlC* et *InlJ*. Le gène *hly* associé à la production de la listériolysine O, responsable de la destruction du phagosome et de la libération de la bactérie dans le cytoplasme, ainsi que le gène *llsX*, lié à la production de la listériolysine S, parfois présent chez quelques souches de *L. monocytogenes,* sont deux gènes importants de repérage. Toutes les souches étudiées possédaient les cinq premiers gènes alors que 31 souches sur 80 possédaient le gène *llsX* (Wu *et al*., 2016).

### 1.6.10. MALDI Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation : spectroscopie de masse par désorption-ionisation laser

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique permettant d'identifier les molécules et de caractériser leur structure chimique suite à l'analyse de la masse et de la charge de leurs ions. Cette technique utilisable en microbiologie peut fournir une identification du genre et de l'espèce d'un microorganisme et permet des gains de temps significatifs par rapport aux méthodes d'identification traditionnelles et actuelles. La

désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est une méthode d'ionisation utilisée en spectrométrie de masse et son principe repose sur la séparation d'ions, en fonction de leur rapport masse/charge (*m/z*), par des sources d'ionisation électriques ou chimiques (Fig. 1.20).

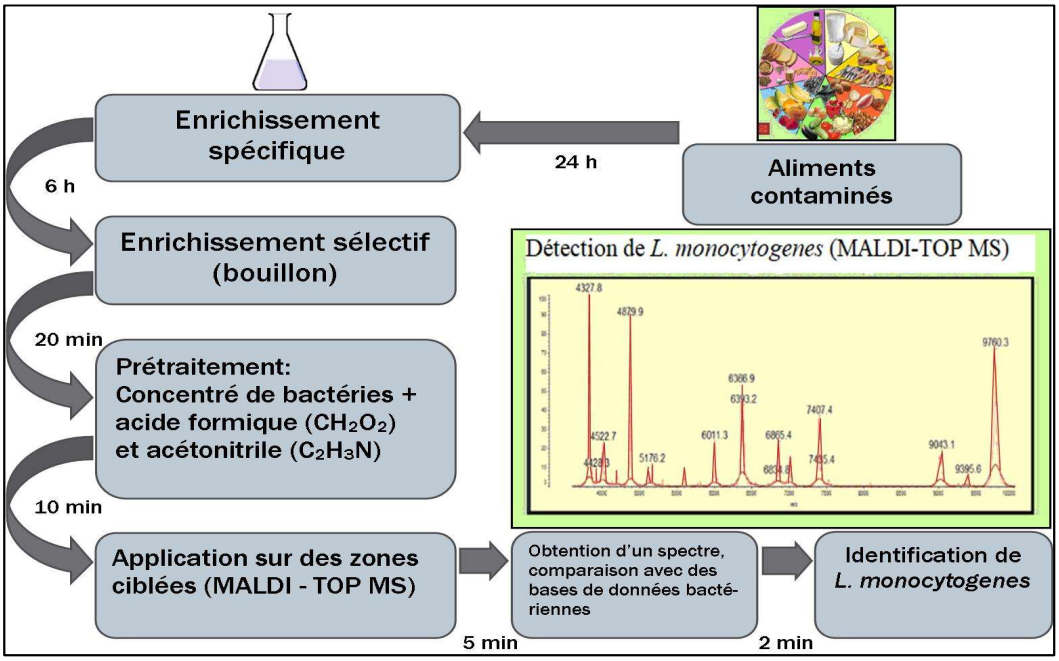



Figure 1.20. Procédure MALDI. (Adaptée de Jadhav *et al*., 2014)

D'abord utilisée en clinique médicale et dans certains laboratoires d'analyses alimentaires, le MALDI permet maintenant l'identification des sérotypes bactériens en fonction de la concordance de pics protéiniques qui varient d'un sérovar à un autre. Dans le cas de *L. monocytogenes*, au moins quinze protéines sont variables selon le sérotype. Dans une étude, une base de données MS a été construite et standardisée pour préciser et vérifier les lignées de *L. monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria* dont *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* et *L. rocourtiae*. Huit protéines ribosomales ont été sélectionnées comme biomarqueurs et ont permis la construction d'une banque de données MS. Les informations émises par ces bases de données protéomiques et génomiques ont conduit à une différenciation des sérotypes et ouvrent une fenêtre sur une méthode précise supplémentaire pour l'identification des *Listeria* dans les laboratoires de diagnostics cliniques et dans le secteur agroalimentaire (Ojima-Kato *et al*., 2016).

### 1.6.11. WGS Whole-Genome sequencing : Séquençage complet du génome

La cartographie directe de l'entièreté du génome bactérien est en train de devenir une méthode de choix pour caractériser *L. monocytogenes* et plusieurs autres pathogènes dans les laboratoires de référence nationaux. Le WGS (Whole-Genome sequencing) débute par une lyse enzymatique de l'organisme pour en extraire l'ADN, lequel est ensuite introduit dans un micro-fluide contenant une surface chargée, qui lie le génome. Un dispositif à micro-canal permet à l'ADN attaché de s'étendre le long de la surface et d'y être immobilisé. Le chromosome, étalé linéairement sur la surface, est mis en contact avec une enzyme de restriction qui coupe l'ADN sur des sites spécifiques, un espace est formé à chacun des sites de coupure. Les fragments d'ADN sont ensuite observés et mesurés grâce à une réaction fluorescente. L'analyse et l'assemblage d'une carte génomique s'effectue via un système auto-informatisé. Aucune amplification PCR n'est requise et les résultats donnent une grande combinaison d'informations qui surpassent même parfois les précisions des données obtenues par les analyses conventionnelles notamment le PFGE et la MLST (Hyden *et al*., 2016).

## 1.7. Bactériophages

### 1.7.1. Historique des bactériophages

Considérant que l'activité bactériolytique des phages envers plusieurs pathogènes a été mise en évidence par de nombreuses recherches, leur histoire et leur étude méritent une attention particulière. La première observation de l'effet d'un phage sur une bactérie date de 1896, quand Ernest Hanbury Hankin, bactériologiste anglais, souligna dans un ouvrage un phénomène bactéricide sur le microbe du choléra dans les eaux de la Jumna et du Gange, au nord de l'Inde (Hankin, 1896). Quelques années plus tard, en 1915, Frederick William Twort, bactériologiste, fit la description d'une action lytique sur des bactéries en mentionnant dans ses écrits qu'en l'espace de quelques heures, un changement progressif de la morphologie de plusieurs colonies de *Micrococcus* avait lieu sous l'action d'un agent inconnu. L'apparition de zones transparentes modifiant l'aspect visuel des colonies amena le scientifique à relier ce phénomène à la présence d'une autre espèce bactérienne antagoniste, d'une amibe ou à

l'action d'une enzyme (Twort, 1915). Twort publia ses observations dans la revue médicale britannique *The Lancet*, mais ne put approfondir ses recherches sur le sujet ni expliquer davantage le phénomène.

À la même époque, Félix Hubert d'Hérelle, travaillant à l'Institut Pasteur de Paris, constata des phénomènes similaires et publia ses observations en 1917 dans un article intitulé « *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques* ». À plusieurs reprises, il remarqua des zones de lyse sur divers tapis bactériens et constata le potentiel de cet agent, encore non caractérisé, à détruire des populations bactériennes. Il décrivit ce phénomène comme étant l'effet de parasites bactériens et leur donna le nom de « bactériophages », en proposant d'associer ce comportement à l'activité d'un virus (d'Hérelle, 1917 et 1918). Avant la découverte des phages, Félix d'Hérelle travaillait à contrer diverses épidémies, dont la dysenterie et la peste, et grâce à un échantillonnage d'agents lytiques bactériens, il fut à l'origine de l'utilisation des phages comme moyen thérapeutique. À l'ère pré-antibiotiques, les phages avaient servi à soigner plusieurs infections et leur potentiel antimicrobien laissait entrevoir un avenir très prometteur, notamment en médecine. Différentes maladies, telles que les infections cutanées et urinaires, la dysenterie, la peste et les fièvres typhoïdes, ont été traitées avec des bactériophages (d'Hérelle, 1925). D'Hérelle testa l'efficacité des phages sur des patients atteints de choléra en les administrant par les voies orale, intramusculaire, ou intraveineuse et par application directe sur les plaies. Lorsque l'administration devait être intraveineuse, les phages étaient alors introduits dans une solution de glucose. Dans certains cas, les phages étaient administrés en aérosol dans les yeux ou le nez des patients pour combattre des lésions ou des sinusites (Ackermann & Dubow, 1987). Dans les années 20 et au début des années 30, dans l'Union des Républiques Socialistes Soviétiques (URSS), d'Hérelle travailla en collaboration avec Georgyi Eliava, un scientifique géorgien qui avait été autrefois son élève. Les deux chercheurs découvrirent ensemble plusieurs variétés de virus bactériens et travaillèrent sur le développement de bactériophages comme suspensions thérapeutiques utilisables contre diverses infections. L'Institut George Eliava, première institution au monde se consacrant à la phagothérapie et, actuellement, un centre de thérapie opérationnel, a été fondé en 1923 à Tbilissi, en Géorgie. La contribution de Félix d'Hérelle au développement de la phagothérapie dans cet institut y est reconnue comme majeure.

La thérapie par les phages en vint à devenir très populaire en France, en Allemagne et en Russie, suscitant rapidement l'intérêt des chercheurs et médecins de cette époque (Chanishvili, 2012). Différentes solutions de phages furent dès lors formulées et utilisées en dermatologie, ophtalmologie, urologie et en stomatologie (Beridze, 1938; Ruchko & Tretyak, 1936; Tsulukidze, 1938). Certaines compagnies se sont impliquées dans la production et la vente de comprimés ou de solutions phagiques destinés à combattre, notamment, les infections stomacales à *Escherichia coli*. L'exploitation des phages s'est étendue jusqu'aux États-Unis dans d'importants laboratoires pharmaceutiques dont Eli Lilly, Abbott et Parke-Davis and Company (Pfizer), qui les ont commercialisés comme agents antimicrobiens (Kutateladze & Adamia, 2008). Toutefois, en pleine progression dans son développement, la phagothérapie s'est vue délaissée progressivement suite à la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928. Un ralentissement des recherches sur l'emploi des phages en thérapie s'est enclenché parallèlement à l'essor de la production d'antibiotiques et à l'engouement que ces nouvelles molécules ont suscité dans le domaine médical. Les pays occidentaux se sont consacrés exclusivement à l'exploitation des antibiotiques, capables de cibler un large éventail de bactéries, au détriment des phages, qui sont beaucoup plus spécifiques. Le développement rapide et l'utilisation des antibiotiques entraînèrent la phagothérapie vers un déclin notable.

La seconde Guerre Mondiale a aussi contribué au ralentissement de la phagothérapie puisque les besoins imminents en traitements antibactériens ont favorisé la production massive des antibiotiques, plus stables et plus faciles à utiliser. Toutefois, même si l'utilisation des phages en thérapie a presque été totalement éclipsée durant plusieurs années, la recherche sur leur structure et sur leur fonctionnement biologique s'est malgré tout poursuivie dans les années 40 et 50. C'est au cours de cette période que la biologie moléculaire a connu d'importants développements et que le génome phagique et le rôle de l'ADN ont été éclaircis. Par ailleurs, l'observation des virus au microscope électronique et l'utilisation des phages comme outil de classification ont donné lieu à des avancées considérables en virologie et en bactériologie. Leurs caractéristiques morphologiques et la mesure de leur taille, en nanomètres, ont pu être déterminées (Dublanchet, 2008). Au cours des années 60 à 90, la lysotypie a permis de préciser davantage différents groupes bactériens. À plusieurs reprises, les phages ont été

utilisés pour aider à confirmer le genre et à identifier l'espèce chez de nombreuses bactéries. Les phages ont été, par exemple, d'une grande valeur dans la classification des *Bacillus* pour différencier notamment *Bacillus anthracis* et *B. cereus* (Ackermann & Dubow, 1987).

Seulement quelques pays dans le monde ont maintenu l'exploitation des phages en médecine en dépit de la découverte des antibiotiques. Deux instituts de recherche et de développement ont continué la production active de phages avec des visées thérapeutiques. Le Centre de microbiologie et de virologie Eliava, à Tbilissi, en Géorgie, est spécialisé dans le domaine de la phagothérapie depuis près de 100 ans et possède une collection de phages très importante, plus de 5000 (Eliavia, 2015). De par leur grande expertise, les phagothérapeutes géorgiens seraient en mesure de mieux contourner les infections récurrentes provoquées par des bactéries résistantes aux antibiotiques. Également, l'Institut Ludwik Hirszfeld, spécialisé en immunologie et en thérapie expérimentale, situé à Wroclaw, en Pologne, possède une unité de soins en phagothérapie. Dans le maintien de collections de phages pour des usages autres que thérapeutique, notamment la recherche et le typage, l'Institut Pasteur de Paris, en France, et le Centre de référence pour virus bactérien Félix d'Hérelle, de l'Université Laval, possèdent des banques de phages relatifs à une grande variété de bactéries.

La découverte des antibiotiques est sans contredit l'élément déclencheur d'un arrêt presque complet des expérimentations et de la recherche sur la phagothérapie. Au fil des ans, l'utilisation de ces antibiotiques a toutefois favorisé l'émergence de souches tolérantes capables de développer des stratégies de survie. Des travaux ont mis en évidence la diminution de l'efficacité des antibiotiques, dont certains étaient largement administrés chez les animaux d'élevage pour maintenir en santé les troupeaux de bétail. La surutilisation, les arrêts trop précoces et, parfois, les posologies inadaptées ont accéléré l'atteinte des limites de l'antibiothérapie. Une prise de conscience s'est amorcée au tout début des années 80 et, de nouveau, des expériences furent progressivement entreprises sur l'évaluation de la performance des phages en thérapie en vue de contourner la problématique de résistance bactérienne en recrudescence face aux antibiotiques. Des études effectuées sur divers animaux ont démontré que les traitements phagiques sont, dans certains cas, supérieurement efficaces à l'emploi d'antibiotiques. Des phages administrés à des veaux atteints d'une

infection létale causée par *E. coli* ont conféré un effet protecteur et curatif (Barrow *et al*., 1998; Smith & Hugging 1982 et 1983). Le comportement des bactériophages a également été réévalué lors des thérapies humaines, démontrant une efficacité contre des infections urinaires, des septicémies et des infections cutanées (Eliava, 2015). Plusieurs cas de guérison par les phages ont été répertoriés suite à des infections par des bactéries super ou multirésistantes aux antibiotiques, dont *Staphylococcus aureus*. Lors des traitements, les phages administrés circulent dans le système et leur présence a été détectée dans l'urine et dans le sang des patients rétablis (Dabrowska *et al*., 1987).

En raison de l'émergence de la résistance bactérienne et grâce aux progrès de la connaissance scientifique en virologie, un mouvement s'est fait sentir à l'échelle mondiale quant au bien-fondé d'exploiter les phages dans une vision plus élargie, entre autres dans les secteurs de la médecine, de l'agroalimentaire et de l'environnement. Devant le large éventail d'applications biotechnologiques des phages, plusieurs pays, dont le Canada, les États-Unis, la France et l'Allemagne, se sont lancés intensivement, depuis le début des années 2000, dans le développement d'agents biologiques à base de phages (Fig. 1.21). Une utilisation des phages, fortement encadrée et bien maîtrisée, peut représenter une alternative solide dans les traitements contre les contaminations bactériennes (Carlton, 1999).

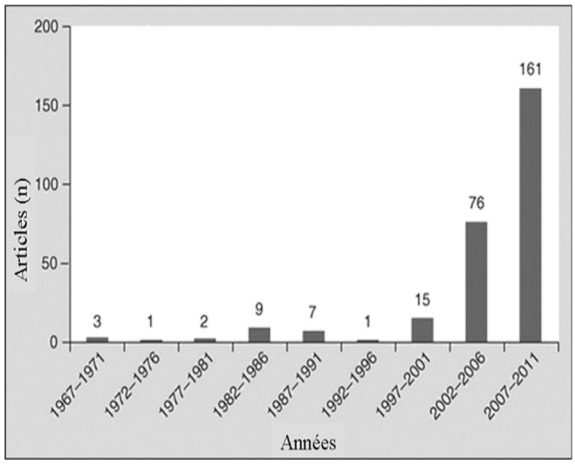



Figure 1.21. Études sur l'utilisation des phages en biotechnologie. (Ravat *et al*., 2015)

Les phages ont été et sont encore régulièrement utilisés pour identifier certaines bactéries et demeurent des outils utiles dans les études épidémiologiques (Audurier *et al*., 1984; Estela *et al*., 1992; Hagens & Loessner, 2007). Leur réplication est très intimement liée à celle des bactéries qu'ils infectent et, de ce fait, ils sont très nombreux dans notre environnement, l'estimation de leur population se chiffrant à plus de $10^{30}$ particules virales sur la planète (Breitbart, & Rohwer, 2005; Clokie *et al*., 2011). Depuis quelques années, un regain d'intérêt

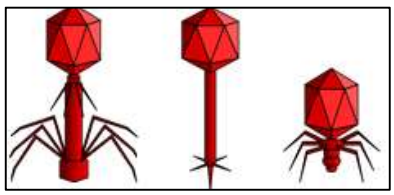
se manifeste autour de ce potentiel antibactérien visant principalement de nombreux pathogènes (El Haddad *et al*., 2014; Hagens & Loessner, 2010 et 2014; Sharma, 2013). L'attention des recherches est portée sur la capacité qu'ont les phages d'éradiquer les bactéries et sur l'étude de leur mécanisme d'infection à la fois naturel et adaptatif. Ces structures protéiques, au potentiel évolutif, peuvent faire face aux adaptations que les cellules hôtes établissent. En effet, les phages sont en mesure, pour assurer leur reproduction, de contourner les mécanismes de résistance des bactéries en cherchant des solutions pour parvenir à les infecter, ce que l'antibiotique ne peut réussir à faire. Les bactériophages évoluent en même temps que les bactéries se modifient et, combiné au fait que les phages sont extrêmement spécifiques, qu'ils ne peuvent affecter la flore intestinale comme le font les antibiotiques, qu'ils peuvent permettre de réduire l'usage de produits chimiques et affaiblir la formation de biofilms bactériens, cet avantage adaptatif renforce l'intérêt de leur exploitation comme agents antibactériens (García *et al*., 2010; Hughes *et al*., 1998; Iacumin *et al*., 2016; Roy *et al*., 1993). Ainsi, pour maximiser l'élimination des bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* et *Salmonella* dans le secteur agroalimentaire par exemple, de nombreuses recherches se concentrent sur l'étude des phages comme agents de conservation dans les aliments et comme agents bio-assainisseurs sur les surfaces solides.

### 1.7.2. Les listériaphages

Les toutes premières mentions des listériaphages remontent aux années 40 (Schultz, 1945; Sword & Pickett, 1961). Ce n'est toutefois que depuis 1985 que plusieurs espèces du genre *Listeria* sont reconnues comme étant parasitables par des phages. C'est à cette époque que des phages infectant *L. seeligeri* et *L. welshimeri* ont été isolés et répertoriés (Rocourt *et al*., 1985). Deux ans plus tard, la FDA a officiellement accepté le système phagique pour le typage de *L. monocytogenes* et la lysotypie, devenue rapidement une méthode d'identification internationale, a permis de détecter plusieurs *Listeria* pathogènes dans les aliments, chez l'humain et chez les animaux. Avec la découverte du phage A511, dans les années 90, le taux d'identification par le typage à l'aide de listériaphages est passé de 84 % à 90 %, améliorant de façon significative la détection (Zink & Loessner, 1992).

Rapport-Gratuit.com

Maintenant, les données génomiques compilées sur une variété de listériaphages permettent d'établir une meilleure vue de la biodiversité, de l'organisation du génome, des fonctions reliées aux gènes, des caractéristiques morphologiques ainsi que des modes d'infection empruntés par ces virus bactériens. Selon *l'International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), les phages de *Listeria* appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* (phages à queue, qui regroupent trois familles: les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae*), dont les représentants sont des virus à ADN bicaténaire, largement répandus dans la nature et caractérisés par la présence d'une tige caudale, contractile ou non (Ackermann & Dubow, 1987; Ackermann, 2011) (Fig. 1.22). Les listériaphages, à l'intérieur de cet ordre, sont regroupés dans deux familles: les *Myoviridae*, phages à queue contractile dont le biomécanisme est le plus complexe et les *Siphoviridae,* phages à queue non contractile dont les représentants sont les plus nombreux. Une étude américaine, effectuée à l'Université du Minnesota et publiée à la fin de l'année 2016, sur l'isolement, la caractérisation et l'évaluation du potentiel lytique des listériaphages, a fait mention pour la première fois de l'utilisation d'un listériaphage (LMB3) appartenant à la famille des *Podoviridae* (Akhtar *et al*., 2016).



*Myoviridae - Siphoviridae - Podoviridae*

Figure 1.22. Ordre *Caudovirales*. (Adaptée d'Ackermann, 1987)

Tous les listériaphages sont donc des virus à ADN bicaténaire et leur tête icosaédrique est constituée d'unités protéiques appelées capsomères. Les premières données précises rapportées sur les listériaphages associés à la famille des *Myoviridae* décrivent une capside de 61 nm et une queue de 231 nm de longueur. La description morphologique des *Siphoviridae* fait état d'une capside de dimension de 56 ou 62 nm avec une longueur de queue variant de 110 à 270 nm dont le diamètre est d'environ 10 nm (Chiron *et al*., 1977; Ackermann & Dubow, 1987). Progressivement, plusieurs autres listériaphages découverts et caractérisés dont le A511 et le P100 s'ajoutent aux tout premiers membres (4211, 2671, 2685, H387, et 2389). Des informations actualisées sur l'évaluation du diamètre de la capside, sur la longueur de la queue ainsi que sur les premiers recensements de la taille des génomes sont compilées dans le tableau 1.6. Les précisions apportées par la détermination des profils

génétiques des phages ont conduit à des remaniments taxinomiques importants visibles plus loin, à la figure 1.26. Jusqu'à maintenant, plus de 500 listériaphages ont été isolés et plus

Tableau 1.6. Premier état taxinomique des listériaphages (caractéristiques principales). (Adapté d'Ackermann, 2006) *A511, H387 et 2671 : phages utilisés dans cette thèse.

| Famille | Espèces | Autres membres importants | Taille approximative virion (nm) Diamètre : capside/ Longueur : queue | Taille approximative génome (kb) |
|---|---|---|---|---|
| ***Myoviridae*** | **A511** | P100 | 88 / 200 | 110-120 (125-140) |
| | 4211 | B054<br>01761 | 62-66 / 230-270 | 41-44 |
| | | | | |
| ***Siphoviridae*** | P35 | | 56-60 / 110 | 36 |
| | 2389 | PSA | 58-62 / 170-180 | 38 |
| | **H387** | | 58-62 / 190-200 | |
| | 2685 | B025 | 58-62 / 230-260 | 37-41 |
| | **2671** | A118<br>A500<br>A006 | 58-62 / 270-310 | 38-42 |

d'une quarantaine ont vu leur génome être séquencé. Grâce aux séquençages, à la réalisation de réseaux phylogénétiques et à la schématisation de liens évolutifs, la classification des listériaphages a fait des avancées notables depuis les dix dernières années. L'organisation génomique et le mécanisme de réplication de l'ADN sont grandement responsables des différences entre les membres des différentes familles (Anses, 2014). Les regroupements par similitudes génomiques et protéomiques, précisent et redéfinissent donc la taxinomie phagique qui reposait, autrefois, presque essentiellement sur la morphologie.

### 1.7.3. Matrice de similitude, arbre phylogénétique et organigramme

L'unification des données protéomiques disponibles sur les phages, combinée aux paramètres physicochimiques connus, ouvre la porte à des représentations organisationnelles et hierarchiques dans le domaine de la virologie bactérienne. La classification de tous les morphotypes de phages subit continuellement des remaniements, puisque à chaque nouveau génome disponible, de nouveaux liens évolutifs se définissent. En raison de l'absence chez les phages de gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, séquence génétique de référence utilisée pour établir des liens de parenté et déterminer les dérives génétiques dans



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

l'évolution des bactéries, la comparaison protéinique demeure actuellement le meilleur moyen d'établir des regroupements de similitude. Désormais, vu l'étendue des données protéiniques et génomiques à traiter, l'utilisation de logiciels bio-informatiques est nécessaire pour générer des matrices de similitude ainsi que des réseaux et des arbres phylogénétiques. À partir des banques de données génomiques publiques du NCBI, un plus grand nombre de protéines phagiques peuvent être comparées. L'analyse comparative de protéines de phages permet de faire des regroupements plus précis, de suivre leur évolution et d'établir une classification plus solide et fiable. Une matrice de similitude, réalisée à l'Université Laval, établissant des ressemblances entre 32 listériaphages, a été établie. Des regroupements basés sur des similarités protéomiques ont été générés et ils sont fortement comparables à ceux établis à l'intérieur d'un arbre phylogénétique réalisé en 2014 aux États-Unis (Denes *et al*., 2014). Selon la matrice, les phages de *Listéria* peuvent être classés dans cinq grands groupes positionnés dans des zones quadrangulaires dont la variabilité de l'intensité de couleur est directement liée au nombre de protéines partagées entre chacun des phages (Fig. 1.23). Plus l'intensité de la couleur, bleue dans le cas présent, est importante, plus les phages partagent des protéines similaires. Des alignements de séquences reliées évolutivement sont générés avec le programme BLASTp, qui effectue des recherches de régions homologues traduites ensuite en matrice de similitude (NCBI, 2016). Le logiciel CogSoft génère des groupes de gènes orthologues (COGs: Cluster of orthologous genes) et les regroupements produits permettent de déterminer la présence et l'absence de gènes codant pour des protéines spécifiques dans chaque génome. Une matrice binaire, dont la valeur 0 marque l'absence de la protéine analysée et 1 sa présence, est alors générée. Le coefficient de Jaccard, qui est quant à lui une mesure de similarité, a été déterminé: plus la valeur est près de zéro, plus la couleur de la matrice est foncée, plus les phages partagent des caractéristiques communes, plus ils sont similaires et plus ils sont donc génétiquement apparentés. Par exemple, la matrice de similitude positionne côte à côte les phages A511 et P100 dans un spectre appartenant à la famille des *Myoviridae* (Fig. 1.23).

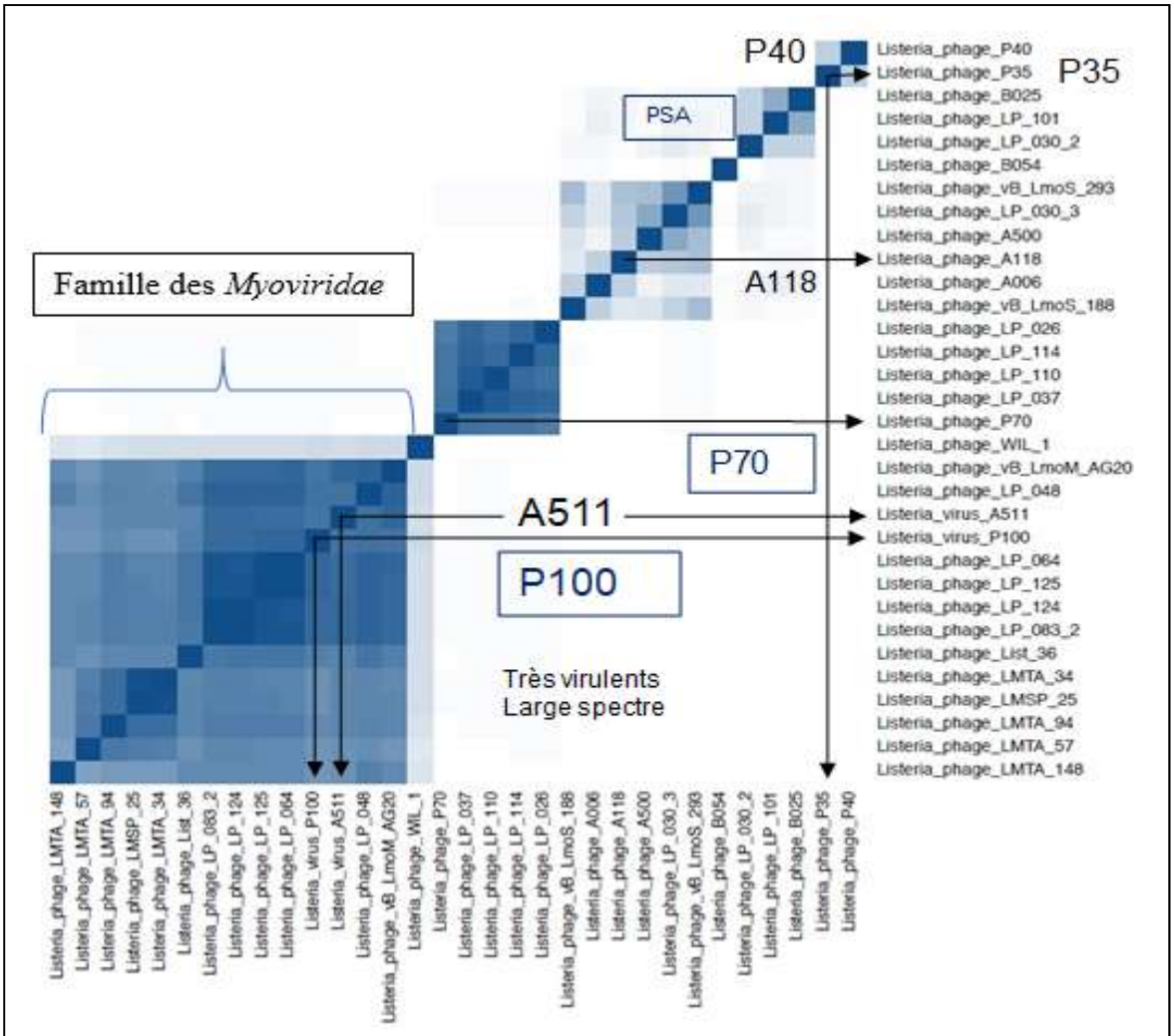



Figure 1.23. Matrice de similitude basée sur des rapprochements protéiniques de 32 listériaphages (Logiciel: CogSoft). Coll.: S. Labrie, *Ph.D.*; (U. L., 2017)

Les génomes des listériaphages caractérisés jusqu'à maintenant sont d'une taille variant de 30 à 140 kb (Klumpp & Loessner, 2013) et les capsides qui les contiennent sont dépourvues d'enveloppe lipidique. Tous les génomes des listériaphages sont en organisation modulaire. Les différents modules encodent : pour des protéines de structure; pour des protéines dont les fonctions sont reliées à la recombinaison, à la réplication et à la réparation de l'ADN; pour une cassette lytique contenant les gènes de la holine et de l'endolysine; et dans le cas des phages tempérés, pour une région de contrôle d'un système lysogénique impliquant des intégrases (Klumpp, & Loessner, 2013). Une étude portant sur l'analyse des gènes orthologues, sur le séquençage de génomes et sur la morphologie d'un groupe de listériaphages a démontré que ces virus peuvent être regroupés aussi en cinq groupes ayant

des similitudes génétiques apparentes (Fig. 1.24). L'arbre phylogénétique, produit par l'analyse de l'absence et de la présence de gènes orthologues, a subi une régénération en boucle au millième 1000 (1000 bootstrap replicates), permettant de donner un score de similarité et de ressemblance entre les acides aminés. L'équipe de recherche constituée de chercheurs canadiens, américains et thaïlandais a démontré que le regroupement numéro I est constitué de listériaphages de la famille des *Myoviridae* et caractérisés par un génome de

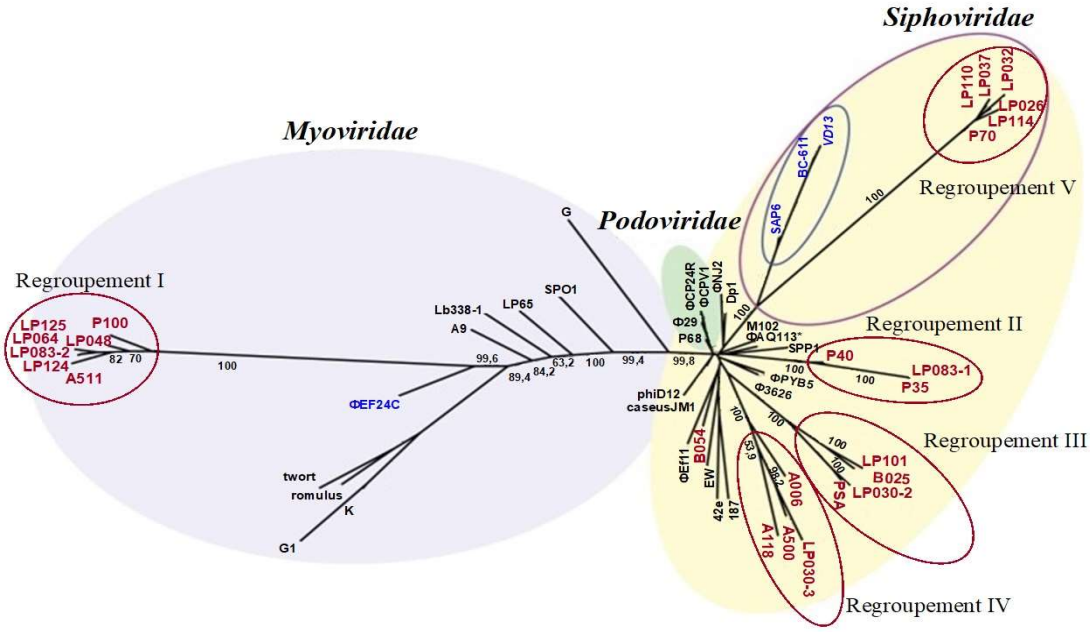



Figure 1.24. Arbre phylogénétique basé sur les gènes orthologues (listériaphages en rouge). (Adaptée de Denes *et al*., 2014)

grande taille (~135 kb), par un pourcentage G+C d'environ 36 % et par un système exclusivement lytique. Au centre de leur génome se trouve un module d'encapsidation de l'ADN de 30 kb de longueur. L'assemblage de leurs capsomères est de forme icosaédrique et est fixé à un collier (cou) de 10 nm de longueur. La queue, recouverte d'une gaine hélicoïdale, est d'une dimension moyenne de 206 nm par 18 nm de diamètre. Au bout de cette tige caudale se trouve une plaque basale hexagonale sur laquelle sont annexés des spicules de 10 nm de longueur et des fibres caudales qui servent de dispositifs d'arrimage (Fig. 1.25). En contraction, la queue se comprime à 90 nm x 25 nm et le phage présente alors une double plaque basale. Les groupements II, III et IV, de morphotype B1, contiennent des listériaphages appartenant à la famille des *Siphoviridae*, caractérisés par des génomes de plus

petite taille, de l'ordre de 36 à 43 kb. Deux importants représentants du groupe II, les listériaphages P35 et P40, sont des phages lytiques, tandis que les phages du groupe III, du genre PSA, sont des virus tempérés qui encodent pour une intégrase les amenant vers un cycle lysogénique. Les phages A118, A500 et A006 sont des représentants du groupement IV, caractérisés par une très longue tige caudale, qui peut contenir six spicules, et par leur système de lysogénie impliquant la présence d'une intégrase qui rend possible l'intégration de leur génome à celui de leur hôte à travers des sites spécifiques de recombinaison. Le groupe V contient également des phages de la famille des *Siphoviridae*, caractérisés toutefois par une capside très allongée, morphotype B3 (annexe 8), n'arborant aucun collier et contenant un génome d'environ 66 kb et un pourcentage G+C d'environ 33 % (Denes *et al*., 2014). Cette morphologie particulière et plutôt rare se retrouve également chez des phages d'*Entérococcus*, dont le phage VD13. Les phages du groupe P70 encodent pour des fonctions lytiques. L'organigramme de la figure 1.26 met en relation les différents regroupements et certaines caractéristiques concernant d'importants listériaphages. Ces phages infectent une très grande variété de souches de *Listeria* appartenant à différentes espèces et à divers sérovars. Les sérovars 1/2 et 4 de *L. monocytogenes* sont reconnus très sensibles aux phages; *a contrario*, les bactéries appartenant au sérovar 3 leur sont plutôt réfractaires (Klumpp & Loessner, 2013).

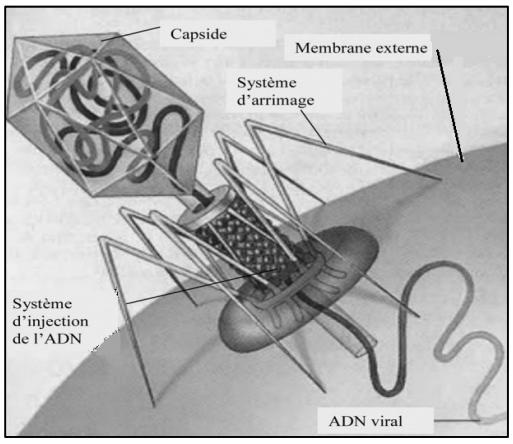


Figure 1.25. Structure d'un phage, famille *Myoviridae*. (Ravat *et al*., 2015)

### 1.7.4. Phages A511 et P100

Le listériaphage A511 possède une capside de 87 nm de diamètre et une tige caudale contractile d'environ 200 nm de longueur sur laquelle on retrouve une plaque basale, des fibres et des spicules. Ce phage est un représentant important du genre *P100* de la sous-famille des *Spounavirinae*, compris dans la famille des *Myoviridae* et appartenant à l'ordre des *Caudovirales* (Fig. 1.26). Les phages A511 et P100 sont morphologiquement indistinguables et ont une organisation génomique très similaire. La taille de l'ADN du phage

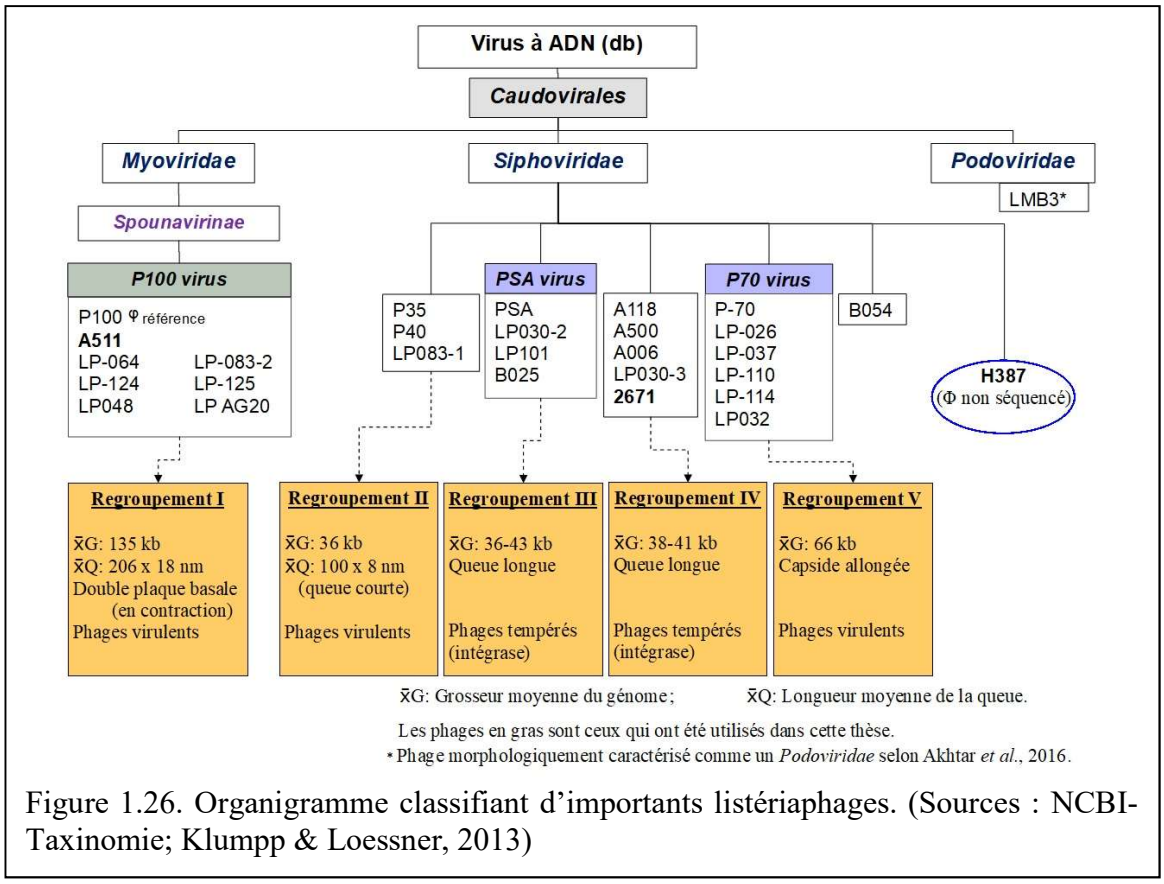



Figure 1.26. Organigramme classifiant d'importants listériaphages. (Sources : NCBI-Taxinomie; Klumpp & Loessner, 2013)

A511 est légèrement plus longue (de 3 kb) que celle du phage P100. Ces deux phages ont une forte homologie de séquences et beaucoup de caractéristiques comportementales communes, dont un large spectre d'action et une forte virulence (Klumpp *et al*., 2008). Ils adoptent un cycle lytique, ils ont une structure génomique fixe et invariable et ils ne sont pas en mesure de faire de la transduction spécialisée. Leur terminase reconnaît une séquence spécifique sur l'ADN et cette reconnaissance est nécessaire lors de l'étape de l'empaquetage du génome. Leur haut potentiel lytique est un critère d'importance fondamentale qui les rend aptes à entrer dans des formulations d'antimicrobiens. D'autres part, l'absence de transduction spécialisée qui les caractérise est un prérequis pour l'application biotechnologique des phages dans la lutte contre les bactéries pathogènes (Klumpp & Loessner, 2013).

### 1.7.5. Mécanisme d'infection du phage A511

La reconnaissance de la bactérie hôte par l'attachement à sa paroi est une étape critique menant à une infection phagique efficace. C'est pourquoi, par l'étude de la composition

protéinique de la tige caudale des phages, de même que par la compréhension des interactions entre leurs ligands et les récepteurs bactériens, on peut mieux choisir les phages potentiellement utilisables en biotechnologie (Roucourt & Lavigne, 2009). Présents en surface des bactéries, les acides téichoïques qui se lient de façon covalente à la couche de peptidoglycane sont des molécules majeures et souvent impliquées dans les mécanismes d'attachement des phages à la paroi cellulaire. Les unités glucidiques qui y sont rattachées servent d'ancrage. Le spectre d'infection des phages est donc fortement influencé par la compatibilité des virus avec la chaîne de polyribitol-phosphate (RboP) contenant différents carbohydrates, et c'est cette affinité des ligands phagiques avec les récepteurs bactériens qui assure l'étape de l'adsorption. Lorsque cette première manoeuvre est réussie, elle est suivie par la libération, à l'extrémité de la queue des phages, d'une hydrolase à peptidoglycane assurant la perforation de la paroi et permettant l'injection de l'ADN.

Ainsi, chez les listériaphages, l'attachement à la cellule hôte se crée lors d'un premier contact avec les sucres de la chaîne de RboP, complexe moléculaire qui constitue l'acide téichoïque et qui est enchâssé à travers la structure du peptidoglycane des *Listeria*. Ce sont des protéines spécifiques présentes sur la plaque basale (Gp108) et sur l'épine centrale (Gp98, Gp99) du phage A511 qui interviennent lors de l'étape de l'adsorption à la paroi (Fig. 1.27). Par exemple, la Gp108, en reconnaissant le N-acetylglucosamine et le rhamnose, permet au phage de faire une connexion essentielle qui le conduit à la première étape de l'infection (Habann *et al*., 2014). Les protéines de liaison (*Receptor Binding Protein*; RBP) spécifiques aux récepteurs situés à la périphérie de la bactérie assurent l'attachement de la tige caudale et, lorsque le lien est établi, le phage peut procéder à la perforation de la paroi. L'ADN linéaire contenu dans la capside du phage est ensuite injecté en passant par l'axe central de la queue. Lorsque le phage entame un cycle d'infection lytique, la transcription et la réplication du matériel génétique du virus s'effectuent

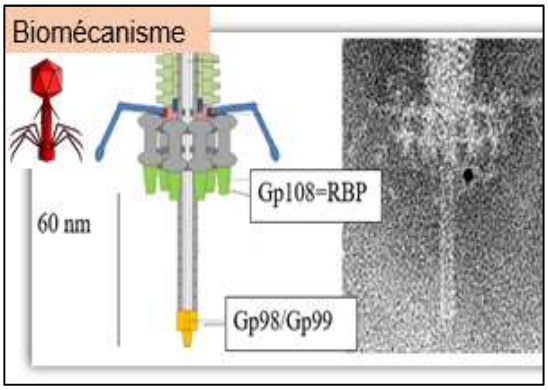


Figure 1.27. Plaque basale du phage A511. (Adaptée de Habann *et al*., 2014)

subséquemment, via le mécanisme de synthèse de la cellule infectée qui a été prise d'assaut. Suite à la formation et à l'assemblage des particules virales, le peptidoglycane de la paroi bactérienne subit une dégradation sous l'action d'enzymes hydrolytiques. Les holines endommagent d'abord la membrane par dépolymérisation, fragilisent les liaisons de structure et provoquent des ouvertures qui donnent un meilleur accès aux endolysines, qui entament ensuite une dénaturation, plus importante, du peptidoglycane. On assiste ensuite à la lyse cellulaire et à la libération de plusieurs virions (Catalão *et al*., 2013).

### 1.7.6. Cycles : lytique et lysogénique

Lors du processus d'injection de l'ADN phagique dans le cytoplasme bactérien, deux cycles sont possibles, celui qualifié de voie lytique, associé à un phage virulent (parasite actif), ou celui du système lysogénique, associé à un phage tempéré (parasite latent) (Fig. 1.28). Le mode d'infection des phages se divise donc en deux programmations qui sont reliées au cycle adopté par le virus lui-même. Dans le cycle lytique, les gènes qualifiés de précoces reprogramment d'abord la machinerie bactérienne en prenant le contrôle des activités métaboliques de la cellule et en les détournant pour induire la réplication de l'ADN phagique. Les gènes phagiques intermédiaires vont prendre la relève et coder pour la réplication de l'ADN viral. Les gènes tardifs vont ensuite effectuer la synthèse des différents modules

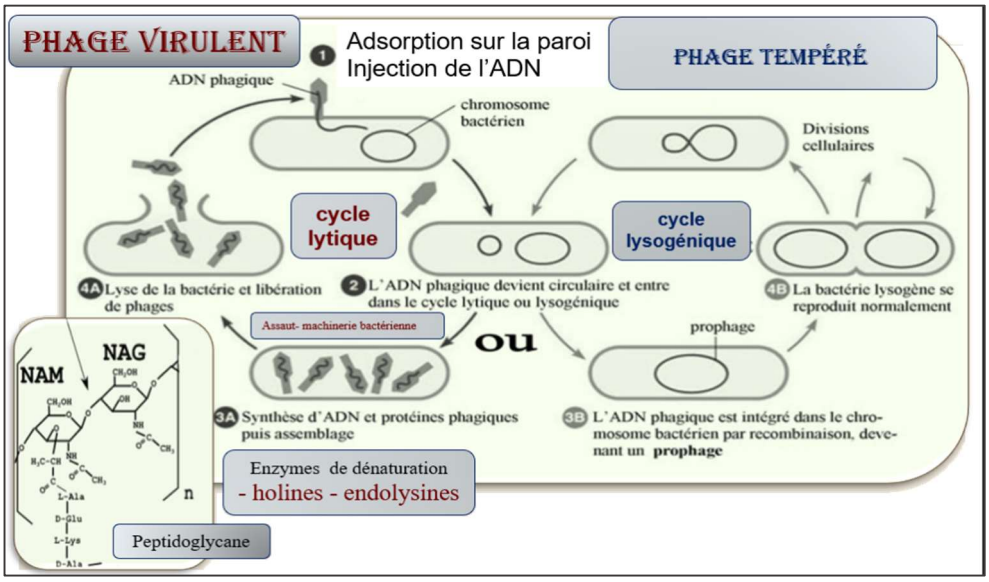



Figure 1.28. Cycles lytique et lysogénique. (Adaptée de Microbiol. médicale.fr.)

phagiques (tels que la capside, la queue et autres protéines structurales), induire l'encapsidation de l'ADN, ainsi que la production des holines et des endolysines. L'étape de l'encapsidation s'effectue à l'aide d'une terminase qui coupe l'ADN en vue de l'introduire dans la procapside. Deux procédures d'encapsidation peuvent s'observer, l'une relevant d'un processus appelé « *pac* », qui se termine lorsque l'espace dans la procapside est saturé. La fragmentation de l'ADN par la terminase a lieu à un endroit indéterminé formant des chaînes (concatémères) de longueurs variables engendrant des extrémités redondantes. *A contrario*, les phages dont l'encapsidation commence et se termine par une coupure dans la séquence « *cos* » produisent des segments déterminés. Dans ce type d'empaquetage, le lieu du clivage a lieu sur un site précis reconnu par la terminase, engendrant des génomes aux extrémités cohésives, donc précises et invariables. Suite à l'encapsidation du matériel génétique, la maturation du phage se poursuit par le processus d'assemblage de chacune des parties des virions et les enzymes produites débutent leur action hydrolytique (Fig. 1.29).

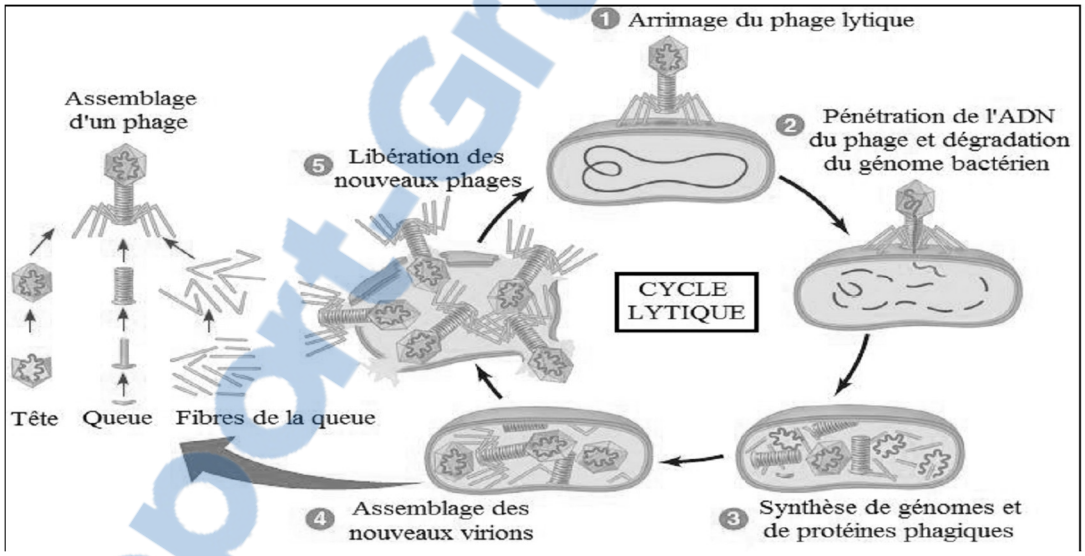



Figure 1.29. Cycle lytique (formation et libération des phages). (Adaptée de Chen, 2008)

Le montage des différentes pièces phagiques, l'affaiblissement de la membrane et de la paroi par les holines et les endolysines rendent imminente la lyse de la cellule. L'opération de démantèlement prend alors forme, les holines se lient à la membrane bactérienne et provoquent, comme mentionné précédemment, une dépolymérisation qui est responsable de la perforation membranaire. Les liens osidiques fragilisés et les brèches formées affectent grandement la structure membranaire et facilitent, par le fait même, la dispersion des

Rapport-Gratuit.com

endolysines dont le rôle est de dénaturer le peptidoglycane par hydrolyse. La réplication intracellulaire des phages, combinée à l'action des enzymes lytiques, provoque inévitablement l'éclatement de la cellule et le dispersement des particules phagiques dans le milieu extracellulaire. La lyse bactérienne a lieu, en moyenne, plus d'une vingtaine de minutes après l'infection. Dans des conditions optimales, l'amplification virale est relativement courte et le processus s'effectue sur plusieurs bactéries en même temps, entraînant une importante libération simultanée de virions. La propagation virale est très souvent bien plus productive que la multiplication bactérienne et la population microbienne est rapidement dépassée et ravagée par ces attaques (Pirisi, 2000). Les nouveaux virions demeurent disponibles pour infecter les bactéries avoisinantes, enclenchant à répétition le cycle lytique. C'est ce processus qui est profitable et exploitable dans les domaines de la phagothérapie, de la phagoprophylaxie alimentaire et du phagoassainissement. La quantité de particules virales relâchées (burst size), en plus d'être directement reliée au type de phage et à la machinerie bactérienne impliquée, est souvent variable selon les conditions de croissance de la bactérie, les éléments nutritifs disponibles dans le milieu et selon plusieurs facteurs environnementaux, dont le pH et la température (Wittebole *et al*., 2014). Dans la voie lytique le phage détourne directement les activités métaboliques de la cellule pour sa propre réplication. Il est ainsi considéré comme un parasite actif qui se multiplie jusqu'à l'épuisement des ressources bactériennes présentes dans son environnement immédiat.

Le cycle lysogénique, quant à lui, dérive d'une infection causée par un phage tempéré apte à intégrer son ADN dans le chromosome bactérien et pouvant alors demeurer en état de latence dans le génome de l'hôte. Le système de programmation des phages tempérés détient les fonctions génétiques requises pour l'incorporation de leur génome à celui de la bactérie. Ce phénomène peut conduire à un mécanisme de transfert horizontal de gènes de virulence ou de résistance dans le système bactérien. Le phage est alors reconnu comme le vecteur de l'acquisition de facteurs évolutifs par transduction (Wittebole *et al*., 2014). À travers ce cycle phagique, la bactérie survit et se reproduit normalement en transmettant l'ADN phagique à chaque cellule fille au fil des générations. Puisque les phages tempérés peuvent conférer de nouvelles propriétés fonctionnelles aux bactéries, ils ne sont pas de bons candidats dans la formulation de solutions antimicrobiennes (Ravat *et al*., 2015). En revanche, ils sont des

outils précieux en biologie moléculaire pour modifier les génomes bactériens. Les intégrases responsables de leur intégration sont de types recombinase-sérine ou recombinase-tyrosine. Les bactéries qualifiées de lysogènes possèdent dans leur génome le virus *in vivo*, que l'on nomme alors prophage et le microorganisme peut être qualifié de porteur sain. Le virus se propage passivement durant la multiplication bactérienne et se libère de la cellule uniquement si les conditions physico-chimiques le permettent. Lors de la division cellulaire, la bactérie transmet le caractère létal potentiel à sa descendance. Dans certains cas, la présence d'un virus latent dans le chromosome bactérien protège la cellule contre l'attaque de certains phages en empêchant l'infection par d'autres virus apparentés.

Toutefois, l'équilibre du complexe prophage/bactérie étant instable, il peut être perturbé par divers facteurs externes tels que des variations de pH, des chocs thermiques, des expositions aux rayons UV, ou encore des expositions aux antibiotiques, dont la mitomycine C (Loessner *et al*., 1991a). Ces états de stress peuvent engendrer le phénomène d'induction qui conduit à l'excision du matériel génétique, libérant alors le prophage. Cette libération permet au phage d'entamer un cycle lytique par mobilisation des fonctions métaboliques de la bactérie. Cette reprogrammation enclenche un mécanisme de virulence qui mène à l'autoréplication du phage, à la lyse de la bactérie et à la libération de virions. À ce stade, les virus à caractère tempéré peuvent plus facilement être détectés dans le sol, l'eau, les plantes et dans tous les endroits pouvant favoriser la croissance des bactéries.

### 1.7.7. Résistances (physique, chimique) et stabilité des phages

À l'état libre, tous les phages se mobilisent aux mêmes endroits que leurs hôtes bactériens. Bien que les environnements humides et chauds soient considérés comme les endroits les plus propices à héberger les bactéries et leurs parasites, les phages peuvent très bien se répliquer dans des milieux salins et légèrement acides. En effet, si les cellules hôtes sont résistantes à ces types d'écosystèmes, les phages qui leur sont spécifiques le seront également. Les phages ont une résistance physique supérieure aux bactéries et une ténacité plus élevée envers les stress physico-chimiques tels que les hautes pressions, les températures élevées, les variations importantes de pH, le niveau d'oxygénation et la présence de substances chimiques concentrées. Plusieurs phages peuvent survivre des semaines, voire des



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

années, dans des milieux hostiles (aqueux ou non). Ainsi, les bactériophages supportent davantage les changements climatiques et chimiques de l'environnement que leurs hôtes. Cependant, ils ne se retrouvent qu'aux endroits où leurs victimes sont capables de survivre (Ackermann, 1987). De nombreux phages demeurent virulents malgré une exposition à une température supérieure à 60°C, à des rayons ultra-violets, à de multiples expositions aux antiseptiques et à des milieux alcalins ou acides (Dublanchet, 2009; Roy *et al.*, 1993). La vitesse de leur inactivation dépend de la nature de la capside et de l'altération que subit le génome du phage. Bien que quelques études soulignent l'influence de la température sur l'activité de certains listériaphages, peu d'analyses ont été réalisées sur le sujet (Jasinska, 1964; Iacumin *et al*., 2016).

Des études portant sur la stabilité des phages aux agents chimiques démontrent que les virus possédant une enveloppe lipidique sont sensibles au chloroforme, car ce solvant dissout les graisses et altère par conséquent la structure des phages. *A contrario*, grâce à leur structure de nature essentiellement protéique, les listériaphages ne sont pas affectés par un traitement au chloroforme. Les listériaphages étant dépourvus d'enveloppe lipidique, il est même possible d'utiliser le chloroforme pour purifier les solutions contaminées par des bactéries hôtes (Ackermann, 1987). Les listériaphages sont modérément résistants aux rayons UV et à la mitomycine C, deux agents utilisés pour libérer les prophages présents dans les chromosomes bactériens. Toutefois, la dose et la concentration sont des facteurs qui influent sur leur tolérance. Certains phages sont résistants à l'éther diéthylique et au toluène, des solvants organiques qui inactivent les mêmes types de phages que le chloroforme. La majorité des phages sont par ailleurs tolérants à l'éther de pétrole et à la trypsine peptidase du suc pancréatique. Bien que les bactériophages soient surtout conservés dans des tampons neutres (pH 7), ils sont, en général, résistants à des pH se situant entre 5 et 9. Les phages ne semblent pas affectés non plus par les chocs osmotiques et la sonification (Ackermann, 1987). Des tests sur l'exposition à l'ammonium quaternaire ont démontré que les listériaphages tolèrent des concentrations de 50 ppm de Quatal pendant plus de 3 heures (Roy *et al*., 1993).

### 1.8. Biocontrôle par les phages : propriétés caractéristiques et critères de sélection

Les bactériophages virulents sont utilisables en tant qu'agents antimicrobiens dans le traitement de certaines infections, dans le développement d'agents de conservation spécifiques (phagoadditifs) et dans l'élaboration de bio-assainisseurs écologiques. Ces particules protéiques sont en voie d'être intégrées dans plusieurs applications de phagoprophylaxie, et ce grâce aux études scientifiques réalisées, associées aux progrès des connaissances sur leurs mécanismes d'infection. *Ipso facto*, on constate que plusieurs entreprises et départements de recherche dans le monde travaillent au développement de solutions écologiques alliant bio-médicaments, bio-additifs et bio-assainisseurs, toutes des voies naturelles que peuvent offrir les bactériophages. Puisque des compagnies commercialisent désormais les phages pour des utilisations thérapeutiques ou pour des usages de contrôle en agroalimentaire, leur certification est une étape importante assurant leur innocuité. Pour répondre aux exigences d'agents de biocontrôle et devenir des candidats destinés à des utilisations dans les domaines de l'agroalimentaire et de l'assainissement notamment, les phages doivent être méticuleusement caractérisés. Les propriétés rendant un phage règlementaire et compétent dans le secteur agroalimentaire sont nombreuses (annexe 9).

Le premier critère d'importance qu'un phage doit posséder est le caractère strictement lytique. Idéalement, il doit avoir un large spectre d'action lui permettant d'infecter plusieurs souches de l'espèce ciblée. Il importe qu'il ait une stabilité reconnue face à diverses conditions inhospitalières, c'est-à-dire une résistance aux variations de température, de pH, de pression et d'oxygénation. Il est aussi nécessaire qu'il démontre une stabilité à l'entreposage. Par ailleurs, afin d'éviter qu'il ne s'approprie et transmette des gènes de virulence, il est essentiel qu'il soit propagé à partir de souches non pathogènes. Son génome doit avoir été séquencé, pour démontrer son incapacité à effectuer une transduction spécialisée et pour révéler son absence de gènes pouvant encoder certaines toxines ou des facteurs de pathogénicité transmissibles aux bactéries (Hagens & Loessner, 2010). Des études doivent avoir démontré que son ingestion n'entraîne aucun effet indésirable ou secondaire. Finalement, la possibilité de le produire à l'échelle industrielle et l'obligation d'un statut alimentaire officiel qualifié de GRAS sont obligatoires.

À la manière des antibiogrammes, réalisés pour sélectionner les antibiotiques les plus performants ou les souches les plus sensibles vis-à-vis un antibiotique, la réalisation d'un phagogramme ou d'un spectre lytique est une étape déterminante lors du choix d'un phage (Fig. 1.30). Cette procédure de sélection repose sur la préparation de plusieurs suspensions de phages à concentrations diverses ou fixes, selon l'analyse. La bactérie visée est cultivée sur une gélose nutritive et une goutte de chaque suspension phagique est déposée sur un tapis bactérien préalablement étoilé ou quadrillé. Après incubation, on observe des plages de lyse, zones claires sur la gélose, qui qualifient les meilleurs phages et concentrations à utiliser.

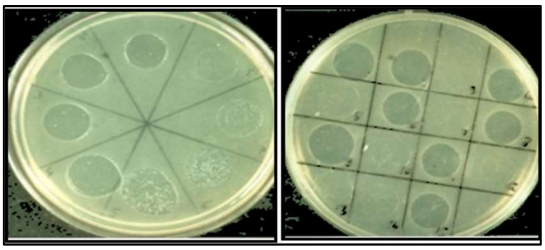


Figure 1.30. Phagogrammes : *L. monocytogenes* (B. Roy, tests préliminaires)

### 1.8.1. Santé publique, innocuité et sécurité

Pour déterminer l'innocuité d'un produit antimicrobien chez un organisme, il faut d'abord comprendre les voies naturelles d'élimination le concernant. Ainsi, des détections de bactériophages dans l'urine ou dans les fèces ont été rapportées après l'administration orale de suspensions phagiques à des veaux (Smith *et al.*, 1987). Des études portant sur des coliphages T4 administrés oralement à des humains ont démontré une élimination par déjection et par les liquides organiques (Bruttin & Brüssow, 2005). Des observations de microscopie électronique démontrent que les cellules dendritiques phagocytent les bactériophages et permettent leur élimination dans l'organisme (Barfoot *et al.*, 1989). Les réactions immunitaires, se manifestant par une activité accrue des macrophages, des polynucléaires et des lymphocytes en présence de phages, sont encore à l'étude, mais il est démontré que les phages peuvent être digérés par l'organisme ou éliminés dans l'urine ou les selles. Aucune toxicité directement liée à leur constitution protéinique n'a été associée aux phages jusqu'à maintenant. Ces particules constituées essentiellement de protéines et d'acides nucléiques ne sont spécifiques qu'aux bactéries. Le virus (phage) étant digestible au même titre que n'importe quelle protéine ou autre molécule organique, il peut être éliminé par le système digestif comme d'autres substances biologiques complexes. Les métabolismes des humains et des animaux éliminent ou digèrent régulièrement ces particules comme ils le font

avec d'autres types de protéines. Grâce à leur très haute spécificité, l'utilisation des bactériophages comme adjuvant n'affecte pas la flore intestinale. Le fait que nous vivons constamment en leur présence et que nous les ingérons, avec les aliments et les liquides que nous consommons, constitue une expérimentation quotidienne qui témoigne d'une innocuité. En effet, une grande variété de phages sont ingérés quotidiennement par les humains et les animaux du fait que tous les produits de consommation n'ayant subi aucun traitement thermique intense et qui, à l'origine, étaient contaminés par des bactéries sont susceptibles d'abriter des bactériophages. Les fromages commerciaux en sont des exemples puisque ces produits contiennent différentes concentrations de phages de lactocoques (Kawabata *et al*., 1997) et ces derniers sont ingérés en même temps que les bactéries lors de la consommation des produits. Par ailleurs, le fait que la surface de notre corps et l'intérieur de nos intestins contiennent une quantité phénoménale de phages confirme que leur présence est profitable autant pour la stabilité du monde bactérien que pour l'équilibre du nôtre. Les phages jouent un rôle fondamental dans la régulation des populations bactériennes au sein même de l'organisme humain. Une étude menée par le Centre de Recherche de Nestlé, en 2005, sur des volontaires à qui des solutions phagiques (T4) ont été administrées, a démontré que l'organisme a une bonne tolérance à l'administration de phages (Bruttin & Brüssow, 2005). L'innocuité du listériaphage P100 a été démontrée chez le rat suite à l'absorption orale des virions à de fortes concentrations (Carlton *et al*., 2005). En l'absence de bactéries, il ne peut y avoir de réplication phagique. Le bactériophage a besoin d'une cellule bactérienne correspondante et, dans cette mesure, il est tout à fait incapable d'utiliser une cellule eucaryote pour assurer son autoréplication. Ainsi, sans bactérie hôte, les phages ne peuvent se reproduire et sont éliminés après un certain temps, si aucune autre cellule procaryote sensible ne se trouve dans les environs.

### 1.8.2. Approbations gouvernementales et commercialisation des phages

Les phages font partie de notre environnement et leur innocuité est démontrée expérimentalement depuis plus de 90 ans à travers de nombreuses phagothérapies réalisées notamment au centre Eliava, en Géorgie. Ils ont été, pour des motifs thérapeutiques, dispersés dans l'organisme humain par contacts directs avec des plaies ouvertes, par voie orale et quelquefois par injections (Bruttin & Brüssow, 2005; Dabrowska *et al*., 2000). Les phages

sont de plus en plus commercialisés pour répondre à des utilisations thérapeutiques, à des usages environnementaux et à des procédures de contrôle en agroalimentaire. À cet effet, dans le secteur de l'environnement, suite à une autorisation par l'EPA (agence de la protection environnementale américaine), un biopesticide (phagopesticide) composé de deux phages a été mis sur le marché en 2002 par la compagnie Omnilytics pour contrôler deux pathogènes de plantes, *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae* (Goodridge & Bisha, 2011). La compagnie canadienne Phagelux Inc., producteur d'agents antibactériens, a fait l'acquisition, en 2015, d'Omnilytics, située à Salt Lake City. L'entreprise œuvre en recherche et développement, notamment sur l'utilisation des phages pour le contrôle des pathogènes en agriculture, en alimentation et en assainissement. L'entreprise élabore d'autres produits à base de phages dont l'AgriPhage-CMM, traitement naturel destiné au contrôle d'une infection de plants de tomates causée par *Clavibacter michiganensis*, le microorganisme responsable du chancre bactérien. Le produit, appliqué par pulvérisation, a été autorisé par Santé Canada en 2012 (Santé Canada, 2012).

L'utilisation des phages comme agents technologiques ou additifs alimentaires s'étend dans le secteur agroalimentaire (Hudson *et al*., 2005; Sulakvelidze, 2013). L'emploi des phagoadditifs est devenu un créneau qui subit d'importantes avancées (Kazi & Annapure 2016; Mills *et al*., 2017). L'effet protecteur des phages sur une grande variété de produits alimentaires a été démontré par diverses recherches (Greer, 1986; Guenther *et al*., 2009; Rossi *et al*., 2011, Silva *et al*., 2014). Leur exploitation vise notamment l'élimination des germes se développant dans les aliments et pouvant entraîner des risques d'intoxications alimentaires (Hagens & Loessner, 2010). Les phages sont désormais utilisés dans les denrées comme agents de conservation spécifiques et leur intégration dans divers types d'aliments est de plus en plus autorisée dans plusieurs pays.

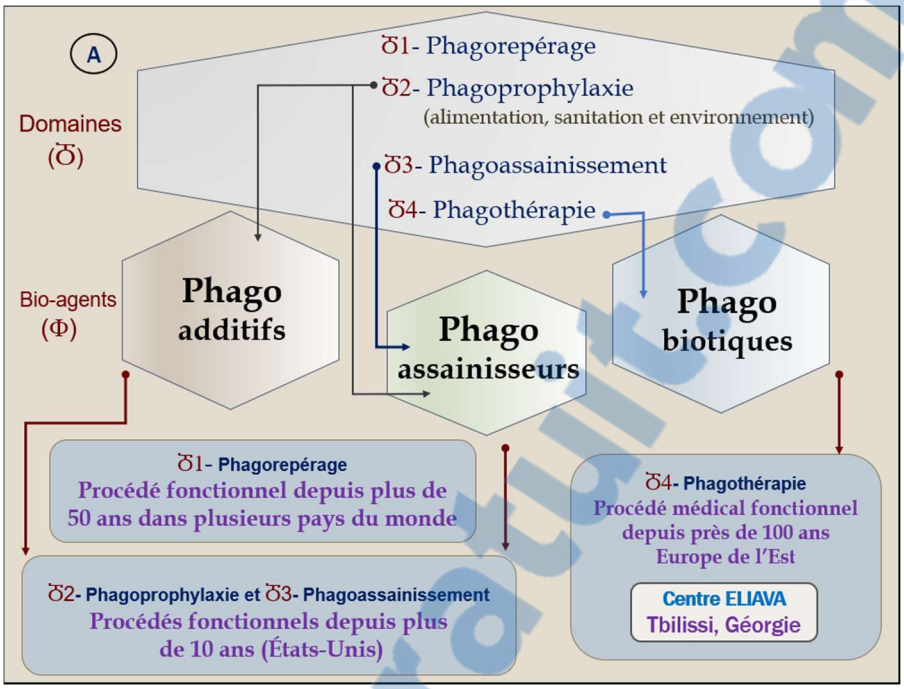
La compagnie Intralytix, fondée en 1998 et située à Baltimore aux États-Unis, produit des cocktails de phages utilisables directement sur les aliments pour prévenir et ralentir la croissance de certaines bactéries. Leurs solutions phagiques ont été reconnues inoffensives et ont obtenu la mention GRAS qui certifie leur innocuité. Ces phagoadditifs peuvent être vaporisés sur plusieurs aliments, n'altérant ni leur goût ni leur couleur. Des formulations à

base de six bactériophages ont été autorisées comme adjuvants alimentaires ou agents technologiques et ces produits peuvent également être appliqués sur certaines surfaces retrouvées en industrie agroalimentaire (Intralytix, 2017). La FDA et la USDA ont approuvé l'emploi, dans les aliments, des produits ListShield™ contre *L. monocytogenes* en 2006, EcoShield™ contre *E. coli* O157:H7 en 2011 et SalmoFresh™ contre la Salmonelle en 2013 (USFDA, 2006 et 2014). Intralytix produit aussi ListPhage™ contre *L. monocytogenes* dans la nourriture pour animaux domestiques.

Toutes les solutions de phages approuvées sont utilisées dans de nombreux pays, dont les États-Unis, le Canada, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, la Suisse et Israël (Intralytix, 2017; Phageguard, 2016). Ces produits sont autorisés aussi en France et en Allemagne, pourvu que les exigences à la règlementation sur la sécurité alimentaire soient respectées (Von Jagow & Teufer, 2007). Dans la même année que l'approbation du produit ListShield™ d'Intralytix, la FDA a approuvé la solution Listex™ P100, développée en Hollande par la compagnie Micreos Food Safety - PhageGuard. Le produit est aussi qualifié d'agent inoffensif et sécuritaire dans les aliments et a obtenu la certification GRAS (Bull. Agric., 2007; USFDA, 2006). L'entreprise, fait la promotion de l'utilisation des phages comme agents technologiques en vue de renforcer la sécurité alimentaire. Anciennement connue sous le nom EBI Food safety, elle offre des produits de contrôle naturels pour lutter contre les pathogènes dans les aliments et sur les surfaces. L'entreprise conçoit des antimicrobiens biologiques dont le Listex™ et le Salmonelex™, utilisables comme agents de conservation spécifiques contre les *Listeria* et les *Salmonella.* Le Listex™ P100 est utilisé notamment sur le poisson, les viandes, le fromage et les végétaux, afin de prévenir le développement de *L. monocytogenes*. Le listériaphage P100 qu'il contient possède un fort pouvoir listéricide, un très large spectre d'action et permet d'inhiber complètement la bactérie, entre autres sur des filets de saumon cru (Soni & Nannapanei, 2010a). Ce phage, utilisé à haute concentration ($10^8$ PFU/g, MOI 10 000), est particulièrement stable, même dans des situations environnementales défavorables, et très peu de souches lui sont résistantes (Fister *et al*., 2016a et b; Soni & Nannapaneni, 2010a et b). Selon les procédures d'application de la compagnie, les bactériophages P100 utilisés pour les produits alimentaires doivent être appliqués en large excès par rapport à la bactérie ciblée. La multiplicité d'infection

nécessaire, de l'ordre de $10^4$, correspond par exemple à $10^7$ phages /$cm^2$ pour $10^3$ UFC/$cm^2$ de *Listeria*. Des concentrations de phages allant jusqu'à $10^9$ UFP/g pourraient être utilisées, selon le dossier technique, afin d'assurer une efficacité significative. D'autres compagnies emboîtent le pas dans la recherche, le développement et la commercialisation des phages pour diverses applications (ISVM, 2017). La phagothérapie, la phagoprophylaxie alimentaire (phagoadditifs), le phagoassainissement, la phagodétection et même les phages utilisés pour le bénéfice de l'environnement sont désormais des domaines de recherche de plus en plus explorés en santé publique.

### 1.8.3. Utilisations des bactériophages : classement par domaines (schéma synoptique)



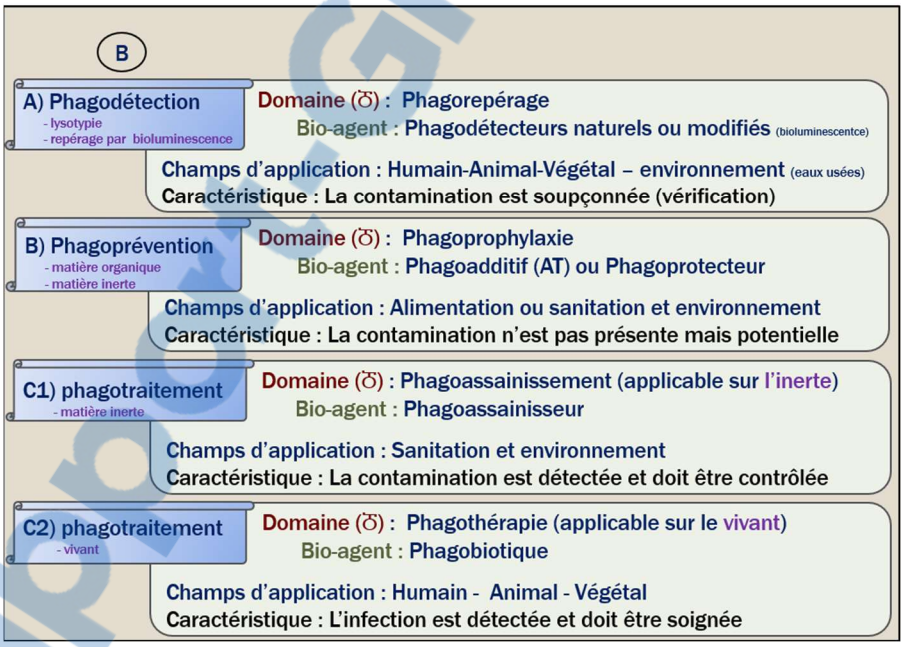




Figure 1.31. (A) Différents domaines (ð) d'utilisation des bactériophages (Φ). (B) Types de phagocontrôle. Néologismes et terminologies entrant dans un protocole. Identification des **domaines**, des **bio-agents**, des **champs d'application** et des **caractéristiques** de l'infection ou de la contamination suivant **quatre types de biocontrôle** : phagodétection (type A); phagoprévention (type B); phagotraitements (types C1 ou C2). AT : agent technologique. B. Roy 2018.

RapportGratuit.com

### 1.8.4. Domaines : phagorepérage et phagoprophylaxie alimentaire (phagoadditifs)

Le domaine du phagorepérage utilise des phages pour la détection de bactéries présentes sur des organismes vivants ou sur des surfaces inertes, dès lors qu'une contamination est suspectée. Il permet souvent de mieux comprendre et de compléter le suivi d'une épidémie ou d'une éclosion bactérienne. Ce domaine s'intègre dans un type de biocontrôle qualifié de phagodétection. La phagodétection classique, c'est-à-dire la lysotypie révélant la présence de bactéries par des zones de lyse sur un tapis bactérien, fait intervenir des phages naturels. Ce procédé est utilisé régulièrement dans différents laboratoires depuis plusieurs dizaines d'années. Tandis que la phagodétection adaptée, impliquant notamment le marquage bioluminescent en utilisant des phages transformés qui signalent la présence de bactéries par l'émission de lumière, en est à ses débuts. Les bio-agents employés en phagorepérage sont des phagodétecteurs (phages) naturels ou génétiquement modifiés (Fig. 1.31).

La phagoprophylaxie est un domaine englobant les secteurs alimentaire, sanitaire et environnemental. Elle est reliée à une situation de contamination potentielle. Ce domaine s'intègre dans un type de biocontrôle qualifié de phagoprévention. La phagoprophylaxie représente en effet une voie biopréventive, profitable notamment pour la préservation des denrées comestibles. On constate que les tissus alimentaires ne sont pas affectés par la présence de bactériophages. À l'inverse, leur présence peut contribuer à protéger les fibres alimentaires en inhibant ou en éliminant les bactéries qui y prolifèrent. Comme nous l'avons vu précédemment, des formulations de phagoadditifs, assurant l'innocuité des aliments, sont en développement et certaines sont déjà autorisées. L'ensemble des études portant sur l'efficacité des listériaphages A511 et P100 sur la réduction des contaminations démontre que leur potentiel d'action dépend directement de la structure matricielle, de la concentration initiale en bactéries et de la dose de phages appliquée (Sulakvelidze, 2013). Les phages A511 et P100 répondent aux nombreux critères de base pour être de bons agents de biocontrôle. Ils sont strictement virulents, ils possèdent un large spectre d'action, ils ne peuvent se convertir en prophages et, *ipso facto*, ne peuvent effectuer de transduction spécialisée. Le phage P100 démontre un spectre un peu plus étendu que le phage A511 sur diverses souches de *Listeria* (Klumpp *et al*., 2008). Le phage A511 infecte 95 % des *L. monocytogenes* 1/2 and 4, sérotypes les plus incriminés dans les cas de listériose.

Lors d'un biocontôle, chaque association matrice/bactérie/phage doit être évaluée avant de déterminer la dose de phages la plus efficace (Sillankorva *et al*., 2012). L'évaluation de la présence d'eau libre dans les aliments à traiter est nécessaire afin d'évaluer la diffusion des phages vers les cellules hôtes. En effet, les phages se dispersent moins bien sur des matrices alimentaires solides que dans les milieux aqueux (Sulakvelidze, 2013). L'application des phages aux différentes étapes de la chaîne de transformation des aliments conduit à un meilleur contrôle des pathogènes ciblés. On estime que de réduire d'un log la concentration d'un pathogène à l'étape de pré-abattage réduirait les risques d'intoxication de 45 % et qu'une réduction de deux log pourraient réduire de 75 % ces mêmes risques (Havelaar *et al.,* 2007). Toutefois, deux écoles de pensée se confrontent sur l'utilisation des phages avec le vivant sans qu'il y ait eu préalablement la détection d'une infection. La question est de savoir si l'emploi des phages en prévention pour le bétail, par exemple, n'engendrerait pas à nouveau une surutilisation telle que celle constatée avec les antibiotiques dans ce secteur.

Par ailleurs, en mode prévention, lorsqu'appliqués sur une surface de travail ou sur des emballages, les phages sont qualifés de phagoprotecteurs et peuvent offrir un avantage de sécurité alimentaire considérable. Différents prototypes de matériaux d'empaquetage sur lesquels on pulvérise des phages et destinés à recouvrir des produits prêts-à-manger sont présentement à l'étude. Il s'agit de membranes de cellulose chargées positivement; de papiers ou de pads imprégnés de phages; ou d'emballages bioactifs comprenant des phages encapsulés dans des billes d'alginate (Gouvêa *et al*., 2016; Lone *et al*., 2016). L'emploi des phages pour inhiber la croissance de pathogènes dans la nourriture (phagoadditifs) connaît des avancées et, depuis l'approbation de l'emploi des produits Listex™ P100 et ListShield™, il y a de cela plus de 10 ans, plusieurs aliments classés dans les différentes catégories du Guide alimentaire canadien peuvent avoir été soumis à une phagoprévention par ces produits qui contiennent des phages spécifiques à *L. monocytogenes*. Même si, actuellement, aucune donnée statistique ne fait état de cette situation, la liste des denrées traitées par des solutions de phages augmente en fonction des études produites et des homologations émises. Actuellement, on retrouve, dans le groupe des fruits et légumes, plusieurs aliments tranchés, dont les cantaloups, les pommes, les mélanges de légumes (chou et laitue) sur lesquels on peut pulvériser des solutions de listériaphages (Leverentz *et al*., 2003).



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Dans plusieurs pays, dans la catégorie des viandes et substituts, la dinde, le poulet, les viandes rouges et le poisson peuvent être traités pour prévenir ou réduire les contaminations par *L. monocytogenes* (Soni & Nannapaneni, 2010a). Des analyses de contrôle des populations de cette bactérie sur des matrices alimentaires solides telles que des tranches de dinde, des saucisses à hot-dogs et du saumon fumé démontrent que les listériaphages peuvent affecter de façon significative les microorganismes avec une réduction de 5 log du décompte bactérien. Et selon les auteurs, les variations des conditions expérimentales, dont le nombre de jours d'entreposage et les températures, conduisent aussi à des résultats similaires. Des résultats confirment l'efficacité des phages A511 et P100 pour le contrôle de *L. monocytogenes* dans ces types d'aliments (Guenther *et al*., 2009). Des combinaisons de formulations de phages (Listex$^{TM}$ P100, $10^7$ UFP/cm$^2$) et d'additifs chimiques (lactate de potassium, 2,8 %) appliquées directement sur de la dinde cuite ont fait ressortir, lors d'une étude, une réduction importante (4 log UFC/cm$^2$) du nombre de *Listeria*, en comparaison avec les échantillons de contrôle, sur une période de 28 jours d'entreposage (Chibeu *et al*., 2013). L'utilisation des phages contre d'autres pathogènes alimentaires, dont *Campylobacter jejuni* et *Shigella*, démontre aussi une bonne efficacité sur des produits carnés et de la volaille (Sulakvelidze, 2013). Des analyses traitant de l'effet des phages de *Pseudomonas* sur des pièces de viande contaminées ont confirmé qu'une diminution de 2 log du compte bactérien était possible suite à l'inoculation de phages (Greer, 1986). L'étude démontre que ces derniers peuvent proliférer plus rapidement que les bactéries en surface de la chair et offrir une certaine protection contre la croissance trop rapide de certains microorganismes dans les produits carnés. D'autres analyses utilisant des phagoadditifs sur des échantillons de bœuf contaminés aux *E. coli* démontrent que les phages peuvent se répliquer à faibles températures et qu'ils sont davantage efficaces lorsque utilisés à des M.O.I élevées (Liu *et al*., 2015).

Dans le groupe lait et substituts, les fromages peuvent aussi être soumis à des traitements de phagoprophylaxie. D'ailleurs, les fromages à pâte molle, par exemple, appartiennent à une catégorie de produits souvent contaminés par *L. monocytogenes*. Des études de biocontrôle dans ce type de fromage démontrent que le listériaphage A511 a fait chuter le décompte de bactéries viables de 2,5 log à la fin de la période de mûrissement de 21 jours. Lors d'analyses avec une faible contamination initiale de *Listeria* ($10^1$-$10^2$ UFC/cm$^2$), les bactéries viables

sont tombées en dessous de la limite de détection. Les données démontrent clairement le potentiel des bactériophages pour la lutte biologique contre *L. monocytogenes* dans le fromage à pâte molle (Guenther & Loessner, 2011). L'utilisation des phages A511 et P100 comme bioadditifs dans des aliments liquides contaminés, dont le lait au chocolat et les saumures de fromage mozzarella, permet de réduire rapidement le décompte bactérien en dessous du seuil de détection (Guenther *et al*., 2009). L'utilisation de phages dans le lait permet aussi de diminuer fortement les comptes de *Pseudomonas* qui contaminent occasionnellement ce produit (Ellis *et al*., 1972).

Les produits céréaliers, quant à eux, en raison de la faible concentration en eau qu'ils contiennent, ne sont pas des milieux favorables au développement des pathogènes. Ces produits secs ne sont pas ou sont très peu impliqués dans des cas d'intoxication alimentaire et ne sont pas sujets à des traitements par les phages.

Finalement, des études démontrent également les bienfaits des traitements phagiques sur les aliments prêts-à-manger constitués de divers types de denrées et conservés à basses températures (Guenther *et al*., 2009 et 2012). Ces types de repas, de plus en plus disponibles dans les marchés d'alimentation, sont des mélanges de divers produits transformés pouvant être également sujets aux contaminations par *L. monocytogenes* et *Salmonella.* La combinaison de bactériophages et de bactériocines pour le contrôle des pathogènes dans les aliments est envisageable. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens autorisés et utilisés comme agents de conservation dans les aliments. L'exemple le plus connu, la nisine-E234, lantibiotique produit par *Lactococcus lactis*, n'a aucun potentiel cancérigène comme peuvent avoir certains additifs alimentaires chimiques. Ces peptides lytiques ont la propriété d'affaiblir d'importants liens chimiques, responsables de la stabilité structurelle du peptidoglycane, et perforent mortellement les bactéries atteintes. Par ailleurs, des formulations à base d'endolysines de phages sont aussi envisagées comme agents antimicrobiens. Ces enzybiotiques sont produits par les phages en toute fin du processus de réplication. En mesure également d'affecter la structure du peptidoglycane, ces molécules dénaturent progressivement les composantes de la membrane et sont responsables de la lyse cellulaire. Des endolysines, telles que le Pl*y*P35, le Pl*y*P40, le Pl*y*118 et le pl*y*511, sont

produites par des listériaphages. Ces enzymes sont à l'étude et pourraient, tout comme les bactériocines et les bactériophages, être combinées dans des formulations d'agents antimicrobiens hybrides une fois que leurs problèmes de stabilité seront contrôlés (Schmelcher *et al*., 2012).

### 1.8.5. Domaine : phagoassainissement (phagoassainisseurs de surfaces) - biofilms

Les phagoassainisseurs et les phagoprotecteurs sont des bio-agents qui s'emploient sur des surfaces inertes et ils se distinguent uniquement par la certitude qu'il y a une contamination. Ainsi, les phagoassainisseurs sont des phages utilisés spécifiquement sur des surfaces inertes et cette terminologie est liée à une détection bactérienne confirmée. Le phagoprotecteur entre dans un type de biocontrôle appelé phagoprévention tandis que le phagoassainisseur est intégré dans un type de biocontrôle appelé phagotraitement. Ni le phagoassainisseur, ni le phagoprotecteur ne s'appliquent sur des matrices alimentaires, seul le phagoadditif est spécialisé pour ce mode de prévention. Même si les deux termes, phagoassainisseur et phagoprotecteur, incluent une solution contenant des phages, les caractéristiques de base de leur utilisation sont différentes.

Les surfaces inertes retrouvées dans l'industrie agroalimentaire et dans le secteur hospitalier peuvent être, comme déjà abordé, des vecteurs de contamination importants et véhiculer des pathogènes par contamination croisée. Des études ont évalué des décontaminations de matières solides par les phages en vue de développer des phagoassainisseurs ciblant notamment des pathogènes tels que *L. monocytogenes* (Roy *et al*., 1993; Soni & Nannapaneni 2010b), *Staphylococcus aureus* (Lungren *et al*., 2013), *Yersinia pestis* (Rashid *et al*., 2012) et *Salmonella* (Woolston *et al*., 2013). Toutes les analyses démontrent des réductions importantes des niveaux de contamination et convergent vers le fait que les phages ont un potentiel d'agents bio-assainisseurs de surfaces solides. Les différents mélanges de phages ont tous permis de réduire considérablement les populations de bactéries présentes sur divers types de surfaces, dont l'acier inoxydable, le polypropylène, le polyéthylène, le verre et la céramique. Les études combinent de plus en plus la vérification de l'efficacité des phages simultanément sur des aliments transformés, sur les papiers d'emballage et sur les surfaces inertes contaminées (Iacumin *et al*., 2016; Sillankorva *et al*., 2012).

Le ListShield™ d'Intralytix et le Listex™ P100 de Micreos sont des produits désormais recommandés comme phagoadditifs dans les produits alimentaires et aussi comme phagoassainisseurs de surfaces de travail et de pièces de machinerie pour limiter le développement de *L. monocytogenes*. Ces produits spécifiques de biocontrôle doivent être soumis à un encadrement rigoureux et à une règlementation standardisée.

Certains phages sont également efficaces pour dénaturer les matrices de biofilms (Kelly *et al*., 2012). Leur déplacement à travers les pores et les canaux favorise les possibilités de contacts avec les microorganismes situés dans des couches sous-jacentes. La figure 1.32 présente les trois étapes de pénétration d'un bactériophage à travers un biofilm. La première étape correspond au contact du phage avec le polymère (récepteur secondaire). La dégradation de la matrice par le virion s'effectue grâce à une enzyme, la glycanase, qui accomplit une déglycosylation. Cette action endommage les polysaccharides de la matrice et permet aux phages d'entreprendre l'étape précédant l'infection, la traversée du polymère qui les conduira aux récepteurs dits primaires de la bactérie (Hughes *et al.*, 1998). La dépolymérisation des sucres et de leurs dérivés par des dépolymérases affecte la structure du biofilm et favorise l'adsorption des phages aux bactéries et, conséquemment, leur autoréplication (Hughes *et al.*, 1998; Pires *et al*., 2016).

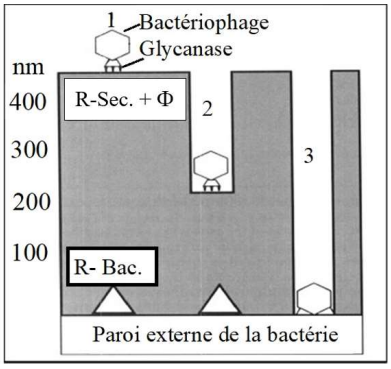



Figure 1.32. Bactériophages en action sur un biofilm. (Adaptée de Hughes *et al*., 1998)

### 1.8.6. Domaine : phagothérapie (phagobiotiques)

Le domaine de la phagothérapie est une voie médicale fonctionnelle qui fait appel à l'utilisation de phagobiotiques. Ce domaine s'intègre dans un biocontrôle de type C2 (Fig. 1.31). Grâce à leurs propriétés d'autoréplication et à leur haute spécificité d'infection, les phages sont parfois plus bénéfiques pour traiter des infections que les antibiotiques. Les multirésistances bactériennes en accroissement et les dommages, maintenant mieux connus, que les antibiotiques causent au microbiote sont deux phénomènes majeurs qui conduisent à une éventuelle réforme de leur utilisation. En raison des multiples soins phagothérapeutiques

prodigués pendant de nombreuses décennies à l'Institut Eliava, les spécialistes géorgiens ont acquis une réputation mondialement reconnue pour leur haut niveau d'expertise sur l'utilisation des phages en médecine, en remplacement des antibiotiques ou en combinaison avec eux. Même si les expérimentations dans le domaine de la phagothérapie ont été presque totalement éclipsées en occident depuis les années 30, un nouvel engouement se dessine, notamment en Amérique, quant au potentiel thérapeutique des phages, puisque les risques d'un retour à l'ère pré-antibiotiques sont à craindre. Pour contrer cette possibilité, de nombreuses recherches tentent d'élaborer les meilleures formulations phagiques pour traiter différentes infections, dont celles causées par *Staphylococcus aureus* (Matsuzaki *et al*., 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (Ceyssens *et al*., 2009), *Escherichia coli* (Rhoads *et al*., 2009) *Streptococcus* spp. et *Proteus* spp. (Markoishvili *et al*., 2002). Des formulations contenant uniquement des mélanges de phages, mais aussi des combinaisons de phages et d'antibiotiques, dont l'ampicilline, la tétracycline ou la ciprofloxacine, sont envisagées dans le but de réduire les probabilités de développement de résistance et d'éviter l'augmentation des doses ou des concentrations des antimicrobiens chimiques (Oechslin *et al*., 2017; Valério *et al*., 2017). Les recherches tentent de cerner et d'établir les meilleures stratégies de cette thérapie à double niveau en vue d'obtenir les effets synergiques les plus prometteurs.

À titre d'exemples d'application, des polymères biodégradables sous forme de pansements imbibés d'un mélange d'agents lytiques, appelés PhageDioDerm, ont permis de guérir des plaies infectées d'au moins 65 patients sur 96 (Markoishvili *et al*., 2002). Des infections, telles que des rhino-sinusites chroniques, amygdalites, pharyngites et conjonctivites, ont été traitées par des phagobiotiques et ont conduit au rétablissement de patients (Drilling *et al*., 2014; Eliava, 2015). La phagothérapie présente toutefois certaines limites puisque ce type de traitement ne peut être dirigé contre des infections fongiques, parasitaires ou virales (Ravat *et al*., 2015). Également, ce moyen thérapeutique peut difficilement être efficace contre des infections causées par des bactéries intracellulaires. Dans la sphère économique, les traitements par les phages ne sont pas encore intégrés dans un modèle législatif et l'absence de cadres réglementaires est responsable de l'impossibilité d'un remboursement des actes médicaux par des assurances de la santé. Le manque de protection de part et d'autre, pour le thérapeute et le patient, limite fortement l'utilisation de la voie thérapeutique faisant appel à

la phagothérapie, du moins en Amérique. De plus, n'étant ni de nature vivante, ni d'origine chimique, les bactériophages sont difficiles à intégrer dans une classification conventionnelle de produits destinés à des fins médicales, et il est également complexe de catégoriser une préparation de phages assignée à des traitements thérapeutiques. Il faut aussi clairement statuer si ces substances biologiques doivent être produites industriellement et soumises à des autorisations de mise en marché ou préparées de façon magistrale exclusivement par des pharmaciens. Les imprécisions sur le statut et sur les protocoles d'application ralentissent à la fois les essais cliniques et la production des phages en vue d'une utilisation thérapeutique humaine en Amérique. Toutefois, des demandes d'approbation et de législation sur ces problématiques sont en cours en Europe, particulièrement en Belgique, et les spécialistes sont de plus en plus ouverts aux essais cliniques. L'élaboration d'un comité de surveillance pour les systèmes phage-bactérie en vue d'une utilisation sécuritaire et contrôlée, combinée à un centre d'homologation et de conservation des phages, est une étape nécessaire pour assurer la qualité des solutions de phages à usage médical. Les préparations médicinales de phages approuvées en Russie et en Géorgie sont continuellement soumises à des mises à jour et à des procédures d'enregistrement qui sont sujettes à de nombreuses vérifications. Il va sans dire que dans les cas où les traitements conventionnels faisant appel aux antibiotiques ont échoué en raison d'un phénomène de multi-résistances ou du fait de la présence d'allergies ou d'intolérances, les phages appliqués directement ou par pulvérisation représentent une alternative pouvant mener à la guérison du patient. Un exemple parmi d'autres est celui d'une plaie infectée se détériorant, malgré l'emploi de différents antibiotiques, à un point tel qu'une amputation a dû être envisagée, mais qui a finalement été guérie par un traitement phagique (Maruchitch & Savolainen, 2012; Nouvel Observateur, 2016). Les besoins d'encadrement et de règlementations entourant la phagothérapie commencent à se faire sentir. De nombreux spécialistes et médecins sont d'avis qu'il serait important de réintroduire la phagothérapie dans les pays occidentaux et de développer une expertise en vue aussi d'aider les patients en impasse thérapeutique (Ravat *et al*., 2015). L'acceptation clinique des phages en Amérique et en Europe est en pleine évolution. Un protocole européen dénommé PHAGOBURN, dont les objectifs sont d'évaluer la phagothérapie chez les patients ayant subi des brûlures majeures les fragilisant envers les infections bactériennes cutanées reliées, entre autres, aux bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa*, vient fixer certaines balises de sécurité entourant l'emploi

de phages en thérapie humaine (Phagoburn, 2018). Parallèlement aux avancements de la phagothérapie cutanée, les traitements du tube digestif par les phages devraient être mis de l'avant. Les moyens pour protéger les phages, lors de leur passage dans la cavité gastrique, en vue de traiter des infections bactériennes du tube digestif, sont à développer puisque les travaux sur ce sujet sont à leur tout début. S'assurer que les phages arrivent à destination, sans être trop affaiblis par le pH fortement acide du tractus gastro-intestinal, avec l'utilisation d'une matrice protectrice libérant les particules au site ciblé, est un moyen devant faire l'objet d'analyses. Plusieurs biomatériaux à réseaux multiples tels que le chitosane ou les alginates pourraient protéger les phages et les véhiculer jusqu'aux zones d'infection. Des matrices protectrices doivent être envisagées pour faciliter le transport ciblé des phages, des médicaments ou d'une combinaison des deux. Le recours aux phages doit favoriser la réduction de l'utilisation des antibiotiques et permettre de bénéficier du même coup d'un effet synergique reposant sur le fait que ces deux moyens ne sont pas en concurrence, mais bien complémentaires. La phagothérapie doit être vue comme une arme additionnelle venant s'ajouter à l'antibiothérapie, qui demeure encore indispensable et efficace dans un contexte de traitements (Ravat *et al*., 2015).

### 1.8.7. Isolement et observations des bactériophages

Le choix d'une technique d'isolement de bactériophages dépend du milieu initial dans lequel se trouvent les particules virales. Si les bactériophages sont présents sur une surface solide (comptoir, plastique, appareil métallique, etc.), il faut alors effectuer la récupération à l'aide d'un écouvillon absorbant imbibé d'une solution tamponnée et essuyer la surface en question. Par entraînement, les phages présents sur la surface vont se retrouver en partie fixés au matériel absorbant. Par la suite, le support imbibé est déposé dans un milieu isotonique et agité vigoureusement pour déloger au maximum les phages fixés en surface. Lorsque les phages se retrouvent en suspension dans la solution, il est alors possible d'enlever les bactéries contaminantes à l'aide d'un filtre de 0,45 µm.

Pour isoler les phages présents sur ou dans des matériaux semi-solides (viande, fromage, éponge, etc.), il faut avant tout prélever une partie de l'échantillon et l'immerger dans une solution tamponnée. Par la suite, le matériel doit subir un traitement d'homogénéisation.

L'homogénat doit être centrifugé pour séparer la phase liquide contenant les phages des débris solides. Le surnageant contenant les phages doit être soumis à une décontamination à l'aide d'un filtre de 0,45 µm et entreposé à 4 ºC (Gill & Hyman, 2010). La récupération des bactériophages présents dans un milieu liquide (eau de mer, boue, culture bactérienne) se réalise par une opération de centrifugation pour sédimenter les bactéries, suivie d'une filtration. L'observation des phages nécessite très souvent des étapes de concentration et de purification. En effet, lorsque les bactériophages sont trop dilués, il est possible de les concentrer par précipitation à l'aide de PEG 6000 ou par ultrafiltration (Yamamoto & Alberts, 1970). Ces méthodes permettent de concentrer jusqu'à 1000 fois les particules phagiques. Considérant qu'une plage (zone de lyse) provient d'un seul type de phage, la purification est faite en prélevant une seule zone de lyse. Cette étape est répétée deux à trois fois pour assurer la pureté des isolats. Les phages désirés sont ainsi sélectionnés. L'isolat pur est par la suite répliqué sur une bactérie hôte et filtré (0,45 µm). On peut pousser davantage la purification en diminuant les débris cellulaires ou protéiques présents dans la suspension virale. À l'aide d'enzymes (DNase et/ou RNase), la première phase de cette purification peut s'effectuer. Par la suite, l'étape de centrifugation dans un gradient au chlorure de césium (CsCl) ou au sucrose termine la procédure de purification et assure une pureté accrue des suspensions de phages. L'observation des phages au microscope électronique permet souvent de contrôler la sélection des phages et de vérifier la pureté des suspensions. Toutefois, depuis plusieurs années, grâce au séquençage des génomes des phages, leur classification est beaucoup plus précise et leur structure protéique mieux caractérisée.

Malgré les possibilités d'analyses génomiques qui assurent une meilleure connaissance des composantes phagiques et de leur innocuité, le microscope électronique demeure un instrument de choix pour visualiser la morphologie des phages. Cette qualité de résolution est possible grâce à des techniques de coloration indirectes. Les colorants utilisés sont principalement l'acétate d'uranyle et des sels de phosphotungstate, de potassium ou de molybdate (Brenner & Horne, 1959). L'observation des bactériophages est alors possible à des grossissements jusqu'à 300 000 X.

Rapport-Gratuit.com

### 1.8.8. Conservation des bactériophages

Les techniques de conservation des phages ont légèrement évolué depuis les dernières décennies et de nouvelles procédures restent encore à développer pour prolonger leur stabilité dans le temps. En effet, la conservation de ces particules s'effectuait antérieurement à l'aide de supports solides (filtres) ou directement dans des bouillons liquides. Les phages sont surtout conservés dans des solutions tamponnées pour des temps relativement courts (6 mois à 1 ans). Les particules phagiques peuvent être conservées sous azote liquide ou dans du glycérol (20 %) à -20 et -80 ºC, sous forme de microsphères gélifiées ou sous forme lyophilisée. La technique de l'encapsulation par extrusion est un exemple de procédé de microsphères qui permet de protéger les phages des conditions variables de l'environnement. Cette procédure repose sur la production de gouttelettes d'alginate contenant les solutions de phages. Le polysaccharide, forme un complexe et durcit en présence d'ions calcium (de Vos *et al*., 2010). Ces billes gélifiées et biodégradables contenant des phages ont montré qu'elles représentent un moyen de protection efficace, notamment contre les variations de pH. Les recherches ont aussi démontré que la microencapsulation peut représenter un moyen de véhiculer sans altération les phages à travers des fluides intestinaux (Ma *et al*., 2012). La lyophilisation pour la conservation prolongée, quant à elle, débute par la congélation des bactériophages à très basse température (-30 ºC), suivie par une étape de séchage à basse pression en présence d'un cryoprotecteur (glycérol, éthylène glycol, sucres). Une seconde opération de séchage, permettant de retirer l'humidité résiduelle et d'obtenir une fine poudre phagique, est effectuée par une augmentation croissante de la température pour atteindre les 30 ºC (Merabishvili *et al*., 2013; Zuidam & Shimoni, 2010). La lyophilisation permet de maintenir stable les concentrations de phages durant plusieurs années (Merabishvili *et al*., 2013). L'étude de la stabilité des phages à la conservation et à l'entreposage prolongé est nécessaire afin de s'assurer que les solutions phagiques fournies demeurent efficaces lors de leur utilisation. Certains phages étant sensibles aux fluctuations des conditions de l'environnement, le maintien de leur concentration peut être affecté par des variations de température et de pH (Balogh *et al*., 2005; Merabishvili *et al*., 2013).

### 1.9. Défenses des cellules hôtes contre les phages et formulations multiphages

En rappel, la résistance des bactéries à l'attaque d'un phage peut être attribuée à divers phénomènes, notamment à la non reconnaissance, par le phage, des sites d'adsorption présents à la surface du microorganisme, due parfois à une mutation des récepteurs. Il peut aussi arriver que la non reconnaissance soit causée par la production d'exopolymères, recouvrant les cibles de connexion. Certains phages, toutefois, pour parvenir à se fixer, peuvent dégrader ces exopolymères à l'aide d'enzymes (Sutherland *et al*., 2004). Aussi, la présence d'un système de restriction chez certaines bactéries hôtes leur permet de reconnaître l'ADN phagique comme étant étranger et de le digérer à l'aide d'enzymes spécifiques, telles que des endonucléases. Les phages, pour contourner ce mécanisme de défense, peuvent effectuer une modification dynamique du site de reconnaissance au sein même de leur ADN, empêchant les endonucléases de les identifier (Samson *et al*., 2013).

Un autre phénomène occasionnellement impliqué dans la non-réplication phagique est l'infection abortive, durant laquelle le phage procède d'abord à l'adsorption et à l'injection de son ADN, mais où la production se limite à un assemblage très restreint de phages et à un relargage limité d'un à quatre virions par cellule. La mort programmée de la cellule bactérienne, rappelant l'apoptose des cellules eucaryotes, est un autre moyen possiblement utilisé par la bactérie pour éviter de participer à une réplication phagique. La bactérie se sacrifierait pour la survie des autres en évaluant son danger potentiel, cette fatalité demeure toutefois intéressante, puisqu'elle aboutit à un objectif malgré tout souhaité, soit la mort du pathogène par l'intervention du virus. L'immunité lysogénique, bien qu'elle soit aussi considérée comme un mécanisme de résistance envers les phages, est un processus qui n'en demeure pas moins limité. En bloquant l'injection du génome phagique par des protéines qui se lient et empêchent l'entrée de l'ADN, stratégie parfois utilisée par les prophages afin de prévenir l'infection par un autre phage, les phages latents protègent les cellules bactériennes uniquement contre l'attaque des phages qui leur sont apparentés. Puisque d'autres types de bactériophages peuvent être virulents pour les bactéries lysogènes et que certaines conditions de stress peuvent libérer leur prophage, cette résistance ne peut être systématiquement qualifiée de mécanisme permanent.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Le système CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) est un autre mécanisme de défense retrouvé chez certaines bactéries. Une série de courtes séquences génétiques répétées, régulièrement entrecoupées sur le génome des bactéries par d'autres séquences variables nommées « espaceurs », peut les rendre résistantes. Ainsi, les acides nucléiques exogènes introduits dans le système CRISPR du génome bactérien représentent une stratégie anti-phage de plus en plus identifiée qui fait office d'immunité adaptative. Les protéines Cas peuvent ensuite procéder à la coupure des ADN exogènes repérés et interférer dans le cycle lytique. Les phages peuvent contourner ce type de résistance par des mutations ponctuelles. En effet, le phage, doté de capacités évolutives, est en mesure de s'automodifier pour éviter une reconnaissance. Un système CRISPR-Cas a été observé chez des *Listeria* et ce module pourrait conférer une immunité qui protège la bactérie contre l'attaque phagique. Des souches de *L. monocytogenes* des sérotypes 1/2 et 4b présentent un élément CRISPR contenant des « espaceurs », pouvant potentiellement affecter les phages virulents A511, P100, P70 et P35 (Sesto *et al*., 2014). Toutefois, les protéines Cas, responsables des scissions, ne sont pas toujours présentes (Kuenne *et al*., 2013).

Différentes conditions physico-chimiques influencent également les étapes allant de l'adsorption à la réplication des phages. L'étape d'adsorption, par exemple, nécessite dans certains cas la participation d'ions monovalents ou bivalents comme cofacteurs. La température joue également un rôle sur l'adsorption. Certains phages sont davantage actifs à la température optimale de croissance du microorganisme; d'autres sont plus virulents à des températures extrêmes, à des pH acides ou à des milieux neutres ou alcalins. Tous ces paramètres affectent donc à la fois l'étape de l'adsorption, la quantité de phages libérés par la bactérie (burst size) et, nécessairement, le niveau d'élimination de la population bactérienne. Conséquemment, l'efficacité des solutions phagiques anti-pathogènes, prenant les noms de phagobiotiques, phagoadditifs ou phagoassainisseurs, dépend de nombreux facteurs abiotiques (pH, T°, aération) qui doivent être précisément paramétrés.

Pour prévenir la problématique du développement de résistance suite à l'utilisation d'un antimicrobien à base de phages, quelques stratégies doivent être respectées. D'abord, il faut élaborer une large liste de tous les phages agissant sur les souches à éliminer, les caractériser

sur fiches signalétiques, les produire en forte concentration et les entreposer convenablement afin de les maintenir disponibles rapidement. Dans le cas des solutions à phages multiples, il importe d'éviter de concocter des mélanges qui en contiennent une trop grande variété pour ne pas risquer d'épuiser rapidement l'arsenal phagique suite au développement de résistances chez les bactéries visées. L'augmentation du nombre de phages dans une formulation devrait idéalement s'effectuer de façon progressive. Il est nettement plus avantageux de formuler des produits contenant un mélange restreint de phages (deux ou trois) afin de garder en réserve des candidats performants et de mettre de l'avant une rotation dans les formulations phagiques (Woolston *et al*., 2013). Pour une meilleure inhibition, l'utilisation d'un mélange de phages ayant des sites d'adsorption différents est à privilégier (Tanji *et al*., 2004). Selon les usages visés, il faut élargir également les divers types de formulations en introduisant dans certains mélanges phagiques des ingrédients antimicrobiens tels que des bactériocines, des produits chimiques ou d'autres composants, afin de provoquer un effet synergique (Markoishvili *et al*., 2002; Mills *et al*., 2017; Roy *et al*., 1993). Par ailleurs, les solutions de phages, pour être efficaces, doivent être employées en concentration élevée pour une meilleure efficacité (Liu *et al*., 2015). Les études portant sur les meilleurs paramètres qui conduisent à des mélanges de phages efficaces se multiplient (Markoishvili *et al*., 2002; Rhoads *et al*., 2009). Une étude à visée thérapeutique, portant sur l'utilisation d'un mélange de trois phages sélectionnés par une méthode qualifiée d'étape par étape (SBS : Step-By-Step), consistait à tester un phage sur plusieurs souches de *Klebsiella pneumoniae* et de soumettre les bactéries résistantes à un autre phage pouvant les lyser. Le processus de sélection phagique s'est répété jusqu'à ce que toutes les souches résistantes aient été lysées par l'un ou l'autre des phages. La solution phagique anti-*K. pneumoniae* formulée s'est montrée efficace pour réduire considérablement la concentration bactérienne présente chez les souris infectées. Une synergie entraînant une meilleure efficacité grâce à l'emploi des trois phages a été notée en comparaison avec l'utilisation des phages individuels (Gu *et al*., 2012).

On peut se réjouir de la découverte de nouveaux antibiotiques tels que la plectasine et la teixobactine, qui se fixent à des motifs structuraux lipidiques hautement conservés et peu évolutifs du peptidoglycane bactérien pour neutraliser sa formation et affecter la croissance

bactérienne. Il n'en demeure pas moins que ces substances ont un spectre d'action très large et, contrairement aux phages, qui sont très spécifiques, les antibiotiques affectent fortement l'intégralité du microbiote en déstabilisant la flore microbienne saine et nécessaire pour maintenir une immunité compétente. Après évaluation, la fréquence d'apparition d'une résistance est beaucoup plus élevée dans les systèmes antibiotiques-bactéries ($10^{-5}$) que dans ceux des complexes phages-bactéries, dont l'ordre est de $10^{-7}$ à $10^{-8}$ (Merril *et al*., 2006). Le monde médical est en réflexion sur les procédures d'utilisation et sur les bienfaits des antibiotiques, non seulement en raison des résistances que les microorganismes ont développées à leur égard, mais également à cause de l'effet néfaste que leur absorption entraîne sur l'ensemble de la population bactérienne de l'intestin. En effet, il est de plus en plus reconnu que les antibiotiques affectent la flore commensale et détériorent le mucus qui recouvre les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules de Paneth, affaiblissant ainsi ce composant majeur de la barrière protectrice intestinale.

Les antibiotiques sont utilisés à l'échelle mondiale et en quantités considérables pour les soins humains et ils sont également utilisés largement pour traiter le bétail en agroalimentation. Leur prescription et leur distribution sont en augmentation continuelle (Ferrer *et al*., 2016), engendrant un impératif besoin de développer de nouveaux produits pour réduire leur utilisation. La résistance bactérienne touche non seulement le secteur médical, mais a des répercussions aussi dans le secteur alimentaire alors qu'il est de plus en plus reconnu que les agents de conservation tels que les nitrates, les nitrites et les benzoates, régulièrement employés pour lutter contre de nombreux pathogènes, seraient impliqués dans le développement d'allergies, d'asthme et même dans des cas de cancer (Sharma, 2015; Song *et al*., 2015). Les solutions de désinfectants chimiques ne sont pas à négliger pour autant. Par contre, il faut convenir que les bactéries, au fil des générations, sont devenues multirésistantes et que la simple augmentation des concentrations de produits ne suffit plus. Si aucun autre moyen de combattre n'est développé, une perte de contrôle de la situation est à craindre. Les chercheurs considèrent sérieusement les impacts, sur l'organisme humain, de l'emploi prolongé des antibiotiques, des additifs alimentaires et des produits nettoyants chimiques, et la course aux solutions de rechange est entamée depuis quelques années. Les nombreux efforts investis dans la recherche font avancer l'arsenal antimicrobien vers des

d’outils plus naturels et plus écologiques. La combinaison de tous les travaux ne peut aboutir qu’à des solutions bénéfiques pour faire face à l’éventualité d’une résistance bactérienne trop importante face aux moyens actuellement disponibles.

### 1.10. Centre de référence pour virus bactériens Félix d'Hérelle

Des collections de bactériophages ont été créées dès l’époque de Félix d’Hérelle afin d'optimiser la phagothérapie. Leur conservation est essentielle au développement de la biotechnologie en santé humaine et représente un levier important en recherche fondamentale. Les diverses voies d’exploitation des phages en médecine, en alimentation et dans l’environnement ont fait des bonds de géant au cours des dernières années, entraînant une prise de conscience quant à leur potentiel. Ces entités biologiques, d’une riche valeur naturelle et d’une biodiversité très étendue, peuvent être mis au service du mieux-être de l’humanité, car ils représentent des armes biologiques contre les bactéries pathogènes et des instruments génétiques d’avant-garde. Maintenir ces outils biologiques disponibles passe par le soutien des centres de collection. L’exploitation actuelle et future des phages en biotechnologie dépend d’une révision périodique et d’un entretien rigoureux des banques pour répondre à des normes de qualité élevées. Les phages doivent être soigneusement entreposés, purifiés et classifiés afin d’assurer leur accessibilité et leur pérennité.

Le centre de référence pour virus bactériens Félix d’Hérelle, fondé en 1982 par le Dr Hans-W. Ackermann M.D., professeur de microbiologie médicale à l'Université Laval, est une phagothèque canadienne à but non lucratif regroupant une très importante collection de phages (CRVB-Félix d’Hérelle, 2018). Ce centre est, depuis 2003, maintenu et coordonné par M. Sylvain Moineau Ph.D., titulaire de la Chaire de recherche du Canada sur les bactériophages, professeur au Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique de l'Université Laval, ainsi que par une équipe de spécialistes. Le mandat du centre est de conserver des phages de référence, de les distribuer et de maintenir des fiches signalétiques qui leur sont spécifiques. La collection contient plus de 470 phages archivés infectant plus de 130 espèces bactériennes, dont plusieurs souches pathogènes. Le centre a pour mission de rendre mondialement disponibles des spécimens de phages pour des recherches bénéfiques et profitables. D’autres instituts, tels que l’Institut Pasteur de Paris,

l'Institut Eliava de Tbilissi, en Géorgie, et l'Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimental (IITE), de Wroclaw en Pologne, possèdent également leur phagothèque. Il est désormais capital d'investir dans des laboratoires de collection pour demeurer proactif en matière de sécurité sanitaire et de faciliter le développement de bio-outils canadiens.

### 1.11. Immobilisation cellulaire pour production de phages

Les cellules immobilisées peuvent être définies comme une population microbienne contenue dans un espace limité et dont les propriétés métaboliques demeurent fonctionnelles. Chez les microorganismes, l'immobilisation cellulaire est un phénomène répandu qui offre une protection supplémentaire contre les stress environnementaux et qui favorise, dans plusieurs cas, la survie du groupe. Les populations bactériennes libres ne représentent qu'un très faible pourcentage des écosystèmes naturels (Gauthier & Isoard, 1989). La croissance sessile engendrée par l'immobilisation cellulaire a été mise à profit en médecine, en pharmacologie et en biotechnologie, notamment dans les secteurs de l'agroalimentaire pour la fabrication de vinaigre, de nisine ou lors de la production d'alcool. Notons également son utilisation dans le secteur de l'environnement pour l'épuration des eaux usées (Chibata & Tosa, 1981; Scannell *et al*., 2000; Schmitdt, 1999).

L'exploitation de l'immobilisation cellulaire pour la production de bactériophages n'a pas encore été décrite dans la littérature. Cette technique vise à protéger la population hôte contre l'attaque rapide des phages et à diminuer les coûts de la production de particules virales à l'échelle industrielle. Elle se veut un moyen plus sécuritaire de produire certains bactériophages impliquant la manipulation de cellules hôtes pathogènes qui présentent un danger pour la santé des opérateurs. Comme la mise en marché de produits bio-assainisseurs à base de bactériophages, de phagoadditifs ou de phagobiotiques demeure encore limitée, l'immobilisation de bactéries en vue de produire différents types de phages offre des avantages tels qu'une production rapide, une récupération simple des phages dans le milieu et une réutilisation de l'inoculum bactérien. Cette méthode de production en continu facilite les opérations, assure l'obtention d'importantes quantités de phages à concentration élevée dans le milieu; ce à quoi s'ajoute une économie de temps due à une activité supérieure, parce que plus concentrée, des cellules hôtes.

### 1.11.1. Techniques d'immobilisation

Un grand nombre de méthodes physiques et chimiques peuvent être utilisées pour favoriser une immobilisation microbienne. Les systèmes de cellules immobilisés peuvent être classés en quatre catégories : l'adsorption, la polymérisation, l'inclusion et l'agrégation (Fig. 1.33).

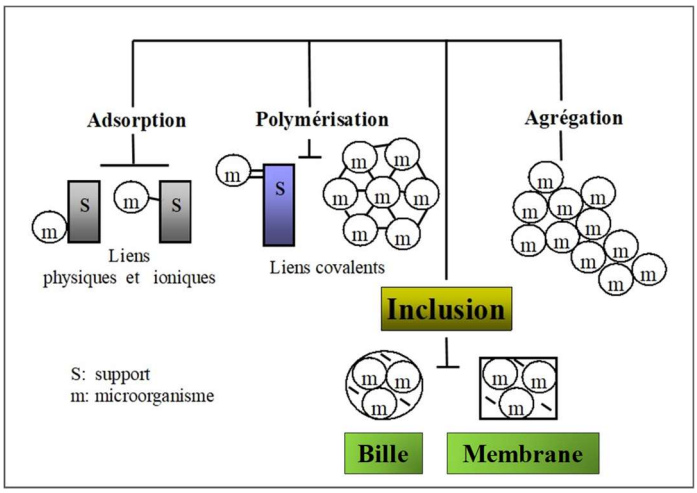



Figure 1.33. Techniques d'immobilisation cellulaire.

Les informations qui suivent présentent un aperçu de ces différentes techniques, incluant celle qui offre le plus d'intérêt pour la production de bactériophages, l'inclusion.

### 1.11.2. Adsorption

Cette technique d'une grande simplicité fait intervenir le recouvrement (ou colonisation) d'une surface par les microorganismes, qui sont maintenus à l'interface par un simple contact physique ou par des forces non-covalentes (liaisons électrostatiques ou interactions hydrophobes) (Rosevear, 1984). En général, cette technique nécessite le contact entre une phase solide et une phase liquide. Le procédé est réalisé en laissant, par exemple, une culture cellulaire en présence d'un support (gel, verre, PVC, acier inoxydable etc.), et ce dans des conditions physico-chimiques déterminées. La croissance cellulaire qui a lieu à la surface du support se transforme progressivement en biofilm. Cette technique, très ancienne, est utilisée pour produire des bactériophages à l'échelle pilote. Le procédé consiste à imbiber d'une culture bactérienne une gélose nutritive. Le support poreux (agar) est ensuite recouvert d'un film de bactériophages. Suite à un temps de production, prédéterminé, la surface est inondée

d'un tampon et soigneusement grattée pour déloger les particules phagiques produites. Cette technique ne permet cependant pas la réutilisation du gel et les volumes récoltés par plaque sont faibles, soit de l'ordre de 3-10 ml. Le temps de production, les manipulations préliminaires et le temps requis pour la récolte et la purification des solutions phagiques sont désavantageux pour une application à l'échelle industrielle.

### 1.11.3. Polymérisation et agrégation

Les méthodes de fixation par liaisons covalentes impliquent l'activation d'un support ou une étape de réticulation qui consiste à former un réseautage entre les cellules. Ces systèmes mettent nécessairement en jeu des molécules hautement réactives (carbodiimide, glutaraldéhyde), si bien que beaucoup de cellules ne résistent pas aux traitements (Diviès *et al*., 1989). Cette technique a donc été éliminée pour fin de production de phages. L'agrégation, qui est un processus de floculation de microorganismes, est, comme l'adsorption, un phénomène aussi très répandu dans la nature. On peut la provoquer artificiellement par une simple décantation avec ou sans l'ajout d'un agent floculant, dont le sulfate d'aluminium, $Al_2(SO_4)_3$, ou la chaux, $Ca(OH)_2$ (Ayeche & Balaska, 2010). Cette approche n'est pas appropriée pour une production de phages en continu parce que les cellules floculées ne sont pas protégées contre l'attaque des phages, parce que le système est relativement fragile et parce que toute la population, étant exposée, risque une extermination trop rapide.

### 1.11.4. Inclusion

L'inclusion cellulaire est une technique d'immobilisation largement utilisée pour fixer et confiner temporairement des cellules bactériennes. Le principe consiste à emprisonner les cellules dans une matrice rigide poreuse (sous forme de billes, de filets ou de membranes) qui permet la diffusion de substrats nutritifs et la libération progressive des bactéries ou de leurs métabolites. De nombreux polymères peuvent servir de réseau d'inclusion. Parmi les polymères synthétiques, le polyacrylamide, le chlorure de polyvinyle et le polyuréthane sont les plus utilisés; toutefois, leur utilisation implique des expositions chimiques parfois drastiques. Les polymères organiques naturels sont de loin les plus appropriés pour

immobiliser les microorganismes, principalement à cause des conditions plus douces qu'ils nécessitent lors de la formulation de gels. Très souvent, ces polymères sont de nature polysaccharidique. L'alginate, le carraghénane, l'agar et le gellan gum sont des exemples de polysaccharides naturels (Audet *et al*., 1988; Sanderson *et al*., 1989). Ces derniers sont extraits de différentes algues marines, sauf le gellan gum, qui est un polysaccharide excrété par une bactérie, *Pseudomonas elodea* (Sanderson, 1990). Ils sont largement utilisés dans l'alimentation comme agents gélifiants, liants et stabilisants (Van Nieuwenhuyzen *et al*., 2006).

Dans la vision d'une production de phages par inclusion, un des avantages repose sur le fait que les cellules sont protégées contre l'attaque des phages par une matrice et que les bactéries hôtes sont libérées progressivement dans le milieu. Dès que les microorganismes sont exposés en surface de la matrice ou entièrement libres dans le liquide, ils sont alors infectés, utilisés pour la production de phages, et ils subissent ultimement une lyse. Graduellement, d'autres bactéries se libèrent et deviennent disponibles pour la poursuite de la production des phages, contribuant à augmenter leur concentration dans le milieu. La population bactérienne évite ainsi l'extermination trop rapide et le processus de production de phages se fait en continu. Les phages augmentent en quantité dans le milieu et les infections bactériennes se poursuivent conjointement avec l'apparition de nouvelles cellules, créant un rendement de production croissant.

### 1.12. Alginate: polymère naturel avantageux pour une production de phages

L'inclusion de bactéries dans des polymères d'alginate pour la production de phages offre plusieurs avantages eu égard aux capacités gélifiantes que possède ce biomatériau. L'alginate assure la formation de réseaux réticulés flexibles desquels les bactéries sont en mesure de se libérer. Par ailleurs, des études effectuées sur sa structure et son innocuité envers plusieurs microorganismes connus rendent ce polymère plus intéressant (Chen & Chang-Tze, 1988; Gosmann & Rehm, 1988; Martinsen *et al*., 1989; Ogbonna *et al*., 1989; Smidsrød & Skja'k-Brik, 1990). La survie et le comportement des cellules bactériennes immobilisées dans ce type de structure favorisent le choix de cette matière dans un système d'inclusion pour effectuer une exploitation de phages, puisque les bactéries sont à l'abri d'une attaque



Rapport-Gratuit.com

massive de phages et peuvent établir une colonie stable, protégée du milieu extérieur (Champagne *et al*., 1992; Champagne, 2017). L'utilisation de l'alginate comme matrice permet aussi de conserver les microorganismes immobilisés dans des solutions ioniques à 4 ºC pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines, et la conservation dans l'azote liquide est envisageable ainsi que la lyophilisation dans un but de protection et de préservation à plus long terme (Boyaval *et al*., 1985; Martin-Dejardin, 2013).

### 1.12.1. Composition et propriétés ioniques

Le support d'immobilisation utilisé pour une production de phages doit être suffisamment stable pour assurer son utilisation à répétition, et son emploi dans le domaine alimentaire doit être autorisé. Le biomatériel formant l'armature de la matrice doit posséder certaines propriétés mécaniques, chimiques et physiques, notamment une capacité de compression, une toxicité nulle et une bonne perméabilité.

L'alginate, qui est un polysaccharide extrait des algues brunes, répond positivement à tous ces facteurs. Il forme un gel lorsqu'il entre en contact avec des ions divalents tels que les ions calcium (Fig. 1.34). Ce polysaccharide linéaire et anionique est un polymère constitué d'acide β-D-mannuronique et d'acide α-L-guluronique dans des proportions variables selon l'origine et le degré de maturation des plantes desquelles il a été isolé. La position de la liaison C5-C6

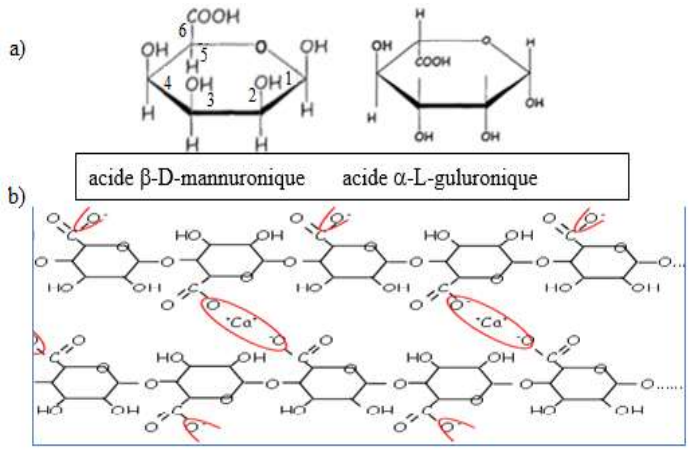



Figure 1.34. a) Formules chimiques : acides mannuronique et guluronique.
b) Formation d'un gel d'alginate par association avec des ions calcium.

située au-dessus du cycle, dans le cas de l'acide mannuronique se caractérise par une forme moléculaire de type D, et le radical hydroxyle du C1 se trouvant au-dessus du plan, marque l'identification de type β. L'acide guluronique, quant à lui, présentant une liaison C5-C6 en dessous du cycle, il se caractérise par une forme en L, et le radical hydroxyle du carbone C1, étant en dessous du plan, marque l'identification de type α (annexe 7). Les propriétés gélifiantes de l'alginate dépendent étroitement des arrangements séquentiels du polymère, de sa composition monomérique, de la concentration du polysaccharide et des ions divalents présents (Lacroix *et al*., 1990; Martinsen *et al*., 1989). Ainsi, la sélection du type d'alginate et les concentrations d'ions divalents à ajouter lors de la préparation des matrices doivent être soigneusement évaluées afin d'obtenir les résultats de gélification escomptés. L'inclusion de cellules vivantes d'origine microbienne dans des billes d'alginate de calcium est l'une des techniques les plus utilisées pour la production de divers métabolites d'intérêt commercial dont des bactériocines (Scanell *et al*., 2000).

### 1.12.2. Technique de production de phages par inclusion de bactéries

La mise en valeur de l'inclusion cellulaire, en vue d'une production de bactériophages, consiste d'abord à rendre homogène une suspension bactérienne concentrée dans une solution d'alginate (Fig. 1.35). Le mélange est ensuite déversé goutte à goutte dans une solution riche en cations divalents (chlorure de calcium). La présence de ces cations entraîne une gélification par interactions ioniques avec les groupements carboxyles du polysaccharide. Des billes macroscopiques, de taille standardisée (2 ou 3 mm), sont ainsi obtenues. Les bactéries hôtes, emprisonnées dans la matrice d'alginate solidifiée de forme sphérique, sont ensuite réactivées dans un bouillon nutritif. Suite à l'addition d'un inoculum phagique, les bactéries, en multiplication continuelle à la surface du gel et dans le milieu lui-même, subissent une infection progressive, et relâchent des particules virales dans le milieu liquide (Fig. 1.36). Les bactéries qui s'exposent

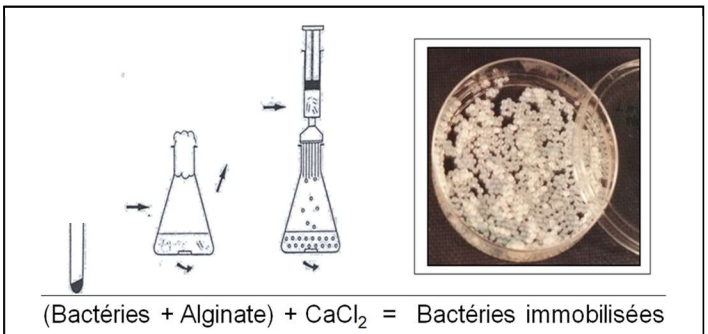



Figure 1.35. Étapes de formation des cellules immobilisées dans des billes d'alginate.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

à l'extérieur de la structure matricielle deviennent vulnérables aux phages, tandis que celles protégées dans les réseaux internes de l'alginate bénéficient d'un développement sans aucune menace. Conséquemment, elles ne subissent aucun stress les conduisant potentiellement à des mutations. En effet, les cellules immobilisées dans le gel, n'ayant aucun contact avec les phages, n'éprouvent aucun besoin de développer une résistance envers ces derniers. Le bouillon nutritif dans lequel elles baignent fournit, par diffusion à travers la matrice, les

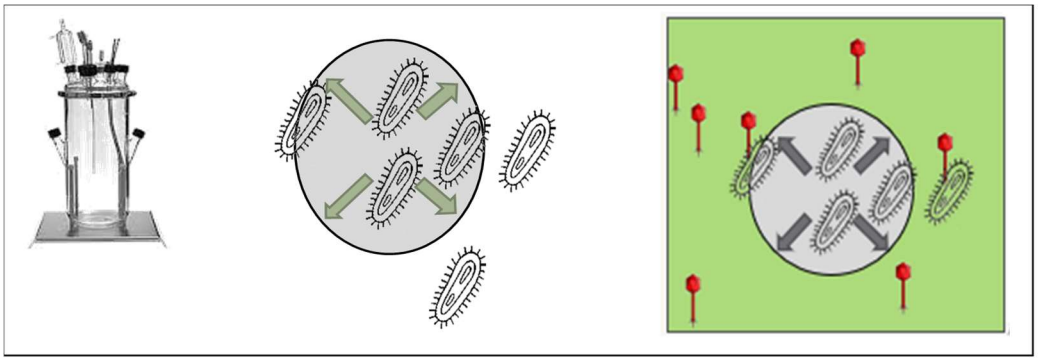


Figure 1.36. Comportement des bactéries immobilisées dans les billes d'alginate et processus d'infection par les phages en surface et dans le milieu.

éléments nécessaires à leur développement et cette libre diffusion des nutriments et de l'oxygène assure la survie de la population microbienne (Kurosawa *et al*., 1989). Lors de leur sortie, les bactéries sont littéralement utilisées et exploitées, malgré elles, pour produire et relâcher des particules virales dans le milieu. Les virus cumulés peuvent, par la suite, être récupérés et purifiés par filtration. L'opération peut se répéter plusieurs fois à partir d'un même inoculum bactérien. La fabrication des matrices d'inclusion à base d'alginate est d'une très grande simplicité pour la production de phages. Toutefois, les différents facteurs de croissance et les diverses conditions d'optimisation des infections doivent être bien paramétrés afin de rendre la production de phages efficace et ce, peu importe le choix de la technique d'amplification. En effet, les conditions abiotiques du milieu, telles que le pH, l'oxygénation, la température et la multiplicité d'infection (M.O.I.), sont des paramètres directement impliqués dans la performance d'un système de production. D'autres facteurs, dont les nutriments fournis dans le milieu, les ions libres, l'absence d'interaction entre la matrice et les phages et la concentration des bactéries dans les billes elles-mêmes, font également partie intégrante de l'équation d'un bon rendement et d'un système de production

à rouage productif (Fig. 1.37). La diminution des coûts qu'implique ce type de production n'est observable que lorsque tous les paramètres de production et de conservation (prolongée) des bactéries hôtes dans les matrices sont bien maîtrisés. Finalement, les technologies utilisant les microorganismes inclus dans un réseau d'alginate sont sans aucun doute appelées à offrir de nombreux avantages pour la production d'une multitude de phages exploitables à l'échelle industrielle. La diminution des coûts par une production en continu, la minimisation des mutations cellulaires par protection réseautée et la résistance du gel aux pressions hydrostatiques sont parmi les avantages les plus intéressants de ce nouveau procédé d'amplification de phages.

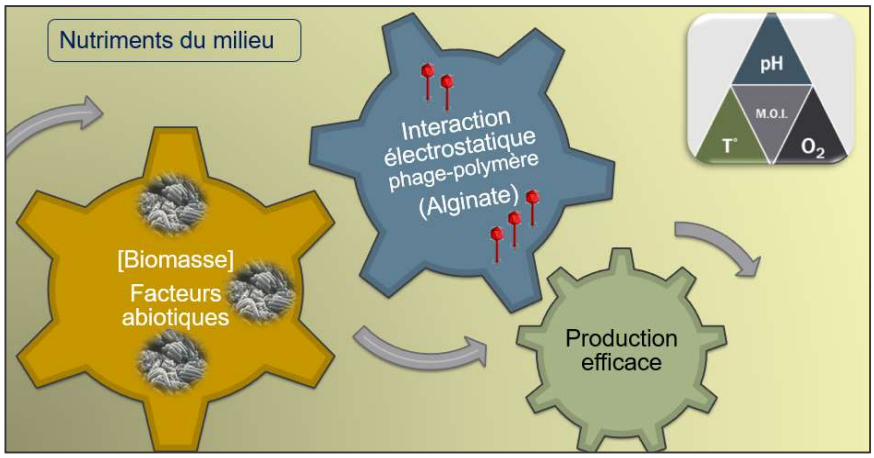



Figure 1.37. Rouages d'un système de production de phages par immobilisation cellulaire dans des matrices d'alginate.

# CHAPITRE 2

## BIOLOGICAL INACTIVATION OF ADHERING *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY LISTERIAPHAGES AND A QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND

B. Roy, H-W. Ackermann, S. Pandian, G. Picard and J. Goulet
Publication : *Applied and Environmental Microbiology*, Sept 93, vol 59, No. 9, p. 2914-2917

### 2.1. Avant-propos : contribution des auteurs

Sous la supervision du professeur Jacques Goulet, j'ai eu la chance, lors de mes expérimentations, de bénéficier de la collaboration d'une technicienne qui s'est chargée de la préparation des milieux nutritifs, notamment des géloses, et de la préparation du matériel de base. L'aide technique apportée m'a permis de me consacrer entièrement à l'élaboration des protocoles, à la réalisation des expérimentations et à l'analyse proprement dite. Les phages et les bactéries utilisés dans cet article sont en provenance du centre de référence pour virus bactérien Félix d'Hérelle, dirigé à l'époque par le Dr Hans-W. Ackermann, et de Pêches & Océans Canada. Le Dr Ackermann, de la Faculté de médecine de l'Université Laval, a été d'une aide précieuse, car il m'a encadrée lors de la caractérisation des phages et des observations de bactéries au microscope à balayage électronique. Il a donc facilité toutes les étapes conduisant à la prise des photos utilisées lors de cette section d'expérimentations. Finalement, j'ai rédigé ce manuscrit sous la supervision et les conseils du Professeur Goulet. La participation des professeurs Sithian Pandian et Gaston Picard est de l'ordre de la consultation. Les calculs de variances reliés aux expérimentations ont été réalisés avec l'assistance d'un spécialiste en analyses statistiques et à l'aide de logiciels de traitements de données. Cet article a été publié en septembre 1993, dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*.

## 2.2. Résumé français


### INACTIVATION BIOLOGIQUE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ADHÉRANT À DES SURFACES SOLIDES AU MOYEN D'UNE SOLUTION DE LISTÉRIAPHAGES ET D'AMMONIUM QUATERNAIRE.

L'utilisation de listériaphages comme agent bio-assainisseur de surfaces a été expérimentée sur des surfaces de polypropylène et d'acier inoxydable. Les surfaces solides (cylindres) ont été contaminées artificiellement par *L. monocytogenes* 10401 et 8427 avant de subir un traitement de désinfection : immersion dans une solution de phages (H387, H387-A et 2671) appartenant à la famille des *Siphoviridae*. Une concentration d'au moins 3.5 x $10^8$ PFU/ml de phages a permis d'obtenir une inhibition des *Listeria* comparable à l'utilisation de 20 ppm d'ammonium quaternaire (QUATAL). Une activité synergique a été observée lors de l'emploi d'un mélange de phages et d'un mélange de phages combiné à de l'ammonium quaternaire (solution hybride). Les listériaphages ont supporté des concentrations de QUATAL d'au plus 50 ppm pendant plus de 3 heures sans que leur activité biologique ne soit affectée.

# BIOLOGICAL INACTIVATION OF ADHERING *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY LISTERIAPHAGES AND A QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND.

Applied and Environmental Microbiology, Sept. 1993, vol. 59, no.9 p. 2914-2917
B. Roy [1,2], H-W. Ackermann [3], S. Pandian [1,2], G. Picard [2], and J. Goulet [1,2]

*Dairy Research Center (STELA), Faculty of Agriculture [1], Felix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses, Department of Microbiology, Faculty of Medicine [3], and Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture [2], Université Laval, Ste-Foy, Quebec., Canada G1K 7P4*.

Running Title:

Biodisinfection of *L monocytogenes*

Key words:

*Listeria monocytogenes* - listeriaphages - sanitation - Quaternary ammonium - disinfection.

## 2.3. Abstract

The use of listeriaphages as a means of disinfecting contaminated stainless steel and polypropylene surfaces was investigated. Surfaces artificially contaminated with *L. monocytogenes* 10401 and 8427 were sanitized with suspensions of listeriaphages (H387, H387-A, and 2671), all belonging to the *Siphoviridae* family. Phage suspensions at concentrations of up to 3.5 x $10^8$ PFU/ml were at least as efficient as a 20 ppm solution of a quaternary ammonium compound (QUATAL) in reducing *L. monocytogenes* populations. A synergistic activity was observed when two or more phages were used in combination and when phages were suspended in QUATAL. The biological activity of the three phages was not affected by QUATAL concentrations of 50 ppm and a contact time of 4 h.

## 2.4. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a ubiquitous bacterium (8) that is found not only in raw food but also on working surfaces of food-processing plants. Processed foods may thus be contaminated by *L. monocytogenes* even if raw ingredients are free of the pathogen. This is thought to be the main source of *L. monocytogenes* in processed foods, and therefore contaminated surfaces play an important role in the transmission of food pathogens.

The recurrence of *L. monocytogenes* in food plants is a major problem and has even led to the closing of some plants in the past (12). The use of efficient disinfectants and good manufacturing practices is thus mandatory for preventing pathogenic contaminations. The resistance of surface-adhering *L. monocytogenes* cells to most chemical disinfectants under specific conditions (9) highlights the importance of developing new disinfection approaches and more efficient sanitizing agents. Since higher concentrations of chemical disinfectants would be needed to overcome the resistance of adhering *L. monocytogenes* cells, this would increase their burden on the environment and constitute a health hazard for employees. The development of specific biodisinfectants consisting of an aqueous suspension of listeriaphages would obviate these inconveniences and would offer new alternatives in fighting food-borne pathogens.

The use of bacteriophages for decontaminating food plant surfaces (16) and even food itself (13) represents an innovative and promising approach to the problem of microbial food contamination. Because of their high specificity (23), bacteriophages should have minimal impacts on the microbial ecology of foods, processing plants, and the environment. In this study, we investigated many formulations of phage suspensions to improve the level of destruction of *L. monocytogenes.* Phages were used in suspensions of a single phage, in mixtures of different phages, or in combination with a chemical disinfectant. The aim of this study was to evaluate the efficacy of listeriaphages in sanitizing stainless steel (SS) and polypropylene (PP) surfaces contaminated with *L. monocytogenes.* The overall objective was to develop a biodisinfectant formulation specifically active against *L. monocytogenes* and capable of preventing its development in food and food-processing plants.

## 2.5. Materials and Methods

**2.5.1. Bacteria, phages and media.** The two strains of *L. monocytogenes* used (10401, serovar 4, and 8427, unknown serovar) were from the Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses. Both strains were maintained on TSY agar (Trypticase Soy agar [BBL, Cockeysville, Md.], 0.6 % yeast extract [Difco, Detroit, Mich.]). Colonies were picked and inoculated in 250-ml flasks containing 100 ml of CYLG medium. This medium contained 2 g of glucose, 0.02 g of $MgSO_4$, 0.02 g of $MnSO_4$, 0.02 g of $FeSO_4$, 0.02 g of $CaCl_2$, 10 g of tryptone (Difco), 5 g of yeast autolysate (Difco), 10 ml of 50 % of potassium lactate, and $H_2O$ to 1,000 ml. The undissolved materials were filtered through Whatman no. 3 filter paper before autoclaving.

The three listeriaphages used (2671, H387, and H387-A) were from the phage collection of Félix d'Hérelle Reference Center. They belonged to the *Siphoviridae* family, characterized by long, noncontractile tails (2). The phages were selected for their wide host range as determined on *Listeria* strains from our collection. Phage H387-A is a derivative of phage H387 (22) propagated on *L. monocytogenes* IP31-A, a *hem* mutant of strain IP31. The titers of viral particles were determined on agar surfaces. Phage stocks (> 3 x $10^8$ PFU/ml) were stored at 4 ºC for no longer than two weeks prior to use.

**2.5.2. Test surfaces.** SS and PP cylinders (outside diameter, 8 mm; inside diameter, 6 mm; length, 10 mm [as described in reference 11]) were sterilized in a 0.1 % asparagin solution (Difco) and rinsed with sterilized water. The cylinders were contaminated by immersion for 60 min at 26 ºC into fresh cultures of *L. monocytogenes* (3 x $10^8$ CFU/ml) and air dried aseptically by being placed vertically over two sterilized filter papers (Whatman no. 3) in a Petri dish for 30 min at 37 ºC.

**2.5.3. Disinfection procedure.** After being dried, contaminated cylinders were first rinsed as follows. The cylinders (3 x 15 per tested bacteria) were rinsed in physiological saline (300 ml of 0.8 % NaCl) for 2 min under mild agitation. The cylinders were dried as above and then transferred into 5 ml each of the following decontaminating solutions: (i) pure suspensions of each phage, (ii) a mixture of equal quantities of the three phages, (iii) 1 to 100

ppm solutions of QUATAL, (iv) a combination of phages and QUATAL (1:1 vol/vol). According to the manufacturer (Ecochimie Ltée, Ste-Julie de Verchères, Quebec, Canada), the active ingredients of QUATAL are 10.5 % *N*-alkyldimethyl-benzylammonium-HCL (40 % C-12, 50 % C-14, 10 % C-16) and 5.5 % glutaraldehyde. After a decontamination period of 1 h, each cylinder was rinsed with sterile 0.1 % peptone solution, placed in 5 ml of the same solution, and vortexed vigorously for maximal release of adhering cells. Recovered cells were enumerated by plating on TSY agar.

**2.5.4. Resistance of phages to QUATAL.** Phages were suspended in solutions of QUATAL (1 to 100 ppm) for 4 h. Samples were taken every hour for phage titer determination; QUATAL was neutralized with 20 % (vol/vol) lecithin (Le Naturaliste J.M.B., Boucherville, Quebec, Canada) before plating on TSY agar. Phage titers were determined on a culture of *L. monocytogenes* IP31.

**2.5.5. Statistical analysis**. All microbial counts were transformed to $\log_{10}$ values, and variance analysis ($\alpha = 0.05$) was carried out by following a random-block design, using a general linear-model procedure (program GLM; SAS Institut, Inc., Cary, N.C.). Homogeneity of variance was verified by the Levene test (21). The normality of residues was tested by the Shapiro-Wilk test and the Q-Q plot, and then different parameters were compared by using the LSD (least statistical difference) test. The experiments were carried out in triplicate. Results of the statistical analysis are shown in Table 2.1.

Tableau 2.1. Variance analysis and interactions as function of sampling method and date (F values).

| Source[a] | df[b] | $P > F$[c] |
|---|---|---|
| Bacteria | 1 | 0.0100 (*) |
| Chemical product | 3 | 0.0001 (*) |
| Phages | 3 | 0.0001 (*) |
| Phages * Cyl | 3 | 0.0376 (*) |
| Bact * Cyl (adhesion) | 1 | 0.7900 (NS) |
| Bact * Cyl (biological treatments) | 1 | 0.0202 (*) |
| Chem * Phages | 9 | 0.0001 (*) |
| Phages * Chem * Cyl | 9 | 0.0028 (*) |

[a] Abbreviations: Phages * Cyl, interaction between listeriaphages and cylinders; Bact * Cyl, interaction between bacteria and cylinders; Chem * Phages: interaction between chemical product and listeriaphages; Phages * Chem * Cyl: interaction between listeriaphages, chemical product, and cylinders.
[b] df, degrees of freedom.
[c] *, $P < 0.05$; NS, no significant difference. For these determinations, $n = 3$

Rapport-Gratuit.com

## 2.6. Results and Discussion

**2.6.1. Phage host range**. The testing of *Listeria* strains (*L. monocytogenes* 10401, IP31, 8427, and 1089; *L. innocua* 5290 and *L. ivanovii*) for killing by listeriaphages is clearly the first step in a biocontrol strategy such as proposed here in order to select a phage with a wide spectrum. Each of the three phages H387, H387-A, and 2671, had previously been tested in our laboratory against eight (8) *Listeria* strains (obtained from Health & Welfare Canada and from Fisheries & Oceans, Ottawa, Canada) for phage typing (data not shown). Phages H387 and H387-A lysed all strains, whereas phage 2671 lysed 50 % of them. Because of their wide host range, listeriaphages may be used as efficient biodisinfectants against adhering *L. monocytogenes* organisms. The detection of *Listeria* species by phage typing has already been suggested as a test of the recurrence of this microorganism in food-processing plants (15).

**2.6.2. Adherence of *L. monocytogenes* to surfaces.** The adherence of all tested strains of *L. monocytogenes* to PP surfaces was slightly greater than to SS surfaces (4.25 ± 4.04 and 4.00 ± 3.79 log CFU/ml, respectively, for strain 10401 and 4.99 ± 4.84 and 4.93 ± 4.96 log CFU/ml, respectively, for strain 8427). However, these differences were not statistically significant ($P = 0.79$). On the other hand, strain 8427 adhered in larger numbers than strain 10401 to all surfaces ($P = 0.01$). The adhering behavior has already been reported and related to factors such as free energy (5), hydrophobicity of contact materials, and ionic interaction between bacteria and surfaces (10). Adhesion of bacteria to surfaces can also involve production of exopolymers (glycocalyx) by microorganisms (7). According to Mafu *et al*. (20), the interfacial free energy of adhesion of *L. monocytogenes* Scott A is lower for PP surfaces than for SS surfaces. Since free-energy calculations predict that PP should allow for better attachment of microorganisms than SS does (19,20), one might presume that sanitation of SS surfaces should be easier than for PP surfaces. Indeed, several authors (14, 24, 25) have reported more difficulties in disinfecting plastics than other types of solid surfaces. Because of the presence of many scratches (20), soft surfaces offer more room to the cells for protection against mechanical and chemical stresses.

**2.6.3. Disinfection by listeriaphage suspensions.** When single-listeriaphage suspensions were used to sanitize SS and PP surfaces, the destruction level was about 3.4 log units. The efficiencies of phages H387, and H387-A, and 2671 were about equal in inactivating *L. monocytogenes* 10401 and 8427 on PP and SS surfaces. However, strain 8427 was more easily inactivating on SS than on PP with the mixture of three phages ($P = 0.02$). In fact, the statistical analysis showed an interaction between the strains and the cylinders. The efficiency of the single phages did not seem to be influenced by the nature of the solid surfaces. However, the mixture of the three phages showed a better efficiency on SS than on PP ($P = 0.04$). Results in Fig. 2.1 suggest a synergistic effect of phages 2671, H387, and H387-A when used in combination for disinfecting SS surfaces. The destruction level for the mixture of all three phages was 3.5 log units on PP compared with 3.7 log units on SS. Reduction

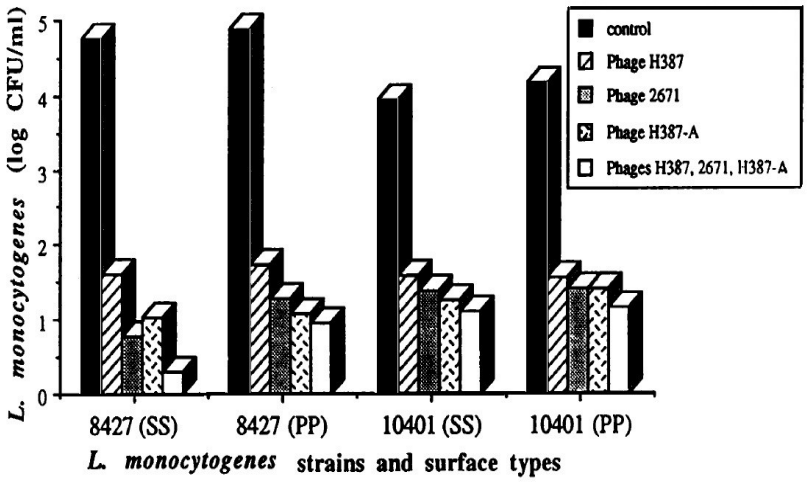



Figure 2.1. Recovery of adhering *L. monocytogenes* cells from contaminated SS and PP surfaces before and after exposure for 1 h to listeriaphages ($3.5 \times 10^8$ PFU/ml).

levels of 99 to 99.9 % in bacterial cell counts were thus observed with listeriaphages, but these will have to be improved to meet the recommended reduction level of 99.999 % in a 30-s exposure for a chemical sanitizing agent (6).

The development of natural resistance against bacteriophages is a well-known phenomenon (1, 3). It can be minimized or prevented by using mixtures of two or more phages differing in their mode of infection of bacterial cells. Similarly, the use of listeriaphages in combination with a chemical sanitizer may improve the level of destruction of



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

*L. monocytogenes* through a synergistic effect. It appears very unlikely that a single strain could rapidly develop resistance to more than one inhibitory substance simultaneously.

**2.6.4. Mixed disinfecting solutions.** A 50 ppm concentration of QUATAL was required for total destruction of all strains on SS and PP surfaces (Fig. 2.2). The effects of chemical and biochemical treatments were dependent of the concentration used ($P = 0.0001$). The mixture

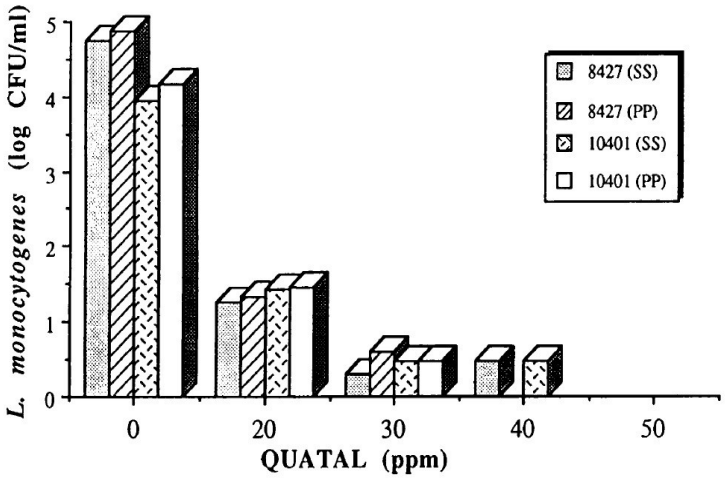



Figure 2.2. Recovery of *L. monocytogenes* 8427 and 10401 from contaminated SS and PP surfaces after exposure for l h to several concentrations of QUATAL.

of three listeriaphages at concentrations up to 3.5 x $10^8$ PFU/ml was about as efficient as a 20 ppm solution of QUATAL in sanitizing contaminated surfaces (Fig. 2.1 and Fig. 2.2). The combination of a biological and a chemical sanitizer thus appears more efficient than the use of either one individually ($P = 0.0001$). The addition of listeriaphages to a quaternary ammonium compound solution allowed us to reduce the concentration of chemicals to as little as 40 ppm for destroying the whole population of contaminating *Listeria* cells (Fig. 2.3). The listeriaphage-QUATAL suspension was more efficient in inactivating *Listeria* cells on SS than on PP ($P = 0.0028$). Indeed, better disinfection efficiencies with chemical products had already been reported for SS than plastics for several species of bacteria (25). However, one must bear in mind that the efficiency of chemical compounds may also be influenced by environmental factors such as pH, organic residues, water hardness, and temperature (4). The combination of a chemical agent with bacteriophages appears to be a means of reducing the concentration of environmentally hazardous compounds while maintaining the same

disinfecting activity against *L. monocytogenes.* However, this can be accomplished only with chemicals that will not inactivate bacteriophages.

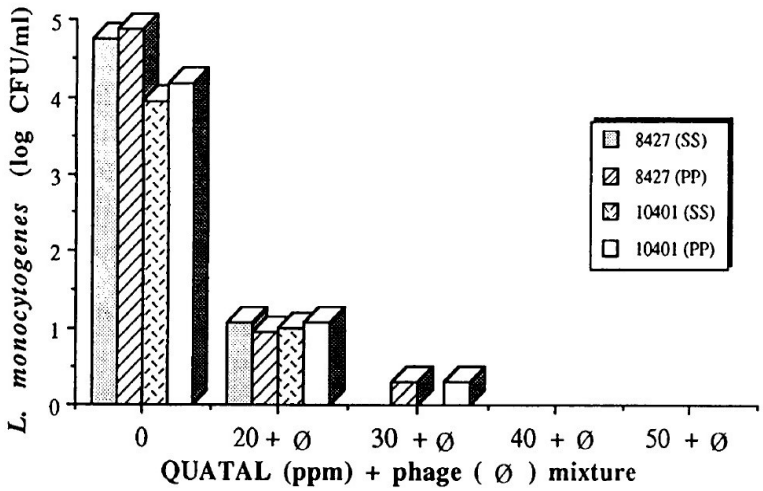



Figure 2.3. Recovery of *L. monocytogenes* 8427 and 10401 from SS and PP surfaces after exposure for 1 h to a suspension of listeriaphages ($10^8$ PFU/ml) mixed with several concentrations of QUATAL.

Exposing listeriaphages (H387) to various concentrations of QUATAL (1 to 50 ppm) for up to 4 h did not destroy their infectivity (Fig. 2.4). However, at concentrations of 75 and 100 ppm, phage titers were reduced by 3 to 4 log units within 1 h. Other listeriaphages (2671 and H387-A) showed a similar sensitivity (data not shown). This work has shown that listeriaphages (at concentrations of 3.5 x $10^8$ PFU/ml) may be as efficient as a 20 ppm solution of QUATAL in sanitizing contaminated SS and PP surfaces. This performance has to be improved to reach a destruction efficiency comparable to that of 50 ppm of QUATAL (100 % destruction). The observed synergistic effect of listeriaphages and QUATAL shows a promising avenue in improving the destruction level. Further work is being carried out to optimize physical and chemical conditions and hence to improve the efficiency of this new approach of biodisinfection.

The recent isolation of a new, highly virulent listeriaphage (A51l) by Loessner *et al*. (17,18) could help in the development of new formulations of improved efficacy. Although listeriaphages have shown a good decontamination activity against two strains of

*L. monocytogenes*, further investigations are currently being carried out to improve their infectious and lytic activities and increase phage yields by propagation in liquid media.

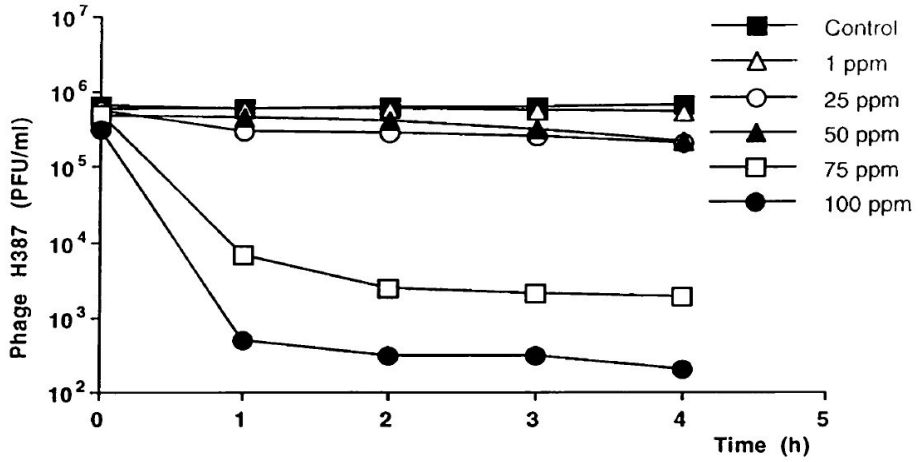



Figure 2.4. Resistance of phage H387 to QUATAL (1 to 100 ppm). Phages were suspended in various concentrations of QUATAL for periods of up to 4 h. Aliquots were withdrawn hourly and neutralized with lecithin, and the titer was determined.

## 2.7. Acknowledgements

We thank Fisheries & Oceans Canada, AQUIP and Alpha-Biotech Inc., Quebec, for providing financial assistance for this study. We thank EcoChimie, Quebec, for providing the chemical disinfectants used in this project. We thank Steve Méthot for providing statistical assistance.

## 2.8. References


1- Ackermann, H.-W. & M. S. Dubow, (1987) Phage multiplication. In: *Viruses of prokaryotes, vol. 1*. Boca Raton, CRC Press, Inc., pp. 49-85.

2- Ackermann, H.-W. & M. S. Dubow, (1987) Description and identification of new phages. In: *Viruses of Prokaryotes, vol. 1*. Boca Raton, CRC Press, Inc., pp. 103-142.

3- Adams, M. H., (1959) Host specificity. In: *Bacteriophages*, New York, Interscience publishers Inc. pp. 121-135.

4- Brackette, R. E., (1987) Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes. J. Food Protect.* **50**: 999-1003.

5- Busscher, H. J., A. H. Weerkamp, H. C. vander Mei, A. W. J. van Pelt, H. P. de Jong, J. Arends, (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 980-983.

6- Chambers, C. W., (1956) A procedure for evaluating the efficiency of bactericidal agents. *J. Milk Food Technol.* **19**: 307-311.

7- Costerton, J. W., G. G. Geesey, K. J. Cheng, (1978) How bacteria stick. *Sci. Amer.* **238**: 86-95.

8- Farber, J. M. & P. I. Peterkin, (1991) *Listeria monocytogenes,* a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476-511.

9- Frank, F. J. & and A. R. Koffi, **(**1989) Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protect.* **53**: 550-554.

10- Gauthier, Y. & P. Isoard, (1989) L'adhésion des bactéries sur les surfaces. *Ind. Aliment. Agric.* **1-2**: 31-32.

11- Gélinas, P. & J. Goulet, (1983) Efficacité de huit désinfectants sur trois types de surfaces contaminées par *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1715-1730.

12- Gellin, B. G. & C. V. Broome, (1989) Listeriosis. *JAMA* **261**:1313:1320.

13- Greer, G. G., (1986) Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth on beef spoilage. *J. Food Protect.* **49**:104-109.

14- Leers, W. D., J. S. McAllister, L. W. MacPherson, (1974) A comparative study of Cidex and Savlon. *Can. J. Hosp. Pharm.* **27**:17-18.

15- Loessner, M. J. & M. Busse, (1990a) Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1912-1918.

16- Loessner, M. J. & M. Busse, (1990b) Phagentypisierun von Listerien als ein Instrument zur Anlagensanierung. *Dtsch. Milchwirtsch.* **33**: 1115-1118.

17- Loessner, M. J., S. Goeppl, M. Busse, (1991) The phagovar of *Listeria* strains under the influence of virulent and temperate bacteriophages. *Letters in Appl. Microbiol.* **12**: 192-195.

18- Loessner, J. M. & R. Zink, (1992) Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 296-302.

19- Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet, P. Magny, (1990) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Protect.* **53**: 742-746.

20- Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet, L. Savoie, (1991) Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1969-1973.

21- Milliken, G. A., (1984) Analysis of messy data. In: *Designed experiments, vol.1*. New York, Van Nostrand Reinhold. pp.19-22.

22- Ortel, S. & H.-A. Ackermann, (1985) Morphologie von Neuen Listeriaphagen. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt.1 Orig. Reihe A*, **260**: 423-427.

23- Rocourt, J., (1989) *Listeria* et la listériose humaine. *Ann. Inst. Pasteur* **1**: 25-30.

24- Rogers, M. R., J. T. Maher, A. M. Kaplan, (1961) A practical approach to evaluation of the germicidal efficiency of a general-purpose military disinfectant. *Appl. Microbiol.* **9**: 497-501.

25- Stedman, R. L., E. Kravitz, H. Bell, (1954) Studies on the efficiencies of disinfectants for use on inanimate objects. II. Relative activities on porous surfaces. *Appl. Microbiol.* **2**: 322-325.

# CHAPITRE 3

## PRODUCTION OF BACTERIOPHAGES BY *LISTERIA* CELLS ENTRAPPED IN ORGANIC POLYMERS

Brigitte ROY, Cécile PHILIPPE, Martin J. LOESSNER, Jacques GOULET et Sylvain MOINEAU
Publication : *Viruses*, juin 2018, vol 10, No. 6 : 324. doi:10.3390/v10060324

### 3.1. Avant-propos : contribution des auteurs

Les tests préliminaires portant sur la technique de production de phages par immobilisation ont d'abord été effectués à l'Université Laval sous la supervision et les conseils du professeur Jacques Goulet. Les essais de production de phages, réalisés par inclusion, ont démontré un potentiel de développement fort intéressant, d'abord pour le phage H387. Une bourse d'études pour un stage en Allemagne a été accordée par le DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst). La bourse comprenait deux mois de cours intensifs de langue allemande au Goethe Institut de Munich et 8 mois de recherche dans une Université allemande de mon choix. Puisque j'avais de l'intérêt pour le phage A511, récemment identifié à Freising en Allemagne, le choix du laboratoire s'est arrêté sur celui du Dr S. Scherer, de l'Institut Weihenstephan. Les tests de production de phages par immobilisation ont été répétés dans ce laboratoire avec le phage A511 et, à nouveau, avec le phage H387. Le Dr Martin Loessner, spécialiste des listériaphages, m'a guidée dans la familiarisation du laboratoire et l'utilisation du matériel. En plus d'avoir fourni le phage A511, qui à l'époque était difficile d'accès, et la souche de production (*L. ivanovii* WSLC 3009), le Dr Loessner a été une référence privilégiée, puisqu'il a participé à l'isolement et à la caractérisation de ce phage. Il m'a aussi conseillée lors de ma présentation sur la production de phages par immobilisation, qui a eu lieu lors d'un congrès annuel de l'association de microbiologie à Hanovre. De retour au Canada, j'ai rédigé le manuscrit et le professeur Goulet a collaboré à cet article par ses vérifications et ses suggestions. Le Dr Ackermann, de son côté, m'a orientée lors de la prise des photos des bactéries au microscope à balayage électronique, clichés utilisés pour visualiser le positionnement des bactéries incluses. Le professeur Jacques Goulet étant à la retraite, le professeur Sylvain Moineau a pris la relève, en m'accompagnant dans la mise à jour de ce chapitre auquel Mme Cécile Philippe a aussi contribué pour une part.

## 3.2. Résumé français

### PRODUCTION DE LISTÉRIAPHAGES PAR IMMOBILISATION DE *LISTERIA* DANS DES BILLES D'ALGINATE

L'immobilisation cellulaire comme mode de production de phages a été développée notamment en vue de produire en continu de plus grandes quantités de bactériophages que celles obtenues par les méthodes traditionnelles (milieux gélosés et liquides). La technique utilisée a permis de produire des virus bactériens dans un milieu nutritif où les *Listeria*, immobilisées dans une matrice d'alginate et graduellement libérées, se sont fait infecter à mesure par les listériaphages H387 ou A511.

Grâce à ce nouveau procédé, les coûts de production pourraient être réduits de la façon suivante : une diminution importante des manipulations et du temps de production, une récupération simplifiée des particules virales et une concentration élevée des cultures cellulaires. Par ailleurs, comme seules les bactéries en surface ou à l'extérieur de la bille d'alginate se font infecter, le reste de la colonie serait moins sujet à développer une résistance. Selon les résultats de l'étude, les multiplications virales à l'aide de la matrice d'alginate ont été comparables à une production en milieu liquide et beaucoup plus efficace qu'en milieu gélosé. Les particules virales obtenues en milieu biphasique au moyen de cellules immobilisées étaient aussi virulentes que celles obtenues par les techniques traditionnelles. Plus de trois productions successives de phages ont été réalisées à l'aide d'un même inoculum.

### 3.3. Résumé allemand – Zusammenfassung

## PRODUCTION VON LISTERIAPHAGEN MITTELS IMMOBILISIERTER *LISTERIEN* IN PORÖSEN ALGINAT-AGGREGAT

Die Benutzung von *Listeria* Phagen als natürliches Konservierungs oder Desinfektionsmittel, könnte ein erfolgversprechender Weg sein um Kontaminationen zu kontrollieren. Das Hemmpotential dieser Partikel gegen eine Vielzahl von *L. monocytogenes* ist relativ hoch und stellt eine ökologische Alternativlösung dar zur Ätötung dieses pathogenen Keimes in Lebensmitteln und auf Oberflächen dar.

Obwohl die bakteriozide Aktivität der *Listeria* Phagen hoch ist, sind das Volumen und die Phagenkonzentration ebenfalls wichtige Parameter, die für eine industrielle Anwendung optimiert werden müssen. Eine wirtschaftliche und praktische Technik um *Listeria* Phagen zu produzieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Diese Methode besteht darin, die Wirtszellen in organischen Polymeren zu immobilisieren. Eine zu grosse Adsorption der Phagen an die Bakterien wird durch diese Immobilisierung der Bakterien in Polymeren (Alginat) verhindert. Diese Produktionsmethode verbindet Vorteile wie hohe Phagenkonzentration, großes Phagenvolumen, kontinuierliche Produktion und somit ökonomischen Einsatz von Zeit und Material. Darüberhinaus können die immobilierten Zellen für mindestens 3 aufeinanderfolgende Produktionen verwendet werden.

Rapport-Gratuit.com

# PRODUCTION OF BACTERIOPHAGES BY *LISTERIA* CELLS ENTRAPPED IN ORGANIC POLYMERS

*Viruses*, June 2018, vol 10, No. 6 : 324. doi:10.3390/v10060324
Brigitte Roy [1,2,3], Cécile Philippe [1,3], Martin J. Loessner [4], Jacques Goulet [2], and Sylvain Moineau [4]

[1] Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique, Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1V OA6. [2] Département des sciences des aliments, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1V OA6. [3] Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses and GREB, Faculté de médecine dentaire, Université Laval, Québec, Qc, Canada, G1V OA6. [4] ETH Zurich, Institute of Food, Nutrition and Health, Schmelzbergstrasse 7, LFV B20, CH-8092 Zürich, Switzerland.

**Keywords** : *Listeria ivanovii; bacteriophages; alginate; production; disinfection; phagodisinfection*

## 3.4. Abstract

Applications for bacteriophages as antimicrobial agents are increasing. The industrial use of these bacteriophages requires the production of large amounts of suitable virulent phages, particularly for food and agriculture applications. This work describes a new approach for production of phages infecting *Listeri*a. *Listeria* phages H387 (temperate, *Siphoviridae*) and A511 (virulent, *Myoviridae*) were propagated separately using *Listeria ivanovii* host cells immobilized in alginate beads. The same batch of alginate beads could be used for four successive and efficient phage productions. This new technique enables production of large volumes of high-titer phage lysates in continuous or semi-continuous (fed batch) cultures.

### 3.5. Introduction

*Listeria monocytogenes* is responsible for fatal cases of listeriosis in humans via contaminated food products [1]. This bacterial species is ubiquitous in nature and can contaminate the food processing line at any critical point. The increasing resistance of these pathogens to disinfectants under certain conditions requires the use of higher concentrations of chemical products [2]. Furthermore, bacteria exposed to disinfectants may be more likely to develop antibiotic resistance [3,4]. Despite strict regulatory policies, the occurrence of *L. monocytogenes* still has detrimental consequences for the food industry.

The search for alternatives to overcome these challenges has rekindled interest for bacterial viruses (bacteriophages) in agriculture [5], aquaculture [6], food safety [7], and even in infectious diseases [8,9]. The use of strictly lytic (i.e., virulent) phages infecting *Listeria* as biosanitisers represents an ecological alternative that could reduce the use of chemical compounds and lower the concentrations of toxic residues in the environment [10]. Specific biodisinfectants consisting of suspensions of phages can provide a natural means to control pathogens in processed foods and on contact surfaces. For example, the virulent phage A511 has a very broad host range against several strains of *Listeria* spp. [11,12,13] and could be included in the formulation of this type of biodisinfectants.

Phage biocontrol of *L. monocytogenes* strains was first introduced in 2006 with the commercial product ListShield, which contained a cocktail of phages applicable to various foods. Another product is Phageguard Listex P100, which also aimed to reduce *L. monocytogenes* in a range of food products [14,15,16,17,18]. Moreover, it has been demonstrated that different virulent phages can reduce the *L. monocytogenes* population after adhesion to stainless steel or polypropylene surfaces, and a synergistic effect has been observed by combining phages with quaternary ammonium [19,20,21].

However, even if virulent phages have shown great potential for killing pathogenic or opportunistic food-borne bacteria [22], their production on a large scale often remains challenging. Phage production still involves traditional methods using tubes or Erlenmeyer



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

flasks, or it is done in bioreactors as a batch process [23]. High phage titers can be obtained [24,25], but batch processes require significant manpower and non-operational periods of time that may be limiting [26].

Attempts have been made to overcome the disadvantages of the batch process with continuous phage production. Studies involving chemostats [25,27] have been conducted, as well as two-stage continuous processes or cellstat [25,28,29,30], which consists of culturing bacteria, separately, in the first stage to feed to a second stage when phages are produced. Although chemostat allows the cultivation of microorganisms at a physiological steady state [31], the bacterial culture may be less genetically stable, as mutations can occur [32]. Cellstat is recognised as a phage production system for strictly lytic phages [33] that avoids direct phage exposure and pressure but requires the use of two different bioreactors [34].

With the aim of reducing production time and costs, we investigated here a different phage production procedure that employs host bacteria entrapped in a porous gel matrix. Alginate gel was selected for the matrix because of its low cost and widespread use in a range of applications in medicine, pharmacy, biotechnology, and the food industry [35,36]. An alginate matrix with entrapped bacterial cells can be produced in a single-step process and has virtually no impact on the viability of the cells. Alginate can also form a gel in the presence of divalent cations, such as calcium, which are also often necessary as co-factors for phage multiplication [37,38].

Entrapped cells will still grow because nutrients diffuse through the gel matrix [39], and while microcolonies spread deeper in the beads, the bacterial density has been shown to be higher near to or at the surface of the beads [40,41,42]. Such a growth pattern leads to bacterial cell release in the medium by micro-fracture events in the matrix. Only bacterial cells released from the gel become infected and contribute to the propagation of virulent phages. Those cells remaining in the gel have been shown to be protected from the phages, as the bacterial viruses do not migrate into the beads because of their size [43,44,45]. Protein diffusion through the matrix is highly reduced when molecular weight is above 150 kDa [46].

Relevant advantages of using entrapped cells to produce strictly lytic phages are that the phage lysate can be easily recovered and the alginate beads can be reused for successive phage propagations. Multiple phage lytic cycles can also be favoured, because this protective system prevents the rapid decline of the phage-sensitive host population. This process also provides an opportunity to produce phages in continuous or semi-continuous (fed-batch) cultures. Taken together, the use of calcium alginate immobilised cells (in spheres or fibers) to produce phages is a bi-phasic technique that controls the bacterial population and preserves the integrity of the cells, as long as they remain entrapped in the matrix.

### 3.6. Materials and Methods

**3.6.1. Bacteria, phages and media.** *Listeria ivanovii* WSLC 3009 and the broad-host-range virulent myovirus A511 [47] were obtained from the Institut für Mikrobiologie, ZIEL Institute for Food and Health, Technische Universität München (Germany). The siphovirus H387 [48,49] was obtained from the Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses (www.phage.ulaval.ca) of the Université Laval (Québec, Canada). Bacterial strains were grown in Trypticase soy broth (TSB) or plated on Trypticase soy agar (TSA) at 30 °C. Phage titration was done using the double-layer plating technique [50] on TSA. Phage stocks (>1 × $10^8$ Plaque Forming Unit (PFU) mL−1) were stored at 4 °C prior to use.

**3.6.2. Alginate gels and cell immobilization by entrapment.** A 2-4 % (w/v) aqueous solution of sodium alginate was prepared by suspending the polymer in distilled water. Solutions were sterilised by autoclaving (121 °C, 15 min). *L. ivanovii* cells were harvested by centrifugation (8000 rpm, 10 min) and resuspended in sterile TSB (3 mL). The cell suspensions were then mixed with sterile alginate [51]. Beads were formed by the dropwise addition of the alginate-cell mixtures into sterile $CaCl_2$ (200 mM) using a syringe and a 20 Gauge (G) needle. The cell-containing beads, 2 to 3 mm in diameter, were allowed to solidify for 1 to 2 h before $CaCl_2$ was replaced by fresh TSB containing 0.5 mM $CaCl_2$ to maintain the integrity of the alginate beads.

**3.6.3. Morphology of cells immobilized in beads.** Alginate beads were observed by scanning electron microscopy (SEM) to visualise entrapped *Listeria* cells. The alginate beads

were cut in half, and the specimens were fixed by immersion in glutaraldehyde (2.5 % v/v) in 0.1 M sterile cacodylate buffer (pH 7.0) for 4 h. The samples were washed twice in 0.1 M sterile cacodylate for 20 min. Post-fixation was done in osmium tetroxide (2 % v/v) in sterile cacodylate buffer for 30 min at 30 °C, and dehydration was completed using $CO_2$ in a critical point dryer (Model 3000 CPD, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). The samples were mounted on stubs and covered with 15 nm of gold using a sputter coater (Emscope, Bio-Rad). A Nanolab LE 2100 (Vickers Instruments, Bausch and Lomb, Nepean, ON, Canada) scanning electron microscope operating at 15 hV was used to examine the bead surfaces.

**3.6.4. Phage adsorption.** A set of alginate beads was made as described above but omitting the bacterial cells. Ten grams of pure alginate beads was transferred into TSB. Aliquots of phage suspensions (0.1 and 1 mL) were added and incubated at 30 °C for 12 h. The adsorption of phages on alginate beads was monitored by determining phage titers every 4 h. Two independent experiments were performed.

**3.6.5. Biomass concentration.** To estimate the population of immobilised bacteria, 1 mL of alginate beads was dissolved in 9.0 mL of Na+ citrate (50 mM), a sequestrant for Ca++. The number of viable cells in the dissolved alginate gel was determined by direct plating on TSA for two independent experiments.

**3.6.6. Phage production**

**3.6.6.1. Free cells.** TSB (100 mL) was inoculated (5 %) with an overnight culture of *L. ivanovii* 3009 from the Weihenstephan Listeria collection (WSLC) and grown to an optical density at 600 nm (OD600) of 0.5-0.8. Phages were added at multiplicities of infection (MOIs) of 0.1 (1:10) and 1 (1:1), and the mixture was incubated for 16 h at 30 °C. Phage titers were measured every 4 h for two independent experiments.

**3.6.6.2. Immobilized cells used for single and successive phage propagations.** Beads containing entrapped microorganisms were transferred at least 2-4 times into prewarmed (30 °C) fresh TSB before phage production. Ten grams of beads containing *L. ivanovii* cells

was added to 100 mL of TSB (OD600 of 0.5-0.8), and phage suspensions (at MOIs of 0.1 and 1) were added to the cultures. The flasks were incubated at 30 °C for 16 h, and phage titers were also determined as described above for two independent experiments. Between each successive production, the beads were stored overnight at 4 °C in sterile 2 % (w/v) $CaCl_2$. The beads were then washed twice with sterile 2 % $CaCl_2$ and reactivated as described above before each production.

**3.6.6.3. Statistical analysis.** Mean and standard deviation values were calculated using Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

## 3.7. Results and Discussion

**3.7.1. Morphological observations.** For the efficient use of alginate microbeads, morphological characteristics such as size and shape are important [52]. The produced alginate beads had proper sphericality and were typically 2 to 3 mm in size (Fig. 3.1). Scanning electron micrographs of entrapped *Listeria* revealed no major changes in cell morphology (Fig. 3.1). The mechanical constraints of the polymer did not seem to interfere with cell growth.

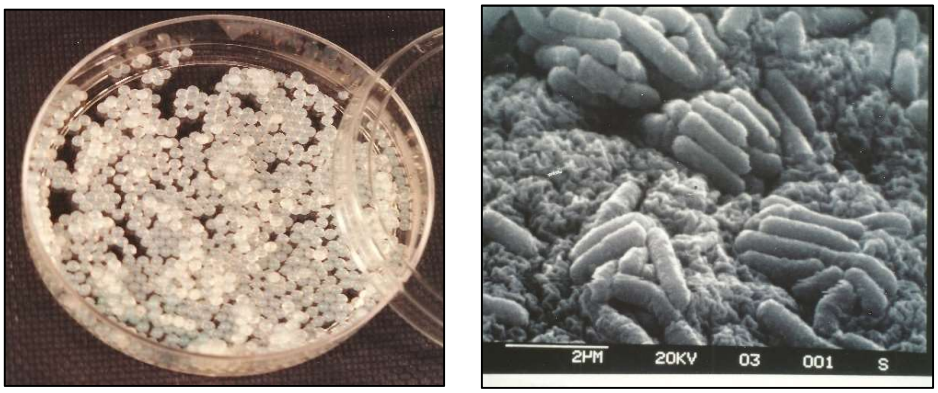



Figure 3.1. Observation of entrapped alginate bacteria. (Left) Visual appearance of alginate beads containing *L. ivanovii* WSLC 3009 ($10^8$ cfu.mL$^{-1}$) in a Petri dish. (Right) Scanning electron micrograph of *L. ivanovii* WSLC 3009 immobilized in alginate beads (x 10,000).

**3.7.2. Phage adsorption.** Phage adsorption onto the gel matrix is a parameter that may impact the overall performance of the production system. The electrostatic adsorption of phages onto polymer beads could decrease the number and infectivity of phage particles in the medium. For this reason, the organic material selected for phage production should be tested for ionic attraction of viral particles. No decreases in the titers of phages A511 and H387 were observed in the medium after contact with the alginate beads. These results suggest that no major ionic interactions exist between the organic polymer and the phages.

**3.7.3. Biomass concentration.** The concentration of entrapped cells in alginate beads has been studied for several types of bacteria [39,51,53,54]. Alginate is non-toxic to most living cells [55] and provides protection against external stresses such as temperature, pH, and toxic molecules. Figure 3.2 shows that three successive transfers (reactivations) of entrapped *L. ivanovii* cells in fresh TSB could raise the bacterial cell concentration inside the gel to almost $1 \times 10^9$ cells mL-1, while five transfers increased the bacterial counts to almost $10^{10}$ cells mL-1. Because the number of bacteria released into a medium is related to, among other parameters, the saturation level of the cells in the alginate structure, the yield of phage production will likely be influenced by the concentration of bacteria in the beads and at the bead surface.

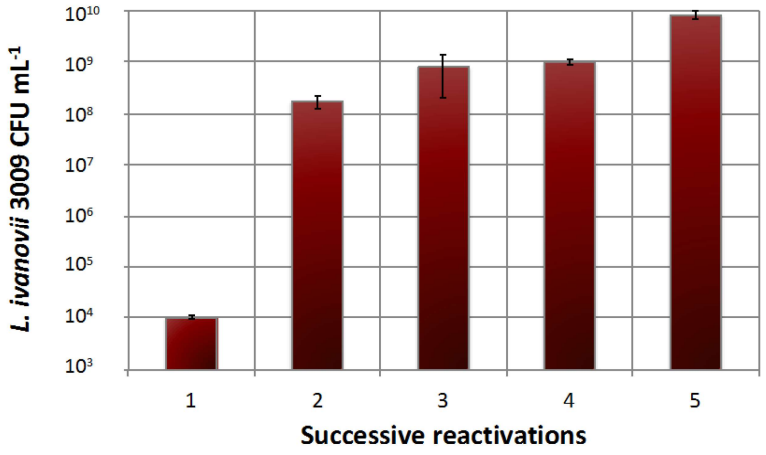



Figure 3.2. Transfers of *L. ivanovii* WSLC 3009 immobilized cells in fresh TSB. Each reactivation was followed by an interval of 12 h. Bacterial concentrations were measured after 8-12 h of growth at 30 °C. Mean values were calculated from two independent experiments, and error bars correspond to standard deviations.

### 3.7.4. Phage production

**3.7.4.1. Free cells.** Phage productions in liquid medium were performed with both phages individually (Fig. 3.3). All phage productions were characterized by a lag phase for the first 4 h, followed by a sharp increase in phage titers at 8 h. Maximal phage titers were close to $10^{10}$ PFU mL-1 of medium after 12 h. Very small variations in phage titers were observed at different MOIs. After 16 h, the titer of phage H387 decreased when using a 1:10 ratio. It is unclear at this time what caused this decrease in the phage titer, but it could have been due to phage adsorption to cell debris.

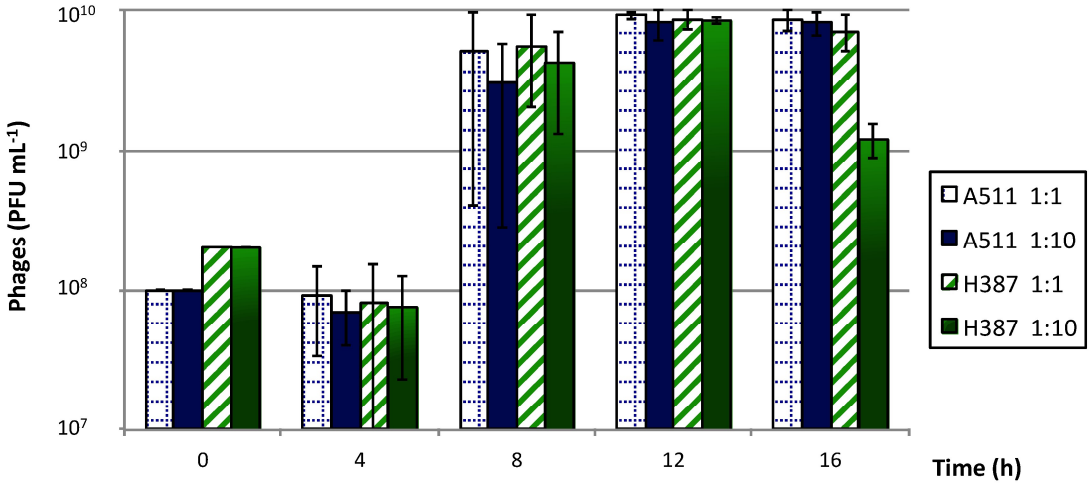



Figure 3.3. Production of phages A511 and H387 on *L. ivanovii* WSLC 3009 in liquid medium, using a 1 and 0.1 M.O.I. Phage counts were measured every 4 h. Mean values were calculated from two independent experiments, and error bars correspond to standard deviations.

**3.7.4.2. Immobilized cells used for single and successive phage propagations.** Microorganisms immobilised in polymers produce concentrated host bacteria that can be more easily and rapidly manipulated than free cells. Phage production using gel-entrapped host cells was compared to that of free cells in the same culture medium and under the same growing conditions. The highest production of virulent Listeria phages A511 and H387 was obtained after 12 h using a MOI of 1 (Fig. 3.4). The maximum phage titers achieved using entrapped cells were slightly lower than for free cells. Some phage productions reached their maximum titer after 8 h of incubation, which was faster than for the free cells.

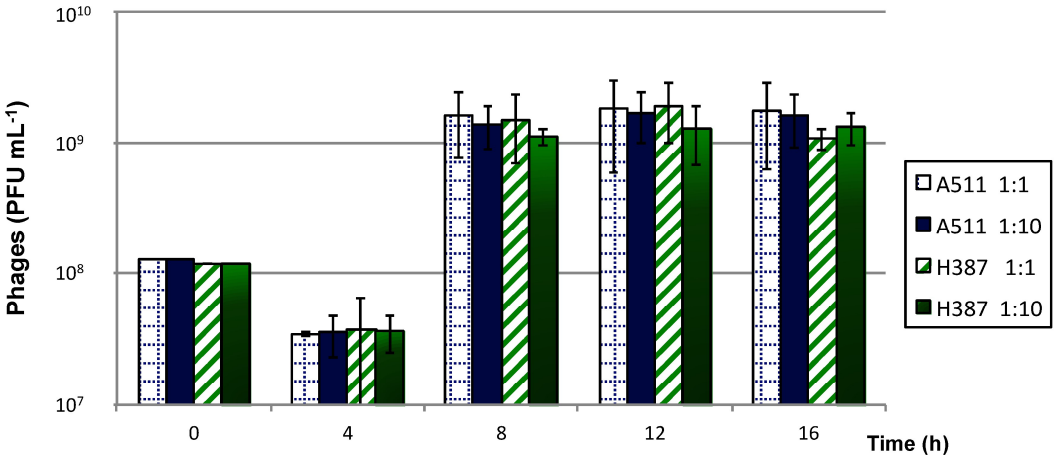



Figure 3.4. Production of phages A511 and H387 on *L. ivanovii* WSLC 3009 immobilized in alginate beads, using a 1 and 0.1 M.O.I. Phage titers were measured every 4 h. Mean values were calculated from two independent experiments, and error bars correspond to standard deviations.

Two advantages of using gel-entrapped cells to produce virulent phages are that phage particles can be easily recovered by draining the culture medium (followed by centrifugation and filtration) and that phage propagation can be immediately resumed or pursued after a short or prolonged storage period. The same alginate beads with immobilised *L. ivanovii* cells were used for four successive phage productions. In all cases, phage titers were maintained at over $10^9$ PFU mL-1 after the four productions (Fig. 3.5). In general, the final phage titers of the virulent phage A511 were higher than for phage H387.

It has been shown previously that phages infecting some lactic acid bacteria cannot penetrate calcium alginate gels [43,44]. Because *Listeria* phages are the same size as dairy phages and even larger in the case of A511 [56,57], bacterial cells are well protected from phage infection as long as they remain entrapped in the gel. It is likely that this physical constraint, protecting the integrity of the bacterial population, allows the gel beads to be reused for successive phage production in new media. This advantage cannot be provided by free-cell amplification. Only small molecules can diffuse through the alginate matrix [43]. *L. ivanovii* cells entrapped in alginate beads are, therefore, protected against phages as well as against contamination by other bacteria. The production of phages after infection of the host bacteria likely only takes place on the beads' surface and in the medium after the cells have been released from the matrix. In fact, we noticed that the structure of the alginate gel was rather

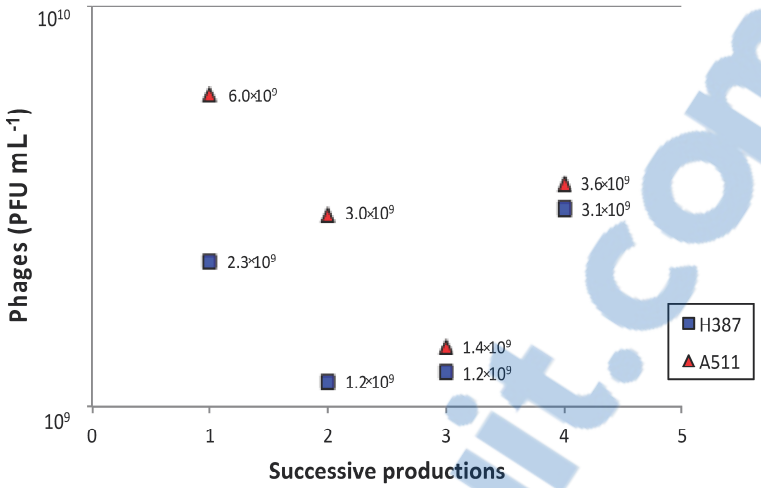



Figure 3.5. Successive productions of the two phages, A511 and H387, on *L. ivanovii* WSLC 3009 using a M.O.I. of 1. Aliquots were withdrawn after 10 h of incubation. Mean values were calculated from two independent experiments.

loose and easily broken up at the periphery of the beads, where cells usually most actively grow. These cells were likely released into the medium and infected by phages. While the process described here still requires optimisation, the gel entrapment of cells to produce specific phages offers the potential for the large-scale and rapid production of phages. Successive phage productions have shown that entrapped cells can be reused for at least four propagation cycles. Although the viral titer of lysate produced with entrapped cells was nearly 10-fold reduced compared to that of free-cell production, successive productions with the same beads should be globally seen as an interesting advantage. Continuous phage production using entrapped cells could be enhanced and applied to a large variety of phages.

**3.8. Acknowledgments.** We thank Alpha-Biotech Inc. and DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) for providing financial assistance for this study. We also thank Claude Champagne for discussion. S.M. holds the Canada Research Chair in Bacteriophages.

**3.9. Author contribution.** B.R. and J.G. conceived and designed the experiments; B.R. performed the experiments; B.R., M.J.L., J.G., and S.M. analysed the data; B.R., C.P., and S.M. wrote the paper.

**3.10. Absence of conflicts of interest.** The authors declare no conflict of interest.



Rapport-Gratuit.com

## 3.11. References


1- Radoshevich, L. & P. Cossart, (2018) *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**: 32-46.

2- Frank, F. J. & A. R. Koffe, (1989) Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protect.* **53**: 550-554.

3- Directorate-General for Health and Consumers, (2009) *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides, 28th Plenary*; Commission Européenne, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks: Bruxelles, Belgium.

4- Pearce, H., S. Messager, J.-Y. Maillard, (1999) Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* **43**: 101-108.

5- Buttimer, C., O. McAuliffe, R. P. Ross, C. Hill, J. O'Mahony, A. Coffey, (2017) Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front. Microbiol.* **8**: 34.

6- Stalin, N. & P. Srinivasan, (2017) Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Vet. Microbiol.* **207**: 83-96.

7- Bai, J., Y.-T. Kim, S. Ryu, J.-H. Lee, (2016) Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Front. Microbiol.* **7**: 474.

8- Abedon, S. T., (2015) Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage* **5**: e1020260.

9- Hagens, S. & M. J. Loessner, (2014) Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front. Microbiol.* **5**: 159.

10- Lin, D. M., B. Koskella, H. C. Lin, (2017) Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **8**: 162-173.

11- Loessner, M. J. & M. Busse, (1990) Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1912-1918.

12- Guenther, S, D. Huwyler, S. Richard, M. J. Loessner, (2009) Virulent bacteriophages for biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 93-100.

13- Klumpp, J., J. Dorscht, R. Lurz, R. Bielmann, M. Wieland, M. Zimmer, R.Calendar, M. J. Loessner, (2008) The terminally redundant, non-permuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: A model for the SPO1-like myoviruses of Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **190**: 5753-5765.

14- Silva, E. N. G., A. C. L. Figueiredo, F. A. Miranda, R. C. de Castro Almeida, (2014) Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Braz. J. Microbiol.* **45**: 11-16.

15- Chaitiemwong, N., W. C. Hazeleger, R. R. Beumer, (2014) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by disinfectants and bacteriophages in suspension and stainless-steel carrier tests. *J. Food Protect.* **77**: 2012-2020.

16- Chibeu, A., L. Agius, A. Gao, P. M. Sabour, A. M. Kropinski, S. Balamurugan, (2013) Efficacy of bacteriophage LISTEX™P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.* **167**: 208-214.

17- Miguéis, S., C. Saraiva, A. Esteves, (2017) Efficacy of LISTEX™P100 at different concentrations for reduction of *Listeria monocytogenes* inoculated in sashimi. *J. Food Protect.* **12**: 2094-2098.

18- Greer, G. G., (1986) Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth on beef spoilage. *J. Food Protect.* **49**: 104-109.

19- Ganegama Arachchi, G. J., A. G. Cridge, B. M. Dias-Wanigasekera, C. D. Cruz, L. McIntyre, R. Liu, S. H. Flint, A. N. Mutukumira, (2013) Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 1105-1116.

20- Gray, J. A., P. S. Chandry, M. Kaur, C. Kocharunchitt, J. P. Bowman, E. M. Fox, (2018) Novel biocontrol methods for *Listeria monocytogenes* biofilms in food production facilities. *Front. Microbiol.* **9**: 605.

21- Roy, B., H.-W. Ackermann, S. Pandian, G. Picard, J. Goulet, (1993) Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriaphages and a quaternary ammonium compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2914-2917.

22- Lee, S., M. G. Kim, H. S. Lee, S. Heo, M. Kwon, G. Kim, (2017) Isolation and characterization of *Listeria* phages for control of growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **37**: 320-328.

23- Agboluaje, M. & D. Sauvageau, (2018) Bacteriophage production in bioreactors. *Methods Mol. Biol.* **1692**: 173-193.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

24- Sargeant, K., K. G. Yeo, J. H. Lethbridge, K. V. Shooter, (1968) Production of bacteriophage T7. *Appl. Microbiol.* **16**: 1483-1488.

25- Chen, B. Y. & H. C. Lim, (1996) Bioreactor studies on temperature induction of the Qmutant of bacteriophage λ in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **51**: 1-20.

26- Sauvageau, D. & D. G. Cooper, (2010) Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. *Microb. Cell Fact.* **9**, 81.

27- Los, M., G. Wegrzyn, P. Neubauer, (2003) A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slow growing host cells. *Res. Microbiol.* **154**: 547-552.

28- Park, S. H. & T. H. Park, (2000) Analysis of two-stage continuous operation of *Escherichia coli* containing bacteriophage λ vector. *Bioprocess Eng.* **23**: 187-190.

29- Chen, X. A. & P. L. Cen, (2005) A novel three-stage process for continuous production of penicillin G acylase by a temperature-sensitive expression system of *Bacillus subtilis* phage phi105. *Chem. Biochem. Q.* **19**: 367-372.

30- Oh, J. S., D. Cho, T. H. Park, (2005) Two-stage continuous operation of recombinant *Escherichia coli* using the bacteriophage λ Q-vector. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **28**: 1-7.

31- Ziv, N., N. J. Brandt, D. Gresham, (2013) The use of chemostats in microbial systems biology. *J. Vis. Exp.* **80**: 50168.

32- Chao, L., B. R. Levin, F. M. Stewart, (1977) A complex community in a simple habitat: An experimental study with bacteria and phage. *Ecology* **58**: 369-378.

33- Schwienhorst, A., B. F. Lindemann, M. Eigen, (1996) Growth kinetics of a bacteriophage in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 217-221.

34- Nabergoj, D., N. Kuzmić, B. Drakslar, A. Podgornik, (2018) Effect of dilution rate on productivity of continuous bacteriophage production in cellstat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102** : 3649-3661.

35- Diviès, C., H. Prévost, J. F. Cavin, (1989) Les bactéries immobilisées dans l'industrie laitière. *Process. Mag.* 1041, 28-33.

36- Gacesa, P., (1988) Alginates. *Carbohydr. Polym.* **53**: 161-182.

37- Ackermann, H.-W. & M. S. Dubow, (1987) «Phage multiplication». In *Viruses of Prokaryotes*; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1987; Volume 1, pp. 49-85.

38- Mahony, J., D. M. Tremblay, S. J. Labrie, S. Moineau, D. van Sinderen, (2015) Investigating the requirement for calcium during lactococcal phage infection. *Int. J. Food Microbiol.* **201**: 47-51.

39- Gosmann, B. & H. J. Rehm, (1988) Influence of growth behaviour and physiology of alginate-entrapped microorganisms on the oxygen consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 554-559.

40- Cachon, R., M. Catté, R. Nommé, H. Prévost, C. Diviès, (1995) Kinetic behaviour of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* immobilized in calcium alginate gel beads. *Process Biochem.* **6**: 503-510.

41- Prévost, H., C. Diviès, E. Rousseau, (1985) Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca-alginate. *Biotechnol. Lett.* **4**: 247-252.

42- Audet, P., C. Paquin, C. Lacroix, (1988) Immobilized growing lactic acid bacteria with κ-carrageenan—Locust bean gum gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 11-18.

43- Steenson, L. R., T. R. Klaenhammer, H. E. Swaisgood, (1987) Calcium alginate-immobilized cultures of lactic *Streptococci* are protected from bacteriophages. *J. Dairy Sci.* **70**: 1121-1127.

44- Champagne, C. P., N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen, C. Lacroix, (1992) The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Res. Intern.* **25**: 419-427.

45- Champagne, C. P., S. Moineau, S. Lafleur, T. Savard, (2017) The effect of bacteriophages on the acidification of a vegetable juice medium by microencapsulated *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol.* **63**: 28-34.

46- Tanaka, H., M. Matsumura, I. A. Veliky, (1984) Diffusion characteristics of substrates in Ca alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **1**: 53-58.

47- Zink, R. & M. J. Loessner, (1992) Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 296-302.

48- Ackermann, H.-W. & M. S. Dubow, (1987) «Description and identification of new phages». In *Viruses of Prokaryotes*; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, USA; Volume 1, pp. 103-142.

49- Ortel, S. & H.-A. Ackermann, (1985) Morphologie von Neuen Listeriaphagen. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A Med. Microbiol. Infect. Dis. Virol. Parasitol.* **260**: 423-427.

50- Adams, M. H., (1959) «Methods of study of bacterial viruses». In *Bacteriophages*; Interscience Publishers, Inc.: New York, NY, USA; pp. 443-457.

51- Boyaval, P., A. Lebrun, J. Goulet, (1985) Étude de l'immobilisation de *Lactobacillus helveticus* dans des billes d'alginate de calcium. *Le Lait* **65** : 185-199.

52- Börner, R. A., M. T. A. Aliaga, B. Mattiasson, (2013) Microcultivation of anaerobic bacteria single cells entrapped in alginate microbeads. *Biotechnol. Lett.* **35**: 397-405.

53- Kurosawa, H., M. Matsumura, H. Tanaka, (1989) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 926-932.

54- Chen, K.-C. & C.-T. Huang, (1988) Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. *Enzym. Microb. Technol.* **10**: 284-292.

55- Ogbonna, J. C., Y. Amano, K. Nakamura, (1989) Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 92-96.

56- Klumpp, J. & M. J. Loessner, (2013) *Listeria* phages: Genomes, evolution, and application. *Bacteriophage* **3**, e26861.

57- Ackermann, H.-W., (2011) Bacteriophage taxonomy. *Microbiol. Aust.* **32**: 90-94.

# CHAPITRE 4

# TESTS COMPLÉMENTAIRES

## 4.1. Hémolyse

Provoquer la perte du caractère hémolytique d'une souche de *L. monocytogenes* m'a semblé être une procédure intéressante à explorer en raison de l'aspect sécuritaire qui en résulte lors de la production de certains bactériophages. L'altération de ce facteur de virulence par mutation avait pour objectif de réduire le potentiel pathogène bactérien et d'évaluer si cet effet avait un impact sur la virulence des phages à l'endroit des bactéries. L'éthyl-méthyl-sulfonate (EMS) étant un mutagène qui induit des mutations génétiques aléatoires par substitution, la réplication de l'ADN est affectée par sa présence et la déstabilisation suscitée force parfois l'ADN polymérase à effectuer des substitutions dans les paires de base d'origine, G-C en A-T, par exemple. Ces erreurs de réplication peuvent induire la perte de certaines propriétés. Ainsi, une souche native de *L. monocytogenes* IP31 a été mutée à l'aide d'EMS et renommée IP31-A (*hem*-mutant). La mutation a eu lieu en resuspendant les bactéries pendant un temps déterminé dans un tampon et en additionnant l'agent mutagène (Rai, 2012). La réaction a été interrompue par des dilutions, suivies d'un étalement sur une gélose nutritive. Après vérification, la souche IP31-A n'était plus en mesure d'effectuer des lyses autour de ses colonies lors d'une croissance sur une gélose sang. À toutes les fois que le phage H387 était produit à partir de cette souche mutante, les nouveaux virions étaient identifiés H387-A. Ces phages ont été utilisés lors des expérimentations présentées au chapitre 2. Au départ, toutes les souches de *L. monocytogenes* employées lors des analyses ont été caractérisées par différents tests biochimiques effectués avec des trousses ELISA, des galeries API et des analyses de capacité hémolytique. D'ailleurs, la capacité hémolytique des souches utilisées était régulièrement vérifiée. Les bactéries étaient soumises au test de l'hémolyse sur gélose sang, en parallèle avec les productions. La réversion d'une mutation étant possible, le maintien du caractère non-hémolytique était vérifié en même temps que le potentiel hémolytique des autres souches utilisées. Le tableau 4.1 contient les résultats des tests d'hémolyse effectués sur les souches de *L. monocytogenes* IP31, IP31-A, 8427, 10401, ainsi que sur *L. innocua* 5290 et

*L. ivanovii*, suivant une analyse réalisée en triplicata et répétée sous les mêmes conditions. Le potentiel hémolytique des souches de *L. monocytogenes* a été comparé aux deux autres espèces, *L. ivanovii* et *L. innocua*. Les tests d'hémolyse effectués sur *L. ivanovii* ont révélé que cette souche possède un caractère fortement hémolytique. Selon les observations recueillies, les souches de *L. monocytogenes* IP31, 8427 et 10401 possèdent également ce caractère hémolytique. Les lyses de globules rouges observées autour de ces colonies sont bien visibles, mais sont toutefois de moindre intensité. En ce qui concerne *L. innocua*, elle s'est avérée non hémolytique, de même que la souche mutante (IP31-A), puisque aucune zone d'hémolyse n'a pu être observée autour des colonies isolées. Du fait que la capacité hémolytique de ces souches est en lien avec la libération de la listériolysine O, le retrait de cette caractéristique confère à la souche mutante IP31-A une réduction importante de son potentiel de virulence.

Tableau 4.1. Résultats des tests d'hémolyse effectués sur *L. monocytogenes* (IP31, IP31-A, 8427, 10401) sur *L. innocua* et *L. ivanovii*.

| Souches bactériennes | Halo Hémolyse (H) |
|---|---|
| *L.m*. IP31 (sérovar 1/2b) | + |
| *L.m*. IP31-A (*hem*-mutant) | - |
| *L.m*. 8427 (sérovar inconnu) | + |
| *L.m*. 10401 (sérovar 4b) | + |
| *L. innocua* | - |
| *L. ivanovii* | +++ |

*- aucune H; + faible H; ++ moyenne H; +++ forte H*

## 4.2. Courbe de croissance

Pour procéder à la production de phages en milieu liquide ou par immobilisation des cellules hôtes dans des billes d'alginate, il faut de préférence tracer les courbes de croissance des bactéries propagatrices. Ces courbes sont essentielles pour évaluer le nombre de bactéries présentes lors de l'infection par les phages et pour déterminer à quel instant il est avantageux de procéder à l'infection. Quatre phases de croissance sont généralement observées sur les courbes. La phase de latence correspond à l'adaptation des cellules au milieu : à cette étape, aucune augmentation de la population n'est observée. La phase logarithmique (ou exponentielle) est l'étape de la division cellulaire et correspond à une croissance bactérienne s'effectuant à un taux constant : c'est à ce moment que l'infection phagique doit avoir lieu.

La phase stationnaire est l'étape de l'épuisement des éléments nutritifs du milieu et de l'accumulation de produits toxiques : à ce stade, certaines cellules meurent et le nombre de cellules viables atteint un plateau. La phase de déclin se rapporte à l'étape où la mortalité des cellules est supérieure à la production de nouvelles cellules : à ce moment, la décroissance s'accélère et devient exponentielle dans certains cas. Les courbes de croissance de trois souches bactériennes (8427, IP31 et IP31-A) ont été obtenues expérimentalement afin de permettre l'estimation du ratio phages-bactéries (M.O.I.) lors d'une production phagique. La croissance cellulaire a été analysée en mesurant la $DO_{600nm}$ des cultures dans des puits à l'aide d'un spectrophotomètre. À une température de 28 °C, la densité optique des milieux était notée à toutes les 20 minutes pendant 6 h à 10 h. La figure 4.1 permet d'évaluer la concentration de bactéries à une densité optique donnée pour la souche *L. monocytogenes* IP31. Par exemple, pour une densité optique de 0,9 (600 nm), la concentration de *L. monocytogenes* est estimée à 8 x $10^7$ ufc/ml. Les courbes de croissance des souches 8427 et IP31-A sont sensiblement identiques à celle de la souche IP31, et les phases exponentielles de croissance sont nettement comparables. Ces courbes ont servi à estimer la concentration de cellules pour d'autres souches bactériennes du même genre.

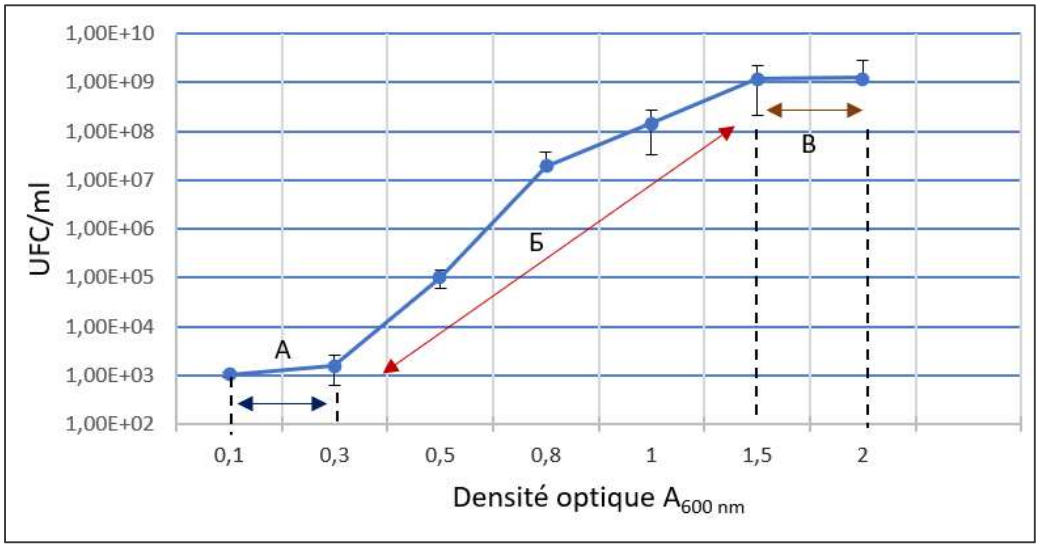



Figure 4.1. Courbe de croissance de *L. monocytogenes* IP31 (TSY-B à 28 ºC).
A : phase de latence; Б : phase exponentielle; B : phase stationnaire

### 4.3. Congélation des listériaphages

La congélation des bactériophages H387 et H387-A a été effectuée afin de vérifier leur résistance aux écarts de température et leur comportement lors de chocs thermiques négatifs impliquant des cycles de gel et dégel. Du glycérol, stérilisé par autoclavage, a été utilisé comme cryoprotecteur à une concentration finale de 20 % et les microtubes ont été conservés à 4 °C (témoin), -10 °C et -80 °C. Les résultats des phagogrammes obtenus étant identiques pour les deux phages, seules les observations portant sur le phage H387 ont été reportées dans le tableau 4.2. Les zones de lyse claires obtenues sur des tapis bactériens, suite à quatre cycles de gel et dégel à intervalles d'un mois chacun, révèlent que les listériaphages peuvent subir d'importants chocs thermiques et conserver leur potentiel lytique. L'intensité des zones lytiques formées par les témoins entreposés à 4 ºC est identique à celles formées par les phages ayant subi des cycles de congélation (-10 ºC et -80 ºC). Les titres phagiques sont demeurés stables pendant 4 mois d'entreposage ($10^8$ UFP/ml) et les zones de lyse observées

Tableau 4.2. Intensité des lyses formées sur un tapis de *L. monocytogenes* 10401 par le phage H387 après 4 cycles de gel et de dégel à -10 ºC et -80 ºC (phagogrammes : cycles de gel et dégel).

| H387 (Témoin) | Température | Listériaphage H387 (congelé-décongelé) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| cycle 0 | ºC | cycle 1 | cycle 2 | cycle 3 | cycle 4 |
| +++ | -10 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| +++ | -80 | +++ | +++ | +++ | +++ |

*Légende: +: faible lyse; ++: lyse partielle; +++: lyse totale (zone entièrement claire)*

sur les phagogrammes démontraient des régions circulaires entièrement claires. Certains phages résistent, en général, à près de 20 cycles de gel et dégel (Ackermann & Dubow, 1987) et cette stabilité à l'entreposage à basses températures favorise leur utilisation dans les produits alimentaires congelés et sur les surfaces solides froides. Toutefois, pour maintenir une activité phagique efficace, il faut s'assurer d'une concentration suffisante de particules virales et de conditions d'infection optimales. Dans une situation où l'activité phagique demeure insuffisante, un changement de phage ou une formulation combinée de type hybride est à prévoir.

### 4.4. Activités lytiques des cinq premiers listériaphages répertoriés.

Cinq listériaphages morphologiquement différents ont été testés sur huit souches de bactéries du genre *Listeria* (Tabl. 4.3). Deux bactéries, *L. monocytogenes* 10401 et *L. ivanovii*, sont lysées par les cinq morphotypes de phages. Le listériaphage H387 possède le spectre

Tableau 4.3. Spectre lytique de cinq listériaphages sur huit bactéries du genre *Listeria*.

| Phage | Bactéries lysées | Bactéries non lysées |
|---|---|---|
| 4211 | 10401, IP31, IP31-A, PE6, *L. iv*. | 8427, 1803, 1089 |
| 2671 | 10401, IP31, IP31-A, 8427, PE6, *L. iv*. | 1803, 1089 |
| 2685 | 10401, 1089, IP31-A, PE6, *L.iv*. | IP31, 8427, 1803 |
| **H387** | 10401, IP31, IP31-A, 8427, 1803, 1089, PE6, *L. iv*. | Aucune |
| 2389 | 10401, 1089, PE6, *L. iv*. | IP31, IP31-A, 8427, 1803 |

d'activité le plus large et efficace, puisque qu'il a fortement lysé toutes les souches bactériennes avec des zones de lyse claires et bien définies. D'autres phagogrammes ont été réalisés sur 10 isolats de *L. monocytogenes* de différentes provenances et, de tous les phages de notre banque (>15), le phage H387 est celui qui s'est révélé le plus actif avec une performance de plus de 75 %.

### 4.5. Souches résistantes

Des spectres d'activité de listériaphages individuels (monophages) et combinés (multiphages) ont été étudiés sur quatre souches bactériennes résistantes récupérées suite à des propagations en milieu solide (TSA, production classique). Au départ, les isolats résistants présents au centre d'une zone de lyse ont été récupérés, testés à nouveau pour confirmer leur résistance et ont finalement subi une nouvelle attaque par d'autres types de listériaphages. Les résultats des phagogrammes ont démontré que 100 % des colonies résistantes se sont montrées vulnérables ou affaiblies à leur contact (Tabl. 4.4). La résistance aux phages observée avec la souche 10401 a pu survenir à l'une ou l'autre des principales étapes du cycle lytique. Cette souche, appartenant au sérovar 4, est très sensible aux listériaphages et, suite à une persistance, le fait d'utiliser un autre phage n'ayant eu aucun contact préalable avec la souche

Rapport-Gratuit.com

Tableau 4.4. Spectres lytiques, de phages individuels et combinés, réalisés sur quatre colonies résistantes (phagogrammes : résistances).

| Origine des résistants Φ/βac. | H387 | H387-A | 2671 | H387+2671 | H387 + H387-A + 2671 |
|---|---|---|---|---|---|
| 2389/10401 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| 2685/10401 | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| H387-A/10401 | - | - | + | ++ | ++ |
| H387/10401 | - | + | + | + | ++ |

*+: faible lyse; ++: lyse partielle; +++: lyse totale (zone entièrement claire et définie); -:aucune*

sauvage a permis de nouveau son éradication. Ces résultats appuient l'importance d'effectuer des rotations de phages dans les formulations d'antimicrobiens. Il serait même bénéfique, comme déjà mentionné, de combiner les phages avec des agents chimiques afin de maximiser leur éradication et de minimiser le risque de résistance.

### 4.6. Influence du pH, de la température et de l'aération

Certains paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la température et l'aération, peuvent influencer l'adsorption des particules virales à la paroi bactérienne. Des spectres lytiques ont été faits sur milieu solide (TSA, pH ajustés) pour mesurer l'effet combiné de la température et du pH. Aucune zone de lyse n'a été observée sur la souche IP31-A après une incubation de 18 h aux pH 4,3 et 9,3 (Tabl. 4.5). Étant donné que ces pH sont les extrêmes de croissance des *Listeria*, leur développement est fortement limité (Brenner *et al*., 2006). Il est possible

Tableau 4.5. Intensité des zones de lyse en fonction du pH et de la température (phage H387 sur *L. monocytogenes* IP31-A). Observations de zones de lyse après 18 h, (phagogrammes : influence combinée de la température et du pH).

| pH Température | 4,30 | 5,30 | 6,30 | 7,30 | 8,30 | 9,30 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 37 ºC | - | + | ++ | ++ | + | - |
| 26 ºC | - | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 13 ºC | - | ++ | ++ | +++ | ++ | - |
| 4 ºC | - | - | - | - | - | - |

*+: faible lyse; ++: lyse partielle; +++: lyse totale (zone entièrement claire); -: aucune*

qu'une croissance cellulaire avec une faible production de phages soit observable après un temps d'incubation prolongé à ces pH extrêmes. Il est toutefois intéressant de constater que l'activité lytique du phage H387 couvre une large gamme de pH. Ce phage est d'ailleurs très actif (+++) entre les pH 5,3 et 8,3, particulièrement à une température de 26 ºC. Ces résultats confirment la stabilité des listériaphages en milieux acides et basiques et concordent avec des paramètres vérifiés chez d'autres phages (Jończyk, *et al*., 2011). De plus, considérant que les zones de lyse sont maximales et constantes à une température de 26 ºC et sachant que la température optimale de croissance de *L. monocytogenes* est de 37 ºC, une production de listériaphages peut être envisagée à des intervalles se situant entre 26 ºC et 30 ºC. Les résultats des spectres lytiques témoignent d'un développement rapide des cellules à 37 ºC et l'apparition de zones de lyse moins bien définies à cette température. Ceci pourrait s'expliquer par un déséquilibre dans le ratio phages-bactéries, découlant d'une croissance microbienne importante. Une évaluation de la réplication des phages dans des conditions aérobes et anaérobes a été également effectuée. Quatre phages ont été testés sur des géloses TSA contenant un tapis bactérien des souches 10401 et IP31 et ayant été incubées dans une jarre anaérobie (GasPak). Les croissances bactériennes observables sur les géloses étaient très faibles en condition anaérobe, mais habituelles en condition aérobe à une température de 26 ºC. La propagation des phages en milieu solide est donc plus efficace en aérobie qu'en anaérobie (Tabl. 4.6).

Tableau 4.6. Intensité des zones de lyse sous des conditions aérobies et anaérobies (phagogrammes : oxygénation à 26 ºC).

| Phage/Souche | Aérobie | Anaérobie |
|---|---|---|
| 2685/10401 | ++ | - |
| 2671/IP31 | ++ | - |
| H387/IP31 | +++ | + |
| H387-A/IP31 | +++ | + |

*+ faible lyse; ++ lyse partielle; +++: lyse totale (zone entièrement claire et bien définie)*; *- aucune lyse.*

### 4.7. Courbe d'amplification phagique - burst size (effectif viral)

L'efficacité d'une production de phages est évaluée en déterminant la quantité maximale de phages qui peut être relarguée par une cellule bactérienne (effectif de la progéniture ou burst size). Des courbes d'amplification ont été réalisées en préparant d'abord une culture bactérienne de 16 h à 18 h d'incubation à 28 ºC. Un prélèvement de ce milieu en phase



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

stationnaire a été ajouté à un bouillon nutritif frais, puis incubé à 28 ºC jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600nm}$ de 0,80 à 0,90 ($\approx 1 \times 10^8$ UFC/ml). Après l'ajout de $CaCl_2$ (10 mM), les phages ont été introduits à une M.O.I. de 0,1 et le mélange a été incubé à 28 ºC pendant 10 minutes. Les cellules infectées ont ensuite été diluées de façon séquentielle. Des prélèvements de 100 µl des dilutions effectuées ont été ajoutés à 500 µl de bactéries et soumis à des ensemencements suivis d'une incubation à 28 ºC pendant 16 h. Des échantillons ont été prélevés à toutes les 10 minutes pendant 3 heures afin d'évaluer le nombre de phages (Φ) relâchés.

Très peu d'études ont été effectuées spécifiquement sur le nombre de listériaphages produits par des souches de *Listeria* infectées. Les productions de listériaphages réalisées lors des expérimentations ont été faites à partir de souches en phase exponentielle de croissance. Lorsqu'une production de phages s'effectue en phase stationnaire, les bactéries deviennent alors de mauvaises cellules hôtes pour le développement de particules virales. L'adsorption des phages à la paroi est habituellement d'une durée de quelques minutes et est suivie d'une période de latence avant une augmentation marquée du nombre de virions détectés. Autant la période de latence que l'effectif de la progéniture (burst size) varient en fonction du phage, de l'hôte et des conditions du milieu (Kutter *et al*., 2004). Des travaux réalisés sur le listériaphage virulent A511, de la famille des *Myoviridae*, démontrent que l'effectif viral peut atteindre 1,7 log, un équivalent de 50 particules par cellule (Stambach *et al*., 2015). Les nombres de listériaphages H387 et 2671 (*Siphoviridae*) libérés peuvent varier, quant à eux, de 10 à 32 particules par cellule, un équivalent de 1 à 1,5 log d'augmentation (tests préliminaires et productions pour la réalisation des diverses expérimentations).

La figure 4.2 présente le comportement de la souche *L. monocytogenes* (IP31) lors d'une infection par le phage H387. Une diminution importante du compte bactérien s'observe par une réduction significative de la densité optique en raison de l'infection par le phage. Ce comportement est également observable lors de l'infection de la souche *L. ivanovii* 3009 WSLC par le phage A511. Les croissances bactériennes ont été rapidement interrompues dans la première heure de contact avec les phages. Le « burst size » mesuré suite à l'infection par le phage A511 est évalué à plus de 30 virions par cellule (Fig. 4.3). Les très nombreuses productions de listériaphages effectuées sur plus de 4 ans, permettent d'évaluer la quantité

de particules phagiques libérées entre 10 et 60 par cellule et la période d'éclipse est d'une durée d'environ 15 minutes (Fig. 4.3).

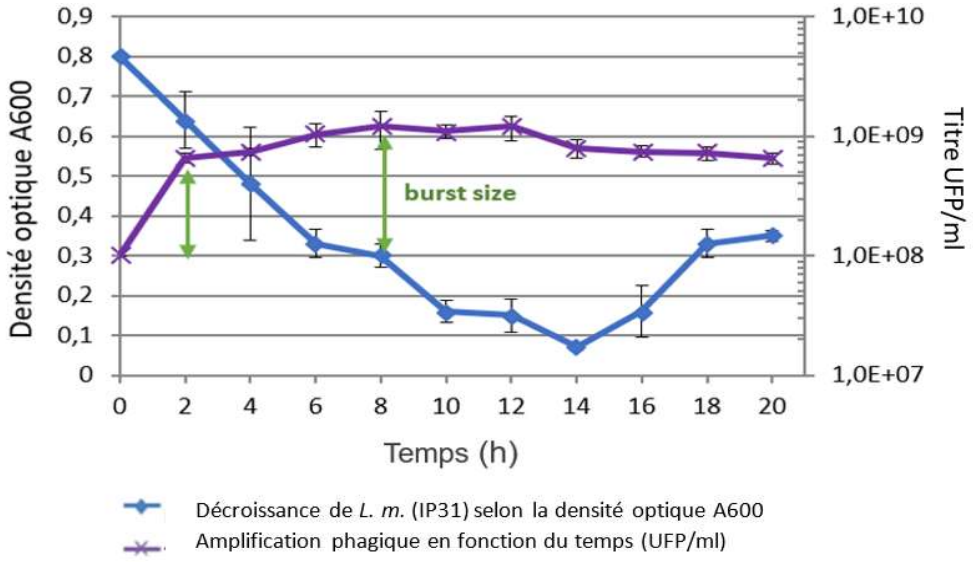



Figure 4.2. Courbe d'amplification phagique et de décroissance cellulaire. Comportement de la souche *L. monocytogenes* IP31 lors de la production du phage H387 en milieu liquide (M.O.I. de 0,1) à 28 ºC (burst size : plus de 10 phages).

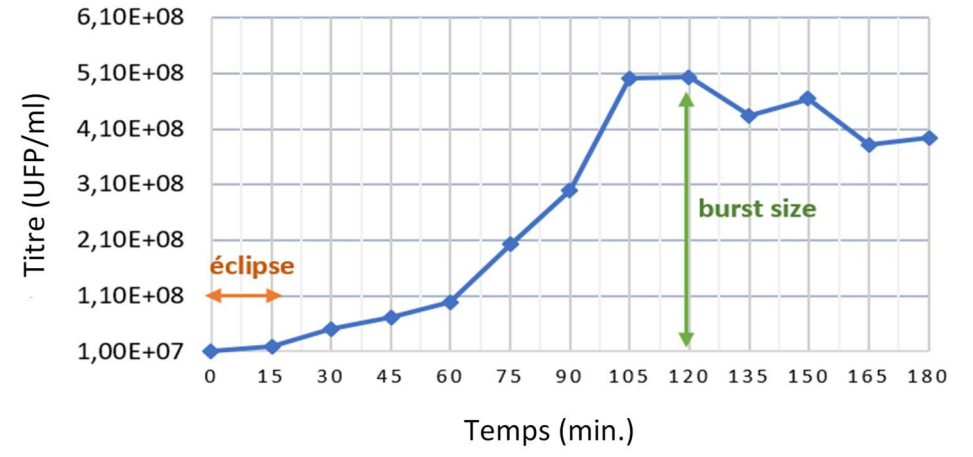



Figure 4.3. Courbe d'amplification phagique lors de la production du phage A511 sur la souche *L. ivanovii* 3009 en milieu liquide (M.O.I. de 0,1) à 28 ºC (Évaluation du burst size : plus de 30 phages relargués).

# CHAPITRE 5

# DISCUSSION GÉNÉRALE

Au terme de plus de huit décennies d'utilisation des antimicrobiens, les bactéries pathogènes humaines et animales ont atteint des niveaux très élevés de résistance vis-à-vis de nombreuses molécules. Pour contrer cette problématique, les phages pourraient être un moyen naturel de rechange. Puisque leur capacité à détruire les bactéries a été observée *in situ* il y a de cela plus de 100 ans, et que leur action lytique est continuelle depuis des millions d'années, les phages représentent peut-être un espoir de stabilité dans la lutte contre les bactéries pathogènes. Leur exploitation en tant qu'agents de biocontrôle mérite une attention, et leur potentiel bactéricide se doit d'être analysé et optimisé.

## 5.1. Atteinte des objectifs : phagoassainissement

Les objectifs généraux de cette étude ont d'abord consisté à approfondir les connaissances sur les moyens d'inhiber *Listeria monocytogenes* à l'aide de solutions de phages, seuls ou en combinaison avec de l'ammonium quaternaire. La vérification d'un effet synergique possible de ces combinaisons a fait partie intégrante de cette recherche pour développer un phagoassainisseur. Les objectifs présentés ont été atteints, les phages permettent de diminuer la quantité de bactéries contaminant les surfaces d'acier inoxydable et de polypropylène. Les résultats obtenus ont démontré que l'utilisation des listériaphages H387, H387-A et 2671 comme assainisseurs de surfaces solides est aussi efficace que l'emploi d'une solution de 20 ppm d'ammonium quaternaire. Une réduction de 99 à 99,9 % (2 à 3 log) du compte bactérien a été observée sur les surfaces d'acier inoxydable et de polypropylène (Roy *et al*., 1993). Leur combinaison avec l'ammonium quaternaire a permis d'augmenter légèrement leur efficacité. Cette amélioration est possiblement due aux différents types d'agressions procurés par les moyens d'attaque diversifiés, reliés à la molécule de benzalkonium et aux entités virales (chapitre 2, Inactivation biologique). L'augmentation de l'effet létal, observée lors de la combinaison des listériaphages avec le QUATAL, a permis de confirmer l'hypothèse que l'utilisation de deux antimicrobiens de nature différente peut procurer une meilleure destruction de la population bactérienne. Dans le but de maintenir les bénéfices procurés par

la combinaison de phages, des mélanges contenant un nombre restreint de virus (2 à 4 types de phages) seraient à privilégier. Ce procédé limitatif évite l'écoulement trop rapide de l'arsenal phagique et permet d'effectuer des rotations ou d'insérer de nouvelles particules virales si le développement de résistances se présente. Il est également nécessaire de diversifier la nature des antimicrobiens afin d'augmenter les cibles d'attaque. Les formulations monophages, multiphages (cocktail), de phages combinés à des antibiotiques ou des désinfectants (solutions hybrides), également des solutions contenant des phages et des bactériocines ou des phages en mélange avec des endolysines sont toutes des stratégies envisageables comme armes supplémentaires pour mieux contrôler la présence de *L. monocytogenes* dans notre environnement.

En somme, les virus tempérés doivent nécessairement être évités lors des formulations d'antimicrobiens à base de phages. Les phages tempérés peuvent certes détruire les bactéries, mais puisqu'ils peuvent modifier le génome bactérien en s'intégrant à ce dernier, ils représentent des risques de transmission de gènes qui peuvent favoriser la survie des microorganismes ciblés. L'emploi de phages lytiques est donc une condition *sine qua non* dans l'élaboration d'antimicrobiens. Cette catégorie de phages doit être efficace non seulement en exprimant une forte virulence vis-à-vis les bactéries visées, mais doit aussi démontrer une stabilité en conditions environnementales hostiles. L'utilisation de phages virulents, tels que les phages A511, P100 et P70, est fortement conseillée pour optimiser l'assainissement et même recommandée pour favoriser la conservation. Puisque de nombreuses études ont démontré que leur efficacité est très élevée et qu'ils sont sans danger pour la santé humaine, leur utilisation comme agents de biocontrôles est à prescrire (chapitre 1, Bactériophages). Quant au phage H387, puisqu'il s'est avéré efficace contre une grande variété de souches de *L. monocytogenes*, il serait très intéressant d'approfondir sa caractérisation par une analyse génomique, tout en vérifiant s'il contient une intégrase et des gènes codant pour des facteurs de virulence.

### 5.2. Atteinte des objectifs : phagoproduction par immobilisation

Les phages A511 et H387 ont un spectre d'activité très étendu et, par conséquent, ils ont fait l'objet d'évaluations plus poussées en regard d'une production à partir de cellules

immobilisées (chapitre 4, Tests complémentaires). Lors de cette recherche, ce nouveau moyen de produire des phages a été exploré en vue de faciliter leur exploitation à plus grande échelle. L'inclusion de bactéries dans des réseaux macromoléculaires d'alginate pourra faciliter, lorsque tous les paramètres seront davantage standardisés, une amplification rapide de phages. En effet, plus de trois productions ont été réalisées successivement, permettant d'atteindre des concentrations de phages de l'ordre de $10^9$ UFP/ml (Roy *et al*., 2018). La simplicité de formation des billes, leur concentration élevée en bactéries (> $10^8$ UFC/ml) et l'attraction nulle des phages envers le support d'immobilisation (alginate) démontrent qu'il est possible de produire des phages en grandes quantités et de les récupérer facilement (chapitre 3, Production de bactériophages). D'autres part, la production des phages A511 et H387 par inclusion bactérienne dans des billes d'alginate a permis de confirmer l'hypothèse que cette méthode est plus avantageuse que la production sur gélose en raison des quantités supérieures de phages récoltés et est aussi efficace que la production en milieu liquide. De plus, cette procédure, qui peut s'effectuer en continu, pourrait offrir une stabilité génétique de l'inoculum bactérien dans le temps grâce à la protection qu'offrent les réseaux glucidiques contre le contact trop rapide avec les virus. Ce phénomène de protection, déjà connu dans l'immobilisation de genres de bactéries autres, est à être confirmé pour *L. monocytogenes*. Sans oublier les possibilités de conserver sur le long terme les bactéries productrices incluses, sous azote liquide, par lyophilisation ou simplement par congélation, tests qu'il serait intéressant d'approfondir dans une vision d'application.

### 5.3. Capacités lytiques sous contraintes, résistance bactérienne et évolution

La stabilité des phages étant un facteur déterminant de leur efficacité, des tests de lyse sous contraintes ont été effectués avec le phage H387. Les résultats ont démontré qu'il demeure actif suite à au moins quatre cycles de congélation à -80 ºC, qu'il est le plus efficace des cinq premiers listériaphages répertoriés (H387, 2671, 2685, 2389 et 4211), et qu'il est plus performant en condition aérobie. Ses capacités lytiques se révèlent plus élevées à des pH près de la neutralité avec des températures variant entre 10 ºC et 26 ºC (chapitre 4, Tests complémentaires). De plus, des analyses ont confirmé qu'il pouvait lyser des souches devenues résistantes envers d'autres phages (chapitre 4, Tests complémentaires). Ces résultats viennent confirmer que la résistance d'une bactérie face à un phage est un

phénomène contournable par l'emploi d'un autre phage non apparenté (chapitre 1, Bactériophages et chapitre 4, Tests complémentaires). Parce qu'ils sont assortis aux récepteurs présents en surface de la paroi de leur hôte, les phages sont sous l'influence des modifications moléculaires que les bactéries peuvent réaliser. Chez les *Listeria*, ces récepteurs sont les acides téichoïques de la paroi bactérienne, ainsi que les glucosamines. Même s'il a été démontré qu'une diminution de la sensibilité bactérienne pouvait être observée envers le listériaphage P100 par exemple (Fister *et al*., 2016a), un constat à l'avantage des phages est le processus évolutif qui leur permet de se maintenir. Les ligands phagiques sont, de ce fait, labiles et sujets à des modifications dynamiques et adaptatives, et cette capacité d'adaptation *sui generis* est inexistante pour les molécules chimiques. Ainsi, les mécanismes impliqués lors de la lyse bactérienne par les phages sont totalement différents de ceux engendrés par des produits inertes. Les bactériophages étant des prédateurs naturels des bactéries, leur persistance repose sur leur capacité à demeurer infectieux. On peut alors qualifier les bactériophages de structures biologiques automodifiables puisqu'ils doivent, pour assurer leur persistance, s'ajuster à leur hôte. Ainsi, au fil du temps, ils évoluent pour maintenir leurs compétences d'infection et de prolifération. Au final, les résistances bactériennes envers les antibiotiques et autres produits chimiques, engendrées notamment par des expositions répétitives et prolongées, imposent le développement de produits de remplacement dotés de capacités évolutives dans le temps, tels que les phages.

### 5.4. Nombre de phages libérés et fiches signalétiques

Pour parvenir à bien maîtriser le contrôle de *L. monocytogenes* par les phages, tous les paramètres physicochimiques qui leurs sont rattachés et qui influent sur les conditions d'éradication doivent être soigneusement déterminés. La courbe de croissance de l'organisme ciblé doit être connue afin de bien évaluer les multiplicités d'infection à promouvoir. De façon générale, le nombre des listériaphages H387 et A511 libérés par bactérie infectée varie de 10 à 50 particules phagiques (1 à 1,7 log), et peut occasionnellement franchir près de deux log. En sachant que les souches les plus grandement incriminées appartiennent aux sérovars 1/2a, 1/2/b et 4b, leurs courbes de croissance devraient être répertoriées et, surtout, facilement disponibles. Par ailleurs, même si des études démontrent qu'il est nécessaire d'utiliser des concentrations élevées de phages pour détruire efficacement

les bactéries, ce constat ne doit en rien exclure que toutes les conditions abiotiques optimales doivent être paramétrées et mentionnées dans des fiches signalétiques rapidement consultables. Les documents de référence actuels sur les listériaphages doivent être consolidés en ajoutant davantage d'information sur leur spectre lytique et les conditions favorisant leurs performances.

### 5.5. Retour sur la persistance de *L. monocytogenes* dans l'intestin : implication de l'adsorption des phages.

Dans un contexte de gestion du risque sanitaire lié aux aliments, il est indispensable de mieux comprendre la virulence de *L. monocytogenes* et de caractériser les points critiques de ses procédures d'invasion. La chaîne des événements impliqués dans l'apparition de l'infection est maintenant connue (chapitre 1, Mécanismes de virulence). De nombreux facteurs de virulence ont été identifiés, lui procurant d'étonnantes capacités d'infection surpassant celles de plusieurs autres bactéries pathogènes. Ces attributs de virulence la placent au sommet des pathogènes les plus habiles et lui confèrent le statut de bactérie de référence. Les capacités invasives de *L. monocytogenes* dans nos cellules la rendent plus difficilement atteignable par les phages lorsqu'elle parvient à traverser la barrière intestinale. Les listériaphages déposés sur les aliments et les surfaces en vue de diminuer les concentrations de bactéries agissent donc en première ligne de défense, en réduisant les concentrations de pathogènes ingérés. Les phages n'étant pas en mesure de rejoindre les bactéries à l'intérieur des cellules somatiques, leur action sur le pathogène se limite actuellement à la lumière intestinale.

### 5.6. Bilan final

Considérant que les antimicrobiens nocifs pour l'humain sont de moins en moins tolérés dans l'alimentation contemporaine et que les produits désinfectants nuisibles sont directement impliqués, les phages, déjà présents dans notre flore, représentent donc une voie prometteuse, non seulement pour les pathogènes du genre *Listeria*, mais également pour tous les autres types de bactéries indésirables pouvant se retrouver dans le secteur agroalimentaire. Devant la résistance d'un nombre grandissant de bactéries à divers antibiotiques, additifs alimentaires et assainisseurs chimiques, les bactériophages sont dans la course comme agent antibactérien.

Force est de constater que les études sur l'exploitation des capacités lytiques des phages se sont sérieusement intensifiées au cours des deux dernières décennies. Ce bilan de recherches témoigne du haut potentiel des phages comme agents bactéricides et les a conduits à devenir des agents de conservation alimentaire et des composants spécifiques dans des solutions désinfectantes pour les surfaces (chapitre 1, Biocontrôle par les phages). L'émission d'une approbation autorisant l'emploi d'un nouveau produit à base de phages repose sur des études devant en démontrer l'innocuité, l'efficacité et aussi les besoins qui y sont rattachés, d'où l'importance de la présente thèse.

### 5.7. Conclusion et perspectives

En conclusion, ce projet aura contribué à augmenter les connaissances sur l'action lytique des listériaphages lors d'une décontamination de surfaces et lors de leur amplification. Conséquemment, il aura encouragé la mise en valeur de leur utilisation au service de l'humain et de l'environnement. La présence de *L. monocytogenes* dans notre alimentation demeure un risque sanitaire important, puisque le taux de mortalité qu'elle engendre est encore élevé. Parce qu'elle est l'agent étiologique de la listériose humaine, plusieurs pays travaillent à son inhibition préventive. Cet état de vigilance est dû au constat de son haut potentiel d'invasion dans les cellules humaines et au développement progressif de résistances des *Listeria* envers plusieurs agents de contrôle. En sachant que l'origine des infections se trouve presque essentiellement dans les produits alimentaires et que les usines de transformation sont fortement exposées aux contaminations par ce pathogène, des mesures sanitaires mettant l'accent sur l'hygiène personnelle des employés, l'utilisation de gants et de filets et la propreté des surfaces ont donc été enseignées aux ouvriers œuvrant dans le domaine agroalimentaire. Des campagnes de sensibilisation et d'information ont été élaborées et intégrées dans les industries via les méthodes de contrôle et de gestion des risques. Cette sensibilisation a certes évité une augmentation trop importante du fléau de la listériose, mais n'a pu l'éliminer complètement**,** non seulement en raison de la présence fréquente de *L. monocytogenes* dans les matières premières alimentaires, mais aussi à cause du vieillissement de la population, de l'augmentation des maladies immunitaires, du nombre de cancers, et donc d'un plus grand nombre de gens vulnérables.

Bien que l'utilisation des phages en biocontrôle n'exclue pas l'apparition de résistances, des moyens limitant ce phénomène, outre l'utilisation de phages non apparentés, peuvent être développés. Il serait envisageable, par exemple, d'effectuer des manipulations génétiques afin de rendre un phage plus virulent en lui conférant, notamment, une plus grande polyvalence d'adsorption. Dans une autre perspective, poursuivre les études sur les effets synergiques des combinaisons de phages et autres antimicrobiens demeure une voie contribuant à optimiser l'emploi de phages en biocontrôle. Quant à la production de phages par immobilisation, la conservation potentielle des cellules hôtes dans des billes est un atout majeur de cette nouvelle méthode. Parmi les autres avantages de ce nouveau procédé, mentionnons la diminution des coûts de production lorsque les paramètres seront optimisés et normalisés. Restera à évaluer la stabilité génétique des cellules à l'intérieur de la structure matricielle, ainsi que le relâchement progressif des cellules et la résistance du gel lui-même aux pressions hydrostatiques. Les technologies exploitant les bactéries incluses dans un réseau d'alginate pour produire de grandes variétés de phages sont sans doute appelées à faciliter leur production à l'échelle industrielle. Des tests de production dans des matrices d'alginate sous d'autres formes, notamment en filet, membrane ou treillis, seraient intéressants à mener (annexe 6). Également, optimiser le nombre de phages relargués par les bactéries en paramétrant l'ajout de catalyseurs ioniques ou la sélection d'une souche hôte optimale est à recommander.

Les phages ont désormais leur place en industrie agroalimentaire, non seulement pour assurer la sécurité des denrées, mais aussi pour l'assainissement spécifique des surfaces. Les phages se sont avérés efficaces sur des surfaces inertes pour éliminer des bactéries ou des biofilms (Roy *et al*., 1993; Scott *et al.*, 2007). En projection à moyen terme, ils pourraient également être employés pour l'aseptisation du matériel médical et des surfaces en milieu hospitalier. Les phages lytiques pourraient par ailleurs apporter leur contribution pour combattre les infections nosocomiales. En ce qui concerne la thérapie en dehors des centres déjà établis en Géorgie et en Pologne, l'entreprise française Pherecydes Pharma développe des solutions de phages pour traiter les infections que subissent les grands brûlés. La phagothérapie, en Amérique, n'a d'autre choix que de tendre vers un développement. Depuis 2006, différentes formulations de phages pour lutter contre plusieurs pathogènes dans le secteur

agroalimentaire sont disponibles sur le marché et cette ouverture permettra vraisemblablement d'augmenter l'étendue de l'utilisation des phages, notamment pour des phagotraitements de type C2 en phagothérapie (Fig. 1.31). En ce qui concerne la crainte existante quant à l'emploi abusif des phages, telle qu'observée avec l'utilisation des antibiotiques, leur capacité d'évolution sera toujours un avantage puisque après un certain temps, ils devront s'adapter pour assurer leur existence. On peut même envisager de forcer leur évolution en laboratoire en exposant des phages à des bactéries qui leur sont résistantes. Il n'en demeure pas moins qu'il faudra encadrer rigoureusement cette ressource afin d'en exploiter judicieusement la capacité lytique.

Pour terminer, même si l'activité désinfectante des phagoassainisseurs démontre un potentiel intéressant, d'autres analyses, en regard notamment d'une plus grande variété de formulations de phages combinés et non apparentés, sont nécessaires. En production immobilisée, des essais doivent être poursuivis via un fermenteur sous paramètres contrôlés et des analyses de rendement d'amplification devront être parallèlement réalisées. Le nombre maximal de cycles de production, suivant les meilleures conditions de stabilité, et le temps de conservation des billes en fonction de l'activité bactérienne en leur sein devront être établis. Envisager une double membrane pour prolonger l'utilisation des billes serait une voie à explorer. À long terme, l'acquisition de nouvelles connaissances en biologie phagique demeure nécessaire pour comprendre davantage les diverses interactions avec les bactéries hôtes. Des vérifications pourraient aussi être entreprises pour savoir quels sont les impacts de la listériolysine O sur l'activité des phages. Des études sur le maintien de leur innocuité, notamment par la vérification de l'absence de gènes codant pour des enzymes d'intégration, doivent se poursuivre et devenir une vérification de routine. Toutes ces précisions auront un impact majeur sur la compréhension des mécanismes de résistance des bactéries à l'endroit des phages. Ainsi, connaître les modifications bactériennes en jeu lors d'une reconfiguration moléculaire anti-phage est d'une importance fondamentale pour une meilleure exploitation des phages comme antimicrobiens. Des avancements considérables sont à prévoir dans le domaine de la biologie des phages avec la technologie CRISPR-Cas9 et l'essor que subira leur exploitation sera en lien avec l'émergence des champs de recherche orientés vers les phago-nanothérapies, les phagoadditifs, les phagoassainisseurs et la phagodétection.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Privilégier une faible utilisation d'antibiotiques, une quantité réduite d’additifs alimentaires et une concentration modérée d’assainisseurs, grâce à un effet combinatoire et synergique avec des bactériophages, permettrait de réduire la présence de substances toxiques dans la chaîne alimentaire humaine.

# BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

## Auteurs

-A-


Aase B., G. Sundheim, S. Langsrud, L. M. Rørvik, (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Intern. J. of Food Microbiol*. **62**: 57-63. doi:10.1016/S0168-1605(00)00357-3.

Ackermann, H.-W. & M. S. Dubow, (1987) In: *Viruses of Prokaryotes (vol.1 & 2)*. Boca Raton, CRC Press. Inc.

Ackermann, H.-W., (2006) Classification of bacteriophages. In: *The Bacteriophages (2e édition)*. New York, Oxford University Press, chap. 37.

Ackermann, H.-W., (2011) Bacteriophage taxonomy. *Microbiol. Austr.* **32**: 90-94. doi:10.1071/MA11090.

Adams, M. H., (1959) In: *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers Co. Inc.

Akhtar, M., S. Viazis, K. Christensen, P. Draemer, F. Diez-Gonzalez, (2017) Isolation, characterization and evaluation of virulent bacteriophages against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **75**: 108-115. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.035.

Al-Dajani, O. & R. Khatib, (1983) Cryptogenic liver abscess due to *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.* **147**: 961. doi:10.1093/infdis/147.5.961.

Audet, P., C. Paquin, C. Lacroix, (1988) Immobilized growing lactic acid bacteria with K-carrageenan - locust- bead gum gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 11-18. doi: 10.1007/BF00258344.

Audurier, A., A. G. Taylor, B. Carbonnelle, J. McLauchlin, (1984) A phage typing system for *Listeria monocytogenes* and its use in epidemiological studies. *Clin. Investig. Medic.* **7**: 229-232.

Ayeche R. & A. Balaska, (2010) Caractérisation et traitement par coagulation-floculation d'un effluent de laiterie. *J. Société Algér. Chim.* **20**: 83-93.

Aznar, R. & B. Alarcón, (2003) PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 958-966. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02066.x.

Balogh, B., J. B. Jones, M. T. Momol, S. M. Olson, (2005) Persistence of bacteriophages as biocontrol agents in the tomato canopy. *Acta Hortic. (ISHS)* **695**: 299-302. doi:10.17660/ActaHortic.2005.695.34.

Barfoot, R., S. Denham, L. A. Gyure, J. G. Hall, S. M. Hobbs, L. E. Jackson, D. Robertson, (1989) Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph. *Immunology* **68**: 233- 239.

Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath, (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712. doi:10.1126/science.1138140.

Barrow, P., M. Lovell, A. Berchieri Jr., (1998) Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 294-298.

Berche, P., (2005) Physiopathologie et épidémiologie de la listériose. *Bull. Acad. Natle Méd.* **189**: 507-521.

Beridze, M. A., (1938) In: *Role of bacteriophage therapy in combating of purulent skin infections.* Tbilisi, Georgia, Medgiz.

Berry, E. D., R. W. Hutkins, R. W. Mandigo, (1991) The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. *J. Food Protect.* **54**: 681-686. doi:10.4315/0362-028X-54.9.681.

Bertsch, D., J. Rau, M. R. Eugster, M. C. Haug, P. A. Lawson, C. Lacroix, L. Meile, (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 526-532. doi:10.1099/ijs.0.036947-0.

Beuchat, L. R. & R. E. Brackett, (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1367-1371.

Bielmann, R., M. Habann, M. R. Eugster, R. Lurz, R. Calendar, J. Klumpp, M. J. Loessner, (2015) Receptor binding proteins of *Listeria monocytogenes* bacteriophages A118 and P35 recognize serovar-specific teichoic acids. *Virology* **477**: 110-118. doi:10.1016/j.virol.2014.12.035.

Bille, J., B. Catimel, E. Bannerman, C. Jacquet, M. N. Yersin, I. Caniaux, D. Monget, J. Rocourt, (1992) API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1857-1860.

Bird, P., J. Flannery, E. Crowley, J. Agin, D. Goins, L. Monteroso, D. Benesh, (2015) Evaluation of 3M™ molecular detection assay (MDA) *Listeria* for the detection of *Listeria* species in select foods and environmental surfaces: collaborative study, first action 2014.06. *J. AOAC Intern.* **98**: 993-1002. doi:10.5740/jaoacint.15-026.

Bird, P., J. Flannery, E. Crowley, J. Agin, D. Goins, L. Monteroso, D. Benesh, (2017) Evaluation of 3M™ molecular detection assay (MDA) 2-*Listeria* for the detection of *Listeria* species in select foods and environmental surfaces: collaborative study, first action 2016.07. *J. AOAC Intern.* **100**: 82-98. doi:10.5740/jaoacint.16-0236.

Bjorland, J., T. Steinum, M. Sunde, S. Waage, E. Heir, (2003) Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3046-3052. doi:10.1128/AAC.47.10.3046-3052.2003.

Bortolussi, R., C. M. J. E. Vadenbroucke-Grauls, N. S. Van Asbeck, J. Verhoef, (1987) Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxydative agents generated by neutrophils and enzyme systems. *Infect. Immun.* **55**: 3197-3203.

Boutibonnes, P., (1997) La mort des bactéries: provoquée ou programmée? Subie ou voulue? *Medicine Sciences* **13**, 73-80. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01300.x.

Boyaval, P., A. Lebrun, J. Goulet, (1985) Étude de l'immobilisation de *Lactobacillus helveticus* dans des billes d'alginate de calcium. *Le Lait* **65**: 185-199. doi:10.1051/lait:1985649-65013.

Brackett, R. E., (1987) Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* **50**: 999-1003. doi:10.4315/0362-028X-50.12.999.

Brandger, A., (2007) In: *Microbiochimie et alimentation*. Dijon, Éditions Éducagri, A. Brandger, M.-M. Richer, S. Roustel (éds). pp.136-137.

Breitbart, M. & F. Rohwer, (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* **13**: 278-284. doi:10.1016/j.tim.2005.04.003.

Brenner, S. & R. W. Horne, (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. et Biophys. Acta* **34**: 103-110. doi:10.1016/0006-3002(59)90237-9.

Brenner, D. J., R. Krieg, J. T. Staley, (2006) In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol. 2)*. New York, Springer.

Briandet, R., T. Meylheue, C. Maher, M. N. Bellon-Fontaine, (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5328-5333.

Bruttin, A. & H. Brüssow, (2005) Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **49**: 2874-2878. doi:10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005.

Buchanan, R. L. & L. A. Klawitter, (1990) Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *J. Food Science* **55**: 1754-1756. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb03620.x.

Buchanan, R. L., L. G. M. Gorris, M. M. Hayman, T. C. Jackson, R. C. Whiting, (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.

Bunčić, S., L. Paunović, D. Radišić, (1991) The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged frankfurters. *J. Food Protect.* **54**: 413-417. doi:10.4315/0362-028x-54.6.413.

-C-

Carlton, R. M., (1999) Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immun. Therap. Experim.* **47**: 267-274.

Carlton, R. M., W. H. Noordman, B. Biswas, E. D. de Meester, M. J. Loessner, (2005) Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **43:** 301-312. doi:10.1016/j.yrtph.2005.08.005.

Casey, A., E. M. Fox, S. Schmitz-Esser, A. Coffey, O. McAuliffe, K. Jordan, (2014) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to biocide stress reveals a multi-system response involving cell wall synthesis, sugar uptake, and motility. *Front. Microbiol.* **5**: 68. doi:10.3389/fmicb.2014.00068.

Catalão, M. J., F. Gil, J. Moniz-Pereira, C. São-José, M. Pimentel, (2013) Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 554-571. doi:10.1111/1574-6976.12006.

Ceyssens P.-J., J.-P. Noben, H.-W. Ackermann, J. Verhaegen, D. De Vos, J.-P. Pirnay, M. Merabishvili, M. Vaneechoutte, A. Chibeu, G. Volckaert, R. Lavigne, (2009) Survey of *Pseudomonas aeruginosa* and its phages: *de novo* peptide sequencing as a novel tool to assess the diversity of worldwide collected viruses. *Environ. Microbiol.* **11**: 1303-1313. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01862.x.

Champagne, C. P., N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen, C. Lacroix, (1992) The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage protected cultures of *Lactococcus lactis*. *Food Research Intern.* **25**: 419-427. doi:10.1016/0963-9969(92)90166-3.

Champagne, C. P., S. Moineau, S. Lafleur, T. Savard, (2017) The effect of bacteriophages on the acidification of a vegetable juice medium by microencapsulated Lactobacillus plantarum. Food Microbiol. **63**: 28-34. doi:10.1016/j.fm.2016.10.036.

Chand, P. & J. R. Sadana, (1999) Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Vet. Record* **145**: 83-84. doi:10.1136/vr.145.3.83.

Chanishvili, N., (2012) Phage therapy history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv. Virus Res.* **83**: 3-40. doi:10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.

Chatterjee, P. K., S. Subhra, H. Hossain, S. Otten, C. Kuenne, K. Kuchmina, S. Machata, E. Domann, T. Chakraborty, T. Hain, (2006) Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **74**: 1323-1338. doi:10.1128/IAI.74.2.1323-1338.2006.

Chen, B.-Y., R. Pyla, T.-J. Kim, J. L. Silva, Y.-S. Jung, (2010) Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiol.* **27**: 645-652. doi:10.1016/j.fm.2010.02.007.

Chen, K.-C. & H. Chang-Tze, (1988) Effets of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 284-292. doi:10.1016/0141-0229(88)90129-9.

Chen, P., (2008) «Lytic cycle». In: *Biology 1151, Principles of Biological Science.* Récupéré le 17 janvier 2017 sur le site: *http://bio1151b.nicerweb.net/Locked/media/ch19/19_05T4LyticCycle_5-L.jpg.*

Chiara, M., M. Caruso, A. M. D'Erchia, C. Manzari, R. Fraccalvieri, E. Goffredo, L. Latorre, A. Miccolupo, I. Padalino, G. Santagada, D. Chiocco, G. Pesole, D. S. Horner, A. Parisi, (2015) Comparative genomics of *Listeria* sensu lato: genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits through lateral gene transfer. *Genome Biol. Evol.* **7**: 2154-2172. doi:10.1093/gbe/evv131.

Chibata, I. & T. Tosa, (1981). Use of immobilized cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**: 197-216. doi:10.1146/annurev.bb.10.060181.001213.

Chibeu, A., L. Agius, A. Gao, (2013) Efficacy of bacteriophage LISTEX$^{tm}$P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.* **167**: 208-214. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.018.

Chiron J.-P., P. Maupas, F. Denis, (1977) Ultrastructure des bactériophages de *Listeria monocytogenes*. *C.R. Séances Soc. Biol.* **17**: 488-491.

Chou, C. H. & C. Wang, (2006) Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **110**: 135-148. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.003.

Clark, C. G., J. Farber, F. Pagotto, N. Ciampa, K. Doré, C. Nadon, K. Bernard, L. K. Ng, CPHLN, (2010) Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004. *Epidemiol. Infect.* **138**: 559-572. doi:10.1017/S0950268809990914.

Clokie, M. R., A. D. Millard, A. V. Letarov, S. Heaphy, (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* **1**: 31-45. doi:10.4161/bact.1.1.14942.

Corcoran, D., D. Clancy, M. O'Mahony, K. Grant, E. Hyland, N. Shanaghy, P. Whyte, J. McLauchlin, A. Moloney, S. Fanning, (2006) Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **209**: 527-534. doi:10.1016/j.ijheh.2006.06.001.

Cossart, P., (2015a) Part 1: «Bacterial pathogenesis: the *Listeria* paradigm». Récupéré le 28 novembre 2017 sur le site: *http://www.ibiology.org/ibioseminars/pascale-cossart-part-1.html.*

Cossart, P., (2015b) Part 2: «Exploring the "New Microbiology" with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*». Récupéré le 10 décembre 2017 sur le site: *https://www.ibiology.org/microbiology/listeria/#part-2.*

Courtieu, A.-L., E. P. Espaze, A. E. Reynaud, (1986) In: *Listériose Listeria Listeriosis 1985-86. Compte-Rendus du 9ème Symposium International sur les Problème des Listérioses.* Université de Nantes.

Courvalin, P., (2008) «Résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques/ Bacterial antibiotic resistance combinations of biochemical and genetic mechanisms». Récupéré le 10 septembre 2017 sur le site: *http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/47917/AVF_2008_1_07.pdf?sequence=1&isAllowed.*

Cowart, R. E. & B. G. Foster, (1981) The role of iron in the production of hemolysin. *Current Microbiol.* **6**: 287-290. doi:10.1007/BF01566878.

Cruz, C. D., F. A. Silvestre, E. M. Kinoshita, M. Landgraf, B. D. G. M. Franco, M. T. Destro, (2008) Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. *Brazilian J. Microbiol.* **39**: 375-383. doi:10.1590/S1517-83822008000200032.

Czuprynski, C. J., (2005) *Listeria monocytogenes*: silage, sandwiches and science. *Anim. Health Res. Rev.* **6**: 211-217. doi:10.1079/AHR2005111.

-D-

Dabrowska, W. B., M. Dabrowski, S. Slopek, (1987) Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immun. Therap. Experim.* **35**: 563-568.

Dabrowska, W. B., M. Mulczyk, A. Górski, (2000) Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch. Immun. Therap. Experim.* **48**: 547-551. doi:10.1007/978-94-015-9702-9_15.

Da Silva, E. P. & E. C. De Martinis, (2013) Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 957-968. doi:10.1007/s00253-012-4611-1.

Dass, S. C., N. Abu-Ghannam, S. Antony-Babu, E. J. Cummins, (2010) Ecology and molecular typing of *L. monocytogenes* in a processing plant for cold-smoked salmon in the Republic of Ireland. *Food Research Intern.* **43**: 1529-1536. doi:10.1016/j.foodres.2010.04.030.

Davis, J. A. & C. R. Jackson, (2009) Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microb. Drug Resist.* **15**: 27-32. doi:10.1089/mdr.2009.0863.

De Chastellier, C. & P. Berche, (1994) Fate of *Listeria monocytogens* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing dans survival of intracellular bacteria. *Infect. immun*. **62**: 543-553.

De Filippis, I. & L. M. McKee, (2012) In: *Molecular Typing in Bacterial Infections, Chap. 3 Listeria monocytogenes*. New York, Springer. doi:10.1007/978-1-62703-185-1.

Delcour J., T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, P. Hols, (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuw.* **76**: 159-184. doi:10.1023/A:1002089722581.

Denes, T., K. Vongkamjan, H.-W. Ackermann, A. I. Moreno Switt, M. Wiedmann, H. C. den Bakker, (2014) Comparative genomic and morphological analyses of *Listeria* phages isolated from farm environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 4616-4625. doi:10.1128/AEM.00720-14.

Denning, T. L., Y. C. Wang, S. R. Patel, I. R. Williams, B. Pulendran, (2007) *Lamina propria* macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunol.* **8**: 1086-1094. doi:10.1038/ni1511.

De Valk, H., C. Jacquet, V. Goulet, V. Vaillant, A. Perra, F. Simon, J. C. Desenclos, P. Martin, (2005) «Surveillance of *Listeria* infections in Europe». *Bulletin européen sur les maladies transmissibles*. Paru en ligne le 1er octobre 2005. Récupéré le 12 octobre 2017 sur le site: *http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esm.10.10.00572-en.*

De Vos, P., M. M. Faas, M. Spasojevic, J. Sikkema, (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* **20**: 292-302. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.008.

Rapport Gratuit.com

D'Hérelle, F., (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **165**: 373-375.

D'Hérelle, F., (1918) Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **167**: 970-972.

D'Hérelle F., (1925) Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage. *La presse Médic.* **33**: 1393.

Diakonova, M., E. Helfer, S. Seveau, J. A. Swanson, C. Kocks, L. Rui, M. F. Carlier, C. Carter-Su, (2007) Adapter protein SH2-Bβ stimulates actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in a vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-dependent fashion. *Infect. Immun.* **75**: 3581-3593. doi:10.1128/IAI.00214-07.

Diviès, C., H. Prévost, J. F. Cavin, (1989) Les bactéries immobilisées dans l'industrie laitière. *Process. Magazine* **1041**: 28-33.

Djenane, D., A. Meddahi, P. Roncales, (2006) Les systèmes antioxydants et antimicrobiens pour la conservation de la viande. *Sci. Alim.* **26**: 37-73. doi:10.3166/sda.26.37-73

Doganay, M., (2003) Listeriosis: Clinical presentation. *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.* **35**: 173-175. doi:10.1016/S0928-8244(02)00467-4.

Dominguez, C., I. Gomez, J. Zumalacarregui, (2001) Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in smoked fish and pate sold in Spain. *J. Food Protect.* **64**: 2075-2077. doi:10.4315/0362-028x-64.12.2075.

Donnelly, C. W. & E. H. Briggs, (1986) Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J. Food Protect.* **49**: 994-998. doi:10.4315/0362-028x-49.12.994.

Donnelly, C. W., E. H. Briggs, L. S. Donnelly, (1986) Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. *J. Food Protect.* **50**: 14-17. doi:10.4315/0362-028x-50.1.14.

Dortet, L., E. Veiga-Chacon, P. Cossart, (2009) *Listeria monocytogenes*. In: *Encyclopedia of Microbiology. (3rd ed.),* Oxford, Elsevier, 182-198.

Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, P. Martin, (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 3819-3822. doi:10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.

Drilling, A., S. Morales, C. Jardeleza, S. Vreugde, P. Speck, P. J. Wormald, (2014) Bacteriophage reduces biofilm of *Staphylococcus aureus ex vivo* isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Am. J. Rhinol. All.* **28**: 3-11. doi:10.2500/ajra.2014.28.4001.

Dublanchet. A., (2008) La phagothérapie au XXIe siècle. Première partie : que pourrait-elle apporter aujourd'hui? *Antibiotiques*, **10**: 209-218. doi:10.1016/j.antib.2008.08.002.

Dublanchet, A., (2009) In: *Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques*. Lausanne, Suisse, Éd. Favre.

Dupuis, C., R. Tardif, J. Verge, (2002) Hygiène et salubrité dans l'industrie laitière. In: *Science et technologie du lait : transformation du lait.* Montréal, C. L. Vignola (éd.) Polytechnique, Presses Internationales.

Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda, P. Cossart, (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol*. **58**: 587-610. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090934.

-E-

El Haddad, L., N. Ben Abdallah, P. L. Plante, J. Dumaresq, R. Katsarava, S. Labrie, J. Corbeil, D. St-Gelais, S. Moineau, (2014) Improving the safety of *Staphylococcus aureus* polyvalent phages by their production on a *Staphylococcus xylosus* strain. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.pone.0102600.

Elhanafi, D., V. Dutta, S. Kathariou, (2010) 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. doi:10.1128/AEM.02056-10.

EL-Kest, S. E. & E. H. Marth, (1991) Injury and death of frozen *Listeria monocytogenes* as affected by glycerol and milk components. *J. Dairy Sci.* **74**: 1201-1208. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78274-x.

Ellis, D. E., P. A. Whitman, R. T. Marshall, (1972) Effects of homologous bacteriophage on growth of *Pseudomonas fragi* WY in milk. *Appl. Microbiol.* **25**: 24-25.

Ennaji, H., M. Timinouni, M. Ennaji, M. Hassar, N. Cohen, (2008) Characterization and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry and red meat in Morocco. *J. Infect. Drug Resist.* **1**: 45-50. doi:10.2147/IDR.S3632.

Estela, L. A., J. N. Sofos, B. B. Flores, (1992) Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes* cultures isolated from seafoods. *J. Food. Protect*. **55**: 13-17. doi:10.4315/0362-028x-55.1.13.

Eugster, M. R. et M. J. Loessner, (2011) Rapid analysis of *Listeria monocytogenes* cell wall teichoic acid carbohydrates by ESI-MS/MS. *PLoS One* **6**. doi:10.1371/journal.pone.0021500.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Eugster M. R., M. C. Haug, S. G. Huwiler, M J. Loessner, (2011) The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid. *Mol. Microbiol.* **81**: 1419-1432. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07774.x.

-F-

Farber, J.M. & P. I. Peterkin, (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476-511.

Favaro, M., L. Sarmati, G. Sancesario, C. Fontana, (2014) First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Reports* **1**: 1-5. doi:10.1099/jmmcr.0.003103.

Ferrer, M., C. Méndez-García, D. Rojo, C. Barbas, A. Moya, (2017) Antibiotic use and microbiome fonction. *Biochem. Pharmacol.* **134**: 114-126. doi:10.1016/j.bcp.2016.09.007.

Fieseler, L., S. Schmitter, J. Teiserskas, M. J. Loessner, (2012) Rhamnose-inducible gene expression in *Listeria monocytogenes*. *PloS One* **7**: e43444. doi:10.1371/journal.pone.0043444.

Filiousis, G., A. Johansson, J. Frey, V. Perreten, (2009) Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control* **20**: 314-317. doi:10.1016/j.foodcont.2008.05.018.

Fister, S., S. Fuchs, B. Stessl, D. Schoder, M. Wagner, P. Rossmanith, (2016a) Screening and characterization of bacteriophage P100 insensitive *Listeria monocytogenes* isolates in Austrian dairy plants. *Food Control* **59**: 108-117. doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.026.

Fister, S., C. Robben, A. K. Witte, D. Schoder, M. Wagner, P. Rossmanith, (2016b) Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Front Microbiol.* **7**: 1152. doi:10.3389/fmicb.2016.01152.

Flamm, R. K., D. J. Hinrichs, M. F. Thomashow, (1984) Introduction of pAMβ1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect. Immun.* **44**: 157-161.

Flemming, H.-C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, S. Kjelleberg, (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 563-575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.

Flessa, S., D. M. Lusk, L. J. Harris, (2005) Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int. J. Food Microbiol*. **101**: 255-262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.010.

Fonnesbech Vogel, B., H. H. Huss, B. Ojeniyi, P. Ahrens, L. Gram, (2001) Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2586-2595. doi:10.1128/AEM.67.6.2586-2595.2001.

Frank, F. J. & A. R. Koffi, (1990) Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protect*. **53**: 550-554. doi:10.4315/0362-028X-53.7.550.

Fretz, R., U. Sagel, W. Ruppitsch, A. T. Pietzka, A. Stöger, S. Huhulescu, S. Heuberger, J. Pichler, P. Much, G. Pfaff, K. Stark, R. Prager, A. Flieger, O. Feenstra, F. Allerberger, (2010a) Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese "Quargel", Austria and Germany 2009. *Euro. Surveill.* **15**: pii 19477.

Fretz, R., J. Pichler, U. Sagel, P. Much, W. Ruppitsch, A. T. Pietzka, A. Stöger, S. Huhulescu, S. Heuberger, G. Appl, D. Werber, K. Stark, R. Prager, A. Flieger, R. Karpiskova, G. Pfaff, F. Allerberger, (2010b) Multinational listeriosis outbreak due to "Quargel", a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro. Surveill.* **15**: pii 19543.

-G-

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

Galdiero, E., M. D'Isanto, F. Aliberti, (1997) Effect of saline concentration, pH and growth temperature of invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* **148**: 305-315. doi:10.1016/S0923-2508(97)81586-0.

Gamboa-Marin, A., D. C. Mejia-Wagner, P. A. Moreno-Ocampo, S. M. Buitrago, K. I. Pérez-Pérez, Z. Ruiz-Bolivar, R. A. Poutou-Piñales, A. K. Carrascal-Camacho, A. Velasco-Briceño, M. L. Ocamp-Guerrero, (2013) Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria* species isolated from swine processing facilities in Colombia. *J. of Swine Health and Prod.* **21**: 10-21.

Gandhi, M. & M. L. Chikindas, (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 1-15. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008.

García, P., L. Rodríguez, A. Rodríguez, B. Martínez, (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci. Technol.* **21**: 373-382. doi:10.1016/j.tifs.2010.04.010.

Garmyn, D., L. Gal, J. P. Lemaitre, A. Hartmann, P. Piveteau, (2009) Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: a central role for the *agr* system. *Commun. Integr. Biol.* **2**: 371-374. doi:10.4161/cib.2.4.8610.

Gasanov, U., D. Hughes, P. M. Hansbro, (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 851-875. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.002.

Gaulin, C., M.-L. Lê, M. Shum, D. Fong, (2011) «Désinfectants et assainissants pour surfaces de contact alimentaire» (document révisé en août 2011). *Centre de collabo-ration nationale en santé environnementale*. Récupéré le 28 mai 2017 sur le site: *http://www.ccnse.ca/sites/default/files/Desinfectants_surfaces_contact_alimentaire_aout_2011.pdf.*

Gauthier, Y. & P. Isoard, (1989) L'Adhésion des bactéries sur les surfaces. *Indust. Aliment. Agric.* **1-2**: 31-32.

Gélinas, P. & J. Goulet, (1983) Efficacité de 8 désinfectants sur 3 types de surfaces contaminées par *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1715-1730. doi:10.1139/m83-262.

Gemrot, É. & M.-P. Lefranc, (2009) «Présentation des antigènes par MHC-Ia à la surface d'une cellule infectée par une bactérie pathogène (ex : *L. monocytogenes*)». Récupéré le 24 septembre 2017 sur le site: *http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/MHC/_FR/Presentation/M.*

Genigeorgis, C., M. Carniciu, D. Dutulescu, T. B. Farver, (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheese stored at 4 to 30°C. *J. Food Protect.* **54**: 662-668. doi:10.4315/0362-028x-54.9.662.

Gill, P. A., J. G. Boulton, G. C. Fraser, A. E. Stevenson, L. A. Reddacliff, (1997) Bovine abortion caused by *Listeria ivanovii*. *Aust. Vet. J.* **75**: 214. doi:10.1111/j.1751-0813.1997.tb10069.x.

Gill, J. J. & P. Hyman, (2010) Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**: 2-14. doi:10.2174/138920110790725311.

Gilmour, M., M. Graham, G. Van Domselaar, S. Tyler, H. Kent, K. Trout-Yakel, O. Larios, V. Allen, B. Lee, C. Nadon, (2010). High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* **11**: 120. doi:10.1186/1471-2164-11-120.

Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852. doi:10.1126/science.1063447.

Glass, K. A. & M. P. Doyle, (1989) Fate of *Listeria monocytogene*s in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1565-1569.

Glass, K. A. & M. P. Doyle, (1991) Fate of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in commercial reduced-calorie mayonnaise. *J. Food Protect.* **54**: 691-695. doi:10.4315/0362-028x-54.9.691.

Godreuil, S., M. Galimand, G. Gerbaud, C. Jacquet, P. Courvalin, (2003) Efflux pump lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47:** 704-708. doi:10.1128/AAC.47.2.704-708.2003.

Goldfarb, T., H. Sberro, E. Weinstock, O. Cohen, S. Doron, Y Charpak-Amikam, S. Afik, G. Ofir, R Sorek, (2015) BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO Journ.* **34**:169-183. doi:10.15252/embj.201489455.

Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osborne, J. Kuby, (2003) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Immunology* (*5$^{e}$ édition)*. New York, W. H. Freeman, pp. 148-150.

Goodridge, L. D. & B. Bisha, (2011) Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage* **1**: 130-137. doi:10.4161/bact.1.3.17629.

Gormley, E., J. Mengaud, P. Cossart, (1989) Sequences homologous to the listeriolysin O gene region of *Listeria monocytogenes* are present in virulent and avirulent haemolytic species of the genus *Listeria*. *Inst. Pasteur. Res. Microbiol.* **140**: 631-643. doi:10.1016/0923-2508(89)90004-1.

Gosmann, B. & H. J. Rehm, (1988) Influence of growth behaviour and physiology of alginate-entrapped microorganisms on the oxygen consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 554-559. doi:10.1007/BF00260984.

Gouin, E., H. Gantelet, C. Egile, I. Lasa, H. Ohayon, V. Villiers, P. Gounon, P. J. Sansonetti, P. Cossart, (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes, Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J. Cell.Sci* . **112**: 1697-1708.

Goulter, R. M., I. R. Gentle, G. A. Dykes, (2009) Issues in dertermining factors influencing bacterial attachement: a review using of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in Appl. Microbiol.* **49**: 1-7. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02591.x.

Gouvêa, D. M., R. C. S. Mendonça, M. E. S. Lopez, L. S. Batalha, (2016) Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT - Food Sci. Techn.* **67**: 159-166. doi:10.1016/j.lwt.2015.11.043.

Granier, S. A., C. Moubareck, C. Colaneri, A. Lemire, S. Roussel, T.-T. Dao, P. Courvalin, A. Brisabois, (2011) Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 2788-2790. doi:10.1128/AEM.01381-10.

Grau, F. H. & P. B. Vanderlinde, (1992) Occurence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J. Food Protect.* **55**: 4-7. doi:10.4315/0362-028X-55.1.4.

Greer, G. G., (1986) Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth on beef spoilage. *J. Food Protect*. **49**: 104-109. doi:10.4315/0362-028x-49.2.104.

Gu, J., X. Liu, Y. Li, W. Han, L. Lei, Y. Yang, H. Zhao, Y. Gao, J. Song, R. Lu, C. Sun, X. Feng, (2012) A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One* **7**: e31698. doi:10.1371/journal.pone.0031698.

Gudmundsdottir, S., B. Gudbjornsdottir, H. L. Lauzon, H. Einarsson, K. G. Kristinsson, M. Kristjansson, (2005) Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **101**: 41-51. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.023.

Guenther, S., D. Huwyler, S. Richard, M. J. Loessner, (2009) Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol*. **75**: 93-100. doi:10.1128/AEM.01711-08.

Guenther, S. & M. J. Loessner, (2011) Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage* **1**: 94-100. doi:10.4161/bact.1.2.15662.

Guenther, S., O. Herzig, L. Fieseler, J. Klumpp, M. J. Loessner, (2012) Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.* **154**: 66-72. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023.

Guillet, C., O. Join-Lambert, A. Le Monnier, A. Leclercq, F. Mechai, M. F. Mamzer-Bruneel, M. K. Bielecka, M. Scortti, O. Disson, P. Berche, J. Vazquez-Boland, O. Lortholary, M. Lecuit, (2010) Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* **16**: 136-138. doi:10.3201/eid1601.091155.

Gutiérrez, D., L. Rodríguez-Rubio, L. Fernández, B. Martínez, A. Rodríguez, P. García, (2017) Applicability of Commercial Phage-based Products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control* **73**: 1474-1482. doi:10.1016/j.foodcont.2016.11.007.

Guyer, S. & T. Jemmi, (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1523-1527.

-H-

Haase J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, *L. monocytogenes* MLST Study Group, M. Achtman, (2014) The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale multilocus sequence typing study. *Environ. Microbiol.* **16**: 405-416. doi:10.1111/1462-2920.12342.

Habann, M., P. G. Leiman, K. Vandersteegen, A. Van den Bossche, R. Lavigne, M. M. Shneider, R. Bielmann, M. R. Eugster, M. J. Loessner, J. Klumpp, (2014) *Listeria* phage A511, a model for the contractile tail machineries of SPO1-related bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **92**: 84-99. doi:10.1111/mmi.12539.

Hagens, S. & M. J. Loessner, (2007) Application of bacteriophages for detection and control of food-borne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **76**: 513-519. doi:10.1007/s00253-007-1031-8.

Hagens, S. & M. J. Loessner, (2010**)** Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol*. **11**: 58-68. doi:10.2174/138920110790725429.

Hagens, S. & M. J. Loessner, (2014) Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front. Microbiol*. **10**: 159. doi:10.3389/fmicb.2014.00159.

Hain, T., R. Ghai, A. Billion, C. T. Kuenne, C. Steinweg, B. Izar, W. Mohamed, M. A. Mraheil, E. Domann, S. Schaffrath, U. Kärst, A. Goesmann, S. Oehm, A. Pühler, R. Merkl, S. Vorwerk, P. Glaser, P. Garrido, C. Rusniok, C. Buchrieser, W. Goebel, T. Chakraborty, (2012) Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes. BMC Genomics* **13**: 144. doi:10.1186/1471-2164-13-144.

Hankin, M. E., (1896) L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du cholera*. Ann. Inst. Pasteur* **10:** 511-523.

Havelaar, A. H., M. J. Mangen, A. A. de Koeijer, M. J. Boqaardt, E. G. Evers, W. F. Jacobs-Reitsma, W. van Pelt, J. A. Wagenaar, G. A. de Wit, H. van der Zee, M. J. Nauta, (2007) Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* **27**: 831-844. doi:10.1111/j.1539-6924.2007.00926.x.

Heisick, J. E., F. M. Harrell, E. H. Peterson, S. McLaughlin, D. E. Wagner, I. V. Wesley, J. Bryner, (1989) Comparaison of Four Procedures to Detect *Listeria* spp. in foods. *J. Food Protect.* **52**: 154-157. doi:10.4315/0362-028X-52.3.154.

Hense, B. A., C. Cuttler, J. Müller, M. Rothballer, A. Hartmann, J. U. Kreft, (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 230-239. doi:10.1038/nrmicro1600.

Hof, H., (1991) Therapeutic activities of antibiotics in Listeriosis. *Infection* **19 (Suppl. 4)**: S229-S233. doi:10.1007/BF01644039.

Holah, J. T., J. H. Taylor, D. J. Dawson, K. E. Hall, (2002) Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 111-120. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x.

Hudson, J. A., C. Billington, G. Carey-Smith, G. Greening, (2005) Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. Food Protect*. **68**: 426-437. doi:10.4315/0362-028x-68.2.426.

Hughes, K. A., I. W. Sutherland, M. V. Jones, (1998) Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* **144**: 3039-3047. doi:10.1099/00221287-144-11-3039.

Hyden, P., A. Pietzka, A. Lennkh, A. Murer, B. Springer, M. Blaschitz, A. Indra, S. Huhulescu, F. Allerberger, W. Ruppitsch, C. W. Sensen, (2016) Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *J. Biotechnol.* **235**: 181-186. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.06.005.

-I-

Iacumin, L., M. Manzano, G. Comi, (2016) Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms* **4:** pii: E4. doi:10.3390/microorganisms4010004.

-J-

Jadhav, S. D. Sevior, M. Bhave, E. A. Palombo, (2014) Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF mass spectrometry, *J. Proteomics* **97**: 100-106. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023.

Jasinska, S., (1964) Bacteriophages of lysogenic strains of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol. Pol.* **18**: 29-44.

Jemmi, T., (1990) Actual knowledge of *Listeria* in meat and fish products. *Mitt. Geb. Lebensmittel. Hyg.* **81**: 144-157.

Jemmi, T., & R. Stephan, **(**2006) *Listeria monocytogenes:* food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev. Sci. Tech.* **25**: 571-580.

Jeong, D. K. & J. F. Frank, (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J. Food Protect.* **57**: 576-586. doi:10.4315/0362-028x-57.7.576.

Johnson, E. S., (2004) Protein modification by SUMO. *Ann. Rev. Biochem.* **73**: 355-382. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118.

Johnson, J., K. Jinneman, G. Stelma, B. G. Smith, D. Lye, J. Messer, J. Ulaszek, L. Evsen, S. Gendel, R. W. Bennett, B. Swaminathan, J. Pruckler, A. Steigerwalt, S. Kathariou, S. Yildirim, D. Volokhov, A. Rasooly, V. Chizhikov, M. Wiedmann, E. Fortes, R. E. Duvall, A. D. Hitchins, (2004) Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4256-4266. doi:10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004.

Johnson, J. G., E. J. Saye, N. Jimenez-Truque, N. Soper, I. Thomsen, T. R. Talbot, C. B. Creech, (2013) Frequency of disinfectant resistance genes in pediatric strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. **34**: 1326-1327. doi:10.1086/673983.

Johnson, J. L., M. P. Doyle, R. G. Cassens, (1990) Incidence of *Listeria* spp. in retail meat roasts. *J. Food Science.* **55**: 572-574. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb06818.x.

Jończyk, E., M. Klak, R. Miedzybrodzki, A. Górski, (2011) The influence of external factors on bacteriophages – review. *Folia Microbiol.* **56**: 191-200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8.

Jonsson, P., & T. Wadström, (1983) High surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Curr. Microbiol.* **8**: 347-353. doi:10.1007/BF01573707.

-K-

Karunasagar, I., K. Segar, I. Karunasagar, W. Goebel, (1992) Incidence of *Listeria* species in tropical sea foods. In: *Preceedings of the 11th International Symposium on the problem of listeriosis* (ISOPOL XI). Copenhagen, Statens Seruminstitut, abstract no. 155.

Kaufmann, S. H. E., (1988) Listeriosis: New Findings - Current Concern. *Microbiol. Pathogen.* **5**: 225-231. doi:10.1016/0882-4010(88)90094-0

Kawabata, S., L. Vassal, D. Le Bars, B. Cesselin, M. Nardi, J.-C. Gripon, M.-P. Chapot-Chartier, (1997) Phage-induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Lait 77*: 229-239. doi:10.1051/lait:1997216.

Kazi, M., U.S. Annapure, (2016) Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *J. Food Sci. Technol.* **53**: 1355-1362. doi:10.1007/s13197-015-1996-8.

Keller, L., M. G. Surette, (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 249-258. doi:10.1038/nrmicro1383.

Kelly, D., O. McAuliffe, R. P. Ross, A. Coffey, (2012) Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Letters in Appl. Microbiol.* **54**: 286-291. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x.

Kerouanton, A., M. Marault, L. Petit, J. Grout, T. Dao, A. Brisabois, (2010) Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J. Microbiol. Methods* **80**: 134-137. doi:10.1016/j.mimet.2009.11.008.

Kim, J. W., & S. Kathariou, (2009) Temperature-dependent phage resistance of *Listeria monocytogenes* epidemic clone II. *Appl. Environ. Microbiol.* **75:** 2433-2438. doi:10.1128/AEM.02480-08.



Rapport-Gratuit.com

Kirisits, M. J. & M. R. Parsek, (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signaling to build biofilm communities? *Cell. Microbiol.* **8**: 1841-1849. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00817.x.

Kittson, E., (1992) A case cluster of listeriosis in Western Australia with links to paté consumption. In: *Preceedings of the 11th International Symposium on the problem of listeriosis* (ISOPOL XI). Copenhagen, Statens Seruminstitut, pp.39-40.

Klausner, R. B., & C. W. Donnelly, (1991) Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. *J. Food Protect.* **54**: 607-611. doi:10.4315/0362-028X-54.8.607.

Klumpp, J., J. Dorscht, R. Lurz, R. Bielmann, M. Wieland, M. Zimmer, R. Calendar, M. J. Loessner, (2008) The terminally redundant, non-permuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **190**: 5753-5765. doi:10.1128/JB.00461-08.

Klumpp, J. & M. J. Loessner, (2013) *Listeria* phages: Genomes, evolution, and application. *Bacteriophage* **3**: e26861. doi:10.4161/bact.26861.

Klumpp, J. & M. J. Loessner, (2014) Detection of bacteria with bioluminescent reporter bacteriophage. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **144**: 155-171. doi:10.1007/978-3-662-43385-0_5.

Kortebi, M., E. Milohanic, G. Mitchell, C. Péchoux, M.-C. Prevost, P. Cossart, H. Bierne, (2017) *Listeria monocytogenes* switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLOS Pathogens*, **13**: e1006734. doi:10.1371/journal.ppat.1006734.

Kovacevic, J., J. Ziegler, E. Wałecka-Zacharska, A. Reimer, D. D. Kitts, M. W. Gilmour, (2015) Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 939-953. doi:10.1128/AEM.03741-15.

Krauss, H., H. G. Schiefer, A. Weber, W. Slenczka, M. Appel, A. von Graevenitz, B. Enders, H. Zahner, H. D. Isenberg, (2003) Bacterial Zoonoses. In: *Zoonoses : Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans* (3rd ed.). Washington, D.C., ASM Press, pp. 205-208.

Kuenne, C., A. Billion, M. A. Mraheil, A. Strittmatter, R. Daniel, A. Goesmann, S. Barbuddhe, T. Hain, T. Chakraborty, (2013) Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics* **14**: 47. doi:10.1186/1471-2164-14-47.

Kuhn, M., S. Kathariou, W. Goebel, (1988) Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **56**: 79-82.

Kurosawa, H., M. Matsumura, H. Tanaka, (1989) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechn. Bioeng.* **34**: 926-932. doi:10.1002/bit.260340707.

Kutateladze, M. & R. Adamia, (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med. Mal. Infect.* **38**: 426-430. doi:10.1016/j.medmal.2008.06.023.

Kutter, E., R. Raya, K. Carlson, (2004) In: *Bacteriophages: biology and applications.* Boca Raton, USA, CRC Press, p. 163-220.

-L-

Labrie, S. J., J. E. Samson, S. Moineau, (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 317-327. doi:10.1038/nrmicro2315.

Lacroix, C., C. Paquin, J.-P. Arnaud, (1990) Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*: Optimization of the rheological properties of the entrapment gel matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 403-408.

Larpent, J. P., (2004) Technique et documentation. In: *Listeria*. *3e édition*. Londres-Paris-New York, Lavoisier, 227 pages.

Lecuit, M. & P. Cossart, (2001) Un modèle transgénique pour la listériose humaine : rôle de l'interaction entre l'internaline et la E-cadhérine dans la traversée de la barrière intestinale par *L. monocytogenes*. *Med. Sci.* **17**: 1333-1335. doi:10.1051/medsci/200117121333.

Lecuit, M., (2007) Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect.* **9**: 1216-1225. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.009.

Leo, W. J., A. J. McLoughlin, D. M. Malone, (1990) Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. *Biotechnol. Prog.* **6**: 51-53. doi:10.1021/bp00001a008.

Leverentz, B., W. S. Conway, M. J. Camp, W. J. Janisiewicz, T. Abuladze, M. Yang, R. Saftner, A. Sulakvelidze, (2003) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4519-4526. doi:10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003.

Lier, C., E. Baticle, P. Horvath, E. Haguenoer, A. S. Valentin, P. Glaser, L. Mereghetti, P. Lanotte, (2015) Analysis of the type II-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus agalactiae* reveals distinctive features according to genetic lineages. *Front. Genet.* **6**: 214. doi:10.3389/fgene.2015.00214.

Liu, D., M. L. Lawrence, A. J. Ainsworth, F. W. Austin, (2005) Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**: 373-378. doi:10.1016/j.femsle.2004.12.025.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Liu, H., Y. D. Niu, R. Meng, J. Wang, J. Li, R. P. Johnson, T. A. McAllister, K. Stanford, (2015) Control of *Escherichia Coli* O157 :H7 on beef at 37, 22 and 4 ºC by T5-, T1-, T4- and O1 like bacteriophages. *Food Microbiol*. **51**: 69-73. doi:10.1016/j.fm.2015.05.001.

Loessner, M. .J. & M. Busse, (1990a) Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1912-1918.

Loessner, M. .J. & M. Busse, (1990b) Phagentypisierung von *Listerien* als ein Instrument zur Anlagensanierung. *Deut. Milchwirtsch*. **33**: 1115-1118.

Loessner M. J., S. Goeppl, M. Busse, (1991a). Comparative inducibility of bacteriophage in naturally lysogenic and lysogenized strains of *Listeria* spp. by U.V. light and mitomycin C. *Letters in Appl. Microbiol.* **12**: 196-199. doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00538.x.

Loessner, M. J., S. Goeppl, M. Busse, (1991b) The phagovar variability of *Listeria* strains under the influence of virulent and temperate bacteriophage. *Letters in Appl. Microbiol.* **12**: 192-195. doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00537.x.

Loessner, M. J., R. B. Inman, P. Lauer, R. Calendar, (2000) Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol. Microbiol.* **35**: 324-340. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01720.x.

Lone, A. H. Anany, M. Hakeem, L. Aguis, A. C. Avdjian, M. Bouget, A. Atashi, L. Brovko, D. Rochefort, M. W. Griffiths, (2016) Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **217**: 49-58. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.011.

Lopez-Prieto, M. D., A. I. Aller Garciia, S. Alcaraz Garciia, J. Lopez Capero, (2000) Liver abscess due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 226-227. doi:10.1111/j.1469-0691.2000.00060.x.

Lou, Y. & A. E. Yousef, (1999) Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: *Listeria, listeriosis, and food safety (2nd ed.)*. New York, Ryser E. T., Marth E. H., editors, Marcel Dekker Inc., pp. 131-224.

Lukinmaa, S., M. Miettinen, U. Nakari, H. Korkeala, A. Siitonen, (2003) *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11 year period in Finland. *J. Clin. Microbiol*. **41**: 1694-1700. doi:10.1128/JCM.41.4.1694-1700.2003.

Lund, A. M., E. A. Zottola, D. J. Pusch, (1991) Comparaison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. *J. Food Protect.* **54**: 602-606. doi:10.4315/0362-028x-54.8.602.

Lungren, M. P., D. Christensen, R. Kankotia, I. Falk, B. E. Paxton, C. Y. Kim, (2013) Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material. *Bacteriophage* **3**: e26825. doi:10.4161/bact.26825.

Lupo, L., (2014) «Chasing Zero». *Quality Assurance & Food Safety (juin 2014)*. Récupéré le 12 octobre 2017 sur le site: *http://www.qualityassurancemag.com/article/qa0614-food-contaminants-detection/*

-M-

Ma, Y. S., J. C. Pacan, Q. Wang, P. M. Sabour, X. Q. Huang, Y. P. Xu, (2012) Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloid.* **26**: 434-440. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.11.017.

Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet, P. Magny, (1990) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropyene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Protect.* **53**: 742-746. doi:10.4315/0362-028X-53.9.742.

Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet, L. Savoie, (1991) Characterisation of physicochemica forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1969-1973.

Makarova, K. S., D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P, Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. van der Oost, E. V. Koonin, (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 467-477. doi:10.1038/nrmicro2577.

Mantis, N. J., N. Rol, B. Corthésy, (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* **4**: 603-611. doi:10.1038/mi.2011.41.

Markoishvili, K. G. Tsitianadze, R. Katsarava, J. G. Morris Jr., A. Sulakvelidze, (2002) A novel sustained release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int. J. Dermatol.* **41**: 453-458. doi:10.1046/j.1365-4362.2002.01451.x.

Marshall, D. L., P. L. Wiese-Lehigh, J. H. Wells, A. J. Farr, (1991) Comparative growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. *J. Food Protect.* **54**: 841-851. doi:10.4315/0362-028x-54.11.841.

Marshall, K. C., (1992) Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News* **58**: 202-207.

Martin-Dejardin, F., B. Ebel, G. Lemetais, H. Nguyen Thi Minh, P. Gervais, R. Cachon, O. Chambin, (2013) A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European J. of Pharm. Sci.* **49**: 166-174. doi:10.1016/j.ejps.2013.02.015.

Martinsen, L., G. Skjăk-Braek, O. Smidsrød, (1989) Alginate as immobilization material: correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechn. and bioeng.* **33**: 79-89. doi:10.1002/bit.260330111.

Maruchitch, R. & A. Savolainen, (2012) «Les phages, des virus guérisseurs». Mis à jour le 25 juillet 2012. *Le Monde Science et Techno*.. Récupéré le 20 mai 2017 sur le site: *http://www.lemonde.fr/sciences/article/2012/06/14/les-phages-des-virus-guerisseurs_1718745_*.

Mata, M. T., F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, (2000) A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 185-188. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09158.x.

Matsuzaki, S., M. Yasuda, H. Nishikawa, (2003) Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J. Infect. Dis.* **187**: 613-624. doi:10.1086/374001.

McClure, P. J., T. A. Roberts, P. Otto Oguru, (1989) Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Appl. Microbiol.* **9**: 95-99. doi:10.1111/j.1472-765X.1989.tb00299.x.

McLauchlin, J., (1991) Epidemiology of listeriosis in Britain. In: *Proceedings of the International Conference on Listeria and Food Safety.* Laval, Amgar A (éd.), Aseptic Processing Association, pp. 38-47.

McLauchlin, J. & C. Rees, (2009) Genus I. *Listeria*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3, (2nd ed)*. New York, Vos P. *et al*. (éd.), Springer, pp. 244-257.

Merabishvili, M., C. Vervaet, J. P. Pirnay, D. De Vos, G. Verbeken, J. Mast, N. Chanishvili, M. Vaneechoutte, (2013) Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization). *PLoS One* **8**: e68797. doi:10.1371/journal.pone.0068797.

Merril, C. R., D. Scholl, S. Adhya, (2006) Phage therapy. In: *The bacteriophages*. New York, R. L. Calendar (éd.), Oxford University Press, pp. 725-741.

Mereghetti, L., R. Quentin, N. Marquet-Van Der Mee, A. Audurier, (2000) Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ. Microbiol.* **66**: 5083-5086. doi:10.1128/AEM.66.11.5083-5086.2000.

Meulmeester, E. & F. Melchior, (2008) Cell biology: SUMO. *Nature* **452**: 709-711. doi:10.1038/452709a.

Mills, S., R. P. Ross, C. Hill, (2017) Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **41(Suppl. 1)**: S129-S153. doi:10.1093/femsre/fux022.

Müller, A., K. Rychli, M. Muhterem-Uyar, A. Zaiser, B. Stessl, C. M. Guinane, P. D. Cotter, M. Wagner, S. Schmitz-Esser, (2013) Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One* **8**: e76835. doi:10.1371/journal.pone.0076835.

Muniz, L. R, C. Knosp, G. Yeretssian, (2012) Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front. Immunol.* **3**: 310. doi:10.3389/fimmu.2012.00310

Murray, E. G. D., R. A. Webb, H. B. R. Swann, (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucoytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29***:* 407-439.

Muylaert, A. & J. Mainil, (2012) Résistances bactériennes aux antibiotiques: les mécanismes et leur «contagiosité». *Ann. Méd. Vét.* **156**: 109-123.

-N-

Navarre, W. W. & O. Schneewind, (1999) Surface proteins of Gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 174-229.

Nikaido, H., (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**: 382-388. doi:10.1126/science.8153625.

Nucera, D., S. Lomonaco, D. M. Bianchi, L. Decastelli, M. A. Grassi, M. T. Bottero, T. Civera, (2010) A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. *Int. J. Food Microbiol.* **140**: 271-276. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.016.

-O-

Oechslin, F., P. Piccardi, S. Mancini, J. Gabard, P. Moreillon, J. M. Entenza, G. Resch, Y. A. Que, (2017) Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *J. Infect. Dis.* **215**: 703-712. doi:10.1093/infdis/jiw632.

Ogbonna, J. C., Y. Amano, K. Nakamura, (1989) Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. *J. Ferment. and Bioeng.* **67**: 92-96. doi:10.1016/0922-338x(89)90186-4.

Ojima-Kato, T., N. Yamamoto, H. Takahashi, H. Tamura, (2016) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*. *PLoS One* **11**: e0159730. doi:10.1371/journal.pone.0159730.

Orsi, R. H. & M. Wiedmann, (2016) Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Micorbiol. Biotechnol.* **100**: 5273-5287. doi:10.1007/s00253-016-7552-2.

-P-

Pan, Y., F. Breidt Jr., S. Kathariou, (2006) Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7711-7717. doi:10.1128/AEM.01065-06.

Pan, Y., F. Breidt, Jr., S. Kathariou, (2009) Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5846-5852. doi:10.1128/AEM.00816-09.

Parsek, M. R. & E. P. Greenberg, (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* **13**: 27-33. doi:10.1016/j.tim.2004.11.007.

Pawluk, A., N. Amrani, Y. Zhang, B. Garcia, Y. Hidalgo-Reyes, J. Lee, A. Edraki, M. Shah, E. J. Sontheimer, K. L. Maxwell, A. R. Davidson, (2016) Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. *Cell* **167**: 1829-1838. doi:10.1016/j.cell.2016.11.017.

Pearce, H., S. Messager, J.-Y. Maillard, (1999) Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect*. **43**: 101-108. doi:10.1053/jhin.1999.0250.

Pérez-Diaz, J. C., M. F. Vicente, F. Baquero, (1982) Plasmids in *Listeria*. *Plasmid* **8**: 112-118.

Pires, D. P., H. Oliveira, L. D. Melo, S. Sillankorva, J. Azeredo, (2016) Bacteriophage encoded depolymerases : their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Bot.* **100**: 2141-2151. doi:10.1007/s00253-015-7247-0.

Pirisi, A., (2000) Phage therapy - advantages over antibiotics? *The Lancet* **356**: 1418. doi:10.1016/S0140-6736(05)74059-9.

Pizarro-Cerdá, J., R. Jonquières, E. Gouin, J. Vandekerckhove, J. Garin, P. Cossart, (2002) Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InlA- or InlB-phagosomes. *Cell. Microbiol.* **4**: 101-115. doi:10.1046/j.1462- 5822.2002.00169.x.

Pizarro-Cerdá, J., A. Kühbacher, P. Cossart, (2012) Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. **2**: a010009. doi:10.1101/cshperspect.a01000.

Pouillot, R., K. C. Klontz, Y. Chen, L. S. Burall, D. Macarisin, M. Doyle, K. M. Bally, E. Strain, A. R. Datta, T. S. Hammack, J. M. Van Doren, (2016) Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**: 2113-2119. doi:10.3201/eid2212.160165.

Promadej, N., F. Fiedler, P. Cossart, S. Dramsi, S. Kathariou, (1999) Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires gtcA, a novel, serogroup-specific gene. *J. Bacteriol.* **181**: 418-425.

-R-

Rai, B., (2012) In: *Essentials of industrial microbiology*. Morrisville NC, Lulu Press, p. 14.

Ralovich, B., (1989a) Listeriosis- A worldwide issue. *Acta Microbiol. Hung.* **36**: 95-102.

Ralovich, B., (1989b) Methods to determine virulence of *Listeria* strains. *Int. j. food Microbiol.* **8**: 269-272. doi:10.1016/0168-1605(89)90025-1.

Rashid, M. H., T. Revazishvili, T. Dean, A. Butani, K. Verratti, K. A. Bishop-Lilly, S. Sozhamannan, A. Sulakvelidze, C. Rajanna, (2012) A *Yersinia pestis*-specific, lytic phage preparation significantly reduces viable *Y. pestis* on various hard surfaces experimentally contaminated with the bacterium. *Bacteriophage* **2**: 168-177. doi:10.4161/bact.22240.

Raugel, P. J., (1999) Gene-Trak Systems. In: *Rapid food analysis and hygiene monitoring*. Berlin, Heidelberg, Springer, pp. 359-360.

Ravat, F., P. Jault, J. Gabard, (2015) Bactériophages et phagothérapie: Utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann. Burns Fire Disasters* **28**: 13-20.

Reij, M. W. & E. D. Den Aantrekker, (2004) Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* **91**: 1-11. doi:10.1016/S0168-1605(03)00295-2

Rhoads, D. D., R. D. Wolcott, M. A. Kuskowski, B. M. Wolcott, L. S. Ward, A. Sulakvelidze, (2009) Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J. Wound Care* **18**: 237-238. doi:10.12968/jowc.2009.18.6.42801.

Riedel, C. U., I. R. Monk, P. G. Casey, M. S. Waidmann, C. G. Gahan, C. Hill, (2009) AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **71**: 1177-1189. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06589.x.

Rieu, A., S. Weidmann, D. Garmyn, P. Piveteau, J. Guzzo, (2007) Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in adherence and differential expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6125-6133. doi:10.1128/AEM.00608-07.

Roberts, M. C., B. Facinelli, E. Giovanetti, P. E. Varaldo, (1996) Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol*. **62**: 269-270.

Rocourt, J., B. Catimel, A. Schrettenbrunner, (1985) Isolement de bactériophages de *Listeria Seeligeri* et *L. Welshimeri*. Lysotypie de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. Seeligeri* et *L. Welshimeri*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **259**: 341-350.

Rocourt, J., (1988) Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* **16 (Suppl. 2)**: 89-91.

Rocourt, J., (1989) *Listeria* et la listériose humaine. *Ann. Inst. Pasteur* **1**: 25-30.

Rocourt, J., (1991) Human listeriosis - 1989. In: *WHO/HPP/FOS/91.3*. Geneva. World Health organization.

Rocourt, J. & C. Jacquet, (2000) *Listeria* et listériose. In: *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Freney J. *et al*. (eds), Eska Éditions.

Romanova, N., S. Favrin, M. W. Griffiths, (2002) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6405-6409. doi:10.1128/AEM.68.12.6405-6409.2002.

Romanova, N. A., P. F. Wolffs, L. Y. Brovko, M. W. Griffiths, (2006) Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Appl. Environ. Microbiol*. **72**: 3498-3503. doi:10.1128/AEM.72.5.3498-3503.2006.

Rosenberg, M., (1984) Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studiing cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **22**: 289-295. doi:10.1016/0378-1097(84)90026-0.

Rosevear, A., (1984) Immobilised biocatalysts - a critical review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **34B**: 127-150. doi:10.1002/jctb.280340302.

Rossi, L. P. R., R. C. C. Almeida, L. S. Lopes, A. C. L. Figueiredo, M. P. P. Ramos, P. F. Almeida, (2011) Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *L. monocytogenes* using bacteriophage P100. *Food Control* **22**: 954-958. doi:10.1016/j.foodcont.2010.12.001

Roucourt, B. & R. Lavigne, (2009) The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. *Environ. Microbiol.* **11**: 2789-2805. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02029.x.

Roy, B., H.-W. Ackermann, S. Pandian, G. Picard, J. Goulet, (1993) Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriaphages and a quaternary ammonium compound. *Appl. Environ. Microbiol*. **59**: 2914-2917.

Roy, B., C. Philippe, M. J. Loessner, J. Goulet, S. Moineau, (2018) Production of bacteriophages by *Listeria* cells entrapped in organic polymers. *Viruses* **10**: 324. doi:10.3390/v10060324.

Ruchko, I. & K. Tretyak, (1936) Therapeutic effect of *Staphylococcus* phage for oral and dental infections. *Soviet Stomatol.* **1**: 11-20.

Russell, A. D., (2004) Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J. Hosp. Infect*. **57**: 97-104. doi:10.1016/j.jhin.2004.01.004.

Ryu, J. H. & L. R. Beuchat, (2005) Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl. Environ. Microbiol*. **71**: 247-254. doi:10.1128/AEM.71.1.247-254.2005.

-S-

Salcedo, C., L. Arreaza., B. Alcalá, L. de la Fuente, J. A. Vázquez, (2003) Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 757-762. doi:10.1128/JCM.41.2.757-762.2003.

Samson, J. E., A. H. Magadàn, M. Sabri, S. Moineau, (2013) Revenge of the phages defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 675-687. doi:10.1038/nrmicro3096.

Sanderson, G. R., V. L. Bell, D. Ortega, (1989) A comparison of gellan gum, agar, K-carrageenan, and algin. *Cereal Foods World* **34**: 991-998.

Sanderson, G. R., (1990). Gellan gum. In: *Food Gels*. London, New York, P. Harris (ed), Elsevier Applied Science, pp. 201-232.

Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M. Widdowson, S. L. Roy, P. M. Griffin, (2011) Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 7-15. doi.10.3201/eid1701.P11101.

Scannell, A. G., C. Hill, R. P. Ross, S. Marx, W. Hartmeier, E. K. Arendt, (2000) Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate. *J. Appl. Microbiol*. **89**: 573-579. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01149.x.

Schlech, W. F. 3rd, P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, C. V. Broome, (1983) Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med*. **308**: 203-206. doi:10.1056/NEJM198301273080407



Paper Craut.com

Schmelcher, M., D. M. Donovan, M. J. Loessner, (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* **7**: 1147-1171. doi:10.2217/fmb.12.97.

Schmitdt, R., (1999) Comportement des matériaux dans les milieux biologiques: Applications en médecine et biotechnologie. In*: Traité des matériaux (tome 7)*. Lausanne, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, pp. 209-213.

Schoder, D., B. Stessl, K. Szakmary-Brändle, P. Rossmanith, M. Wagner, (2014) Population diversity of *Listeria monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010. *Food Microbiol.* **39**: 68-73. doi:10.1016/j.fm.2013.11.006.

Schultz, E. W., (1945) *Listerella* infections: a review. *Stanford Med. Bull*. **3**: 135-151.

Scott, A. E., A. R. Timms, P. L. Connerton, C. L. Carrillo, K. A. Radzum, I. F. Connerton, (2007) Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS pathogens* **3**: e119. doi:10.1371/journal.ppat.0030119.

Seeliger, H. P. R. & D. Jones, (1986) Genus *Listeria*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology (vol. 3)*. Baltimore, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. A. Holt, (eds), Williams and Wilkins Co., pp. 1235-1245.

Sesto, N., M. Touchon, J. M. Andrade, J. Kondo, E. P. C. Rocha, C. M. Arraiano, C. Archambaud, É. Westhof, P. Romby, P. Cossart, (2014) A PNPase dependent CRISPR System in *Listeria*. *PLoS Genetics* **10**: e1004065. doi:10.1371/journal.pgen.1004065.

Sharma, M., (2013) Lytic bacteriophages: Potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce. *Bacteriophage* **3**: c25518. doi:10.4161/bact.25518.

Sharma, S., (2015) Food preservatives and their harmful effects. *Int. J. Scient. Res. Publ.* **5**: 1-2.

Sillankorva, S. M., H. Oliveira, J. Azeredo, (2012) Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.* **2012**: ID863945. doi:10.1155/2012/863945.

Silva, E. N. G., A. C. L. Figueiredo, F. A. Mirandan, R. C. de Castro Almeida, (2014) Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Braz. J. Microbiol.* **45**: 11-16.

Simon, J.-L., (2013) Fiche élaborée dans le cadre du groupe de travail national sur les actions de diagnostic différentiel des avortements chez les bovins (animation GDS France). D'après la fiche élaborée en septembre 2010 sous la coordination de GDS Rhône-Alpes en collaboration avec les GTV Rhône-Alpes et VetAgro-Sup/ Financement Union Européenne-FEADER. Récupéré le 22 août 2017 sur le site: *http://idele.fr/fileadmin/medias/Documents/2013_01_PlanAvtsBVS_Annexe09_Fiche_Listeriose.pdf*

Smidsrød, O. & G. Skja'k-Brik, (1990) Alginate as Immobilization Matrix for Cells. *Trends Biotechnol.* **8**: 71-77. doi:10.1016/0167-7799(90)90139-O.

Smith, H. W. & M. B. Huggins, (1982) Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infection in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 307-318. doi:10.1099/00221287-128-2-307.

Smith, H. W. & M. B. Huggins, (1983) Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets, and lambs. *J. Gen. Microbiol*. **129**: 2659-2675. doi:10.1099/00221287-129-8-2659.

Smith, H. W., M. B. Huggins, K. M. Shaw, (1987) The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J. of Gen. Microbiol.* **133**: 1111-1126. doi:10.1099/00221287-133-5-1111.

Snelling, A. M., K. G. Kerr, J. Heritage, (1991) The Survival of *Listeria monocytogenes* on fingertips and factors affecting elimination of the organism by hand washing and disinfection. *J. Food Protect*. **54**: 343-348. doi:10.4315/0362-028X-54.5.343.

Soni, K. A. & R. Nannapaneni, (2010a) Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J. Food Protect.* **73**: 32-38. doi:10.4315/0362-028X-73.1.32.

Soni, K. A. & R. Nannapaneni, (2010b) Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J. Food Protect.* **73**: 1519-1524. doi:10.4315/0362-028X-73.8.1519.

Song, P., L. Wu, W. Guan, (2015) Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: A metaanalysis. *Nutrients* **7**: 9872-9895. doi:10.3390/nu7125505.

Soumet, C., C. Ragimbeau, P. Maris, (2005) Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Letters in Appl. Microbiol*. **41**: 291-296. doi:10.1111/j.1472-765x.2005.01763.x.

Speer, B. S., N. B. Shoemaker, A. A. Salyers, (1992) Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev*. **5**: 387-399. doi:10.1128/CMR.5.4.387.

Stambach, N.R., S. A. Carr, C. R. Cox, K. J. Voorhees, (2015) Rapid detection of *Listeria* by bacteriophage amplification and SERS-lateral flow immuno-chromatography. *Viruses* **7**: 6631-6641. doi:10.3390/v7122962.

Strevett, K. A. & G. Chen, (2003) Microbial surface thermodynamics and applications. *Res. Microbiol.* **154**: 329-335. doi:10.1016/S0923-2508(03)00038-x.

Styles, M. F., D. G. Hoover, D. F. Farkas, (1991) Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* **56**: 1404-1407. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb04784.x.



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Sulakvelidze, A., (2013) Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J. Sci. Food Agric*. **93**: 3137-3146. doi:10.1002/jsfa.6222.

Sutherland, I. W., K. A. Hughes, L. C. Skillman, K. Tait, (2004) The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**: 1-6. doi:10.1016/S0378-1097(04)00041-2.

Sword, C. P. & M. J. Pickett, (1961) The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol*. **25**: 241-248. doi:10.1099/00221287-25-2-241.

-T-

Tahiri, I., M. Desbiens, R. Benech, E. Kheadr, C. Lacroix, S. Thibault, D. Ouellet, I. Fliss, (2004) Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicine M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* **97**: 123-136. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.013.

Takahashi, H., T. Suda, Y. Tanaka, B. Kimura, (2010) Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Appl. Microbiol.* **50**: 618-625. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02842.x

Tanji, Y., T. Shimada, M. Yoichi, K. Miyanaga, K. Hori, H. Unno, (2004) Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 270-274. doi:10.1007/s00253-003-1438-9.

Tennant, S. M., E. L. Hartland, T. Phumoonna, D. Lyras, J. I. Rood, R. M. Robins-Browne, I. R. van Driel, (2008) Influence of gastric acid on susceptibility to infection with ingested bacterial pathogens. *Infect. Immun*. **76**: 639-645. doi:10.1128/IAI.01138-07.

Thassitou, P. K. & I. S. Arvanitoyannis, (2001) Bioremediation: A novel approach to food waste management. *Trends Food Sci. Technol.* **12**: 185-196. doi:10.1016/S0924-2244(01)00081-4.

Thimothe, J., K. K. Nightingale, K. Gall, V. N. Scott, M. Wiedmann, (2004) Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *J. Food Protect.*. **67**: 328-341. doi:10.4315/0362-028x-67.2.328.

Thomas, M. K., R. Vriezen, J. M. Farber, A. Currie, W. Schlech, A. Fazil, (2015) Economic cost of a *Listeria monocytogenes* outbreak in Canada, 2008. *Foodborne Path. Dis.* **12**: 966-971. doi:10.1089/fpd.2015.1965.

To, M. S., S. Favrin, N. Romanova, M. W. Griffiths, (2002) Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes. Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5258-5264. doi:10.1128/AEM.68.11.5258-5264.2002.

Toledo-Arana, A., O. Dussurget, G. Nikitas, N. Sesto, H. Guet-Revillet, D. Balestrino, E. Loh, J. Gripenland, T. Tensuu, K. Vaitkevicius, M. Barthelemy, M. Vergassola, M. A. Nahori, G. Soubigou, B. Régneault, J. Y. Coppée, M. Lecuit, J. Johansson, P. Cossart, (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**: 950-956. doi:10.1038/nature08080.

Tran, H. L., F. Fiedler, D. A. Hodgson, S. Kathariou, (1999) Transposon-induced mutations in two loci of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a result in phage resistance and lack of N-acetylglucosamine in the teichoic acid of the cell wall. *Appl. Environ. Microbiol*. **65**: 4793-4798.

Tran Van Nhieu, G. & P. Cossart, (2001) Détournement de fonctions cellulaires clés par les bactéries pathogènes. *Med. Sci.* 17: 701-711. doi:10.4267/10608/1994.

Tsulukidze, A. P., (1938) Application of phages in urology. *Urology* **15**: 10-13.

Turovskiy, Y., D. Kashtanov, B. Paskhover, M. L. Chikindas, (2007) Quorum sensing: Fact, fiction, and everything in between. *Adv. Appl. Microbiol*. **62**: 191-234. doi:10.1016/S0065-2164(07)62007-3.

Twort, F. W., (1915) An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* **2**: 1241.

-V-

Valério, N., C. Oliveira, V. Jesus, T. Branco, C. Pereira, C. Moreirinha, A. Almeida, (2017) Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli. Virus Res.* **240**: 8-17. doi:10.1016/j.virusres.2017.07.015.

Van Nieuwenhuyzen, W, V. Budnik, T. Meier, L. Popper, (2006) Functional use of hydrocolloids in food systems. *Agro Food Ind. Hi-Tec.* **17**: 39-43. doi:10.14456/kkurj.2015.8.

Vázquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, J. Kreft, (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 584-640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.

Vela, A. I., J. F. Fernandez-Garayzabal, J. A. Vazquez, M. V. Latre, M. M. Blanco, M. A. Moreno, L. de la Fuente, J. Marco, C. Franco, A. Cepeda, A. A. Rodriguez Moure, G. Suarez, L. Dominguez, (2001) Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol*. **67**: 5840-5843. doi:10.1128/AEM.67.12.5840-5843.2001.

Veskovic-Moracanin, S. & A. Martinovic, (2006) Antilisterial property of *Leuconostoc mesenteroides* E131 strain isolated from traditional fermented sausage. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome, AGRIS, pp. 70-71.

Vivant, A.-L., D. Garmyn, L. Gal, P. Piveteau, (2014) The Agr communication system provides a benefit to the populations of *Listeria monocytogenes* in soil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**: 1-7. doi:10.3389/fcimb.2014.00160.

Vogel, M., L. Fédérici, S. Affenberger, E. Andrès, (2006) Intérêt potentiel des fluoroquinolones dans le traitement des méningites. *Méd. thér.* **12**: 63.

Von Jagow, C. & T. Teufer, (2007) Das grosse Fressen; Bakteriofagen in der Lebensmittelherstellung: eine rechtliche Einordnung, *Zeitschrift für das gesamte Lebensmittelrecht (ZLR)*, **34**: 25-50.

-W-

Wagner, M. & J. McLauchlin, (2008) Biology. In: *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton FLA, Liu D. (ed), CRC Press, pp. 3-25.

Ward, T. J., L. Gorski, M. K. Borucki, R. E. Mandrell, J. Hutchins, K. Pupedis, (2004) Intraspecific phylogeny and lineage group indentification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **186**: 4994-5002. doi:10.1128/JB.186.15.4994-5002.2004.

Weagant, S. D., P. N. Sado, K. G. Colburn, J. D. Torkelson, F. A . Stanley, M. H. Krane, S. C. Sheilds, C. F. Thayer, (1988) The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot*. **51**: 655-657. doi:10.4315/0362-028X-51.8.655.

Weller, D., A. Andrus, M. Wiedmann, H. C. den Bakker, (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 286-292. doi:10.1099/ijs.0.070839-0.

Wiedmann, M. & B. L. James, (1996) Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1086-1090.

Wittebole, X., S. De Roock, S. M. Opal, (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* **5**: 226-235. doi:10.4161/viru.25991.

Woolston, J., A. R. Parks, T. Abuladze, B. Anderson, M. Li, C. Carter, L. F. Hanna, S. Heyse, D. Charbonneau, A. Sulakvelidze, (2013) Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage* **3**: e25697. doi:10.4161/bact.25697.

Wu, S., Q. Wu, J. Zhang, M. Chen, W. Guo, (2016) Analysis of multilocus sequence typing and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese retail ready-to-eat food. *Front. Microbiol*. **7**: 168. doi:10.3389/fmicb.2016.00168.

-Y-

Yamamoto, K. R. & B. M. Alberts, (1970) Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* **40**: 734-747. doi:10.1016/0042-6822(70)90218-7.

Yousef, A. E. & E. H. Marth, (1990) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Parmesan cheese. *J. Dairy Sci.* **73**: 3351-3356. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)79030-3.

Yücel, N., S. Çitak, M. Önder, (2005) Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiol*. **22**: 241-245. doi:10.1016/j.fm.2004.03.007.

-Z-

Zhang, L., Y. Wang, D. Liu, L. Luo, Y. Wang, C. Ye, (2018) Identification and characterization of *als* genes involved in D-allose metabolism in lineage II strain of *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol*. **9**: 621. doi:10.3389/fmicb.2018.00621.

Zhang, W., B. M. Jayarao, S. J. Knabel, (2004) Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**: 913-920. doi:10.1128/AEM.70.2.913-920.2004.

Zhao, L. H. & P. N. Sen, (2012) Hydrophobicity and biofilm growth of E-coli RP437, MG1655 and B/r. *MRS Onl. Proc. Libr. Arch.* **1466**. doi:10.1557/opl.2012.1499.

Zink, R. & M. J. Loessner, (1992) Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58(1)**: 296-302.

Zuidam, N. J. & E. Shimoni, (2010) Overview of microencapsulates for use in food products or proccesses and methos to make them. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York, Zuidam N. J. & V. A. Nedovic (eds)., Springer, Science-Business Media, 410 p.

## Organismes et autres


ACIA (Agence canadienne d'inspection des aliments), (2008) «Présence possible de Listeria monocytogenes dans des produits de viande fabriqués à l'établissement 97B». Publié le 24 août 2008. Récupéré le 20 janvier 2017 sur le site: *http://epe.lac-bac.gc.ca/100/206/301/cfia-acia/2011-09-21/www.inspection.gc.ca/francais/corpaffr/recarapp/2008/20080824f.shtml.*

ACIA (Agence canadienne d'inspection des aliments), (2016a) «Avis de rappel d'aliments - Rappel de salades coupées, de mélanges de salades, de préparations pour salades et de légumes-feuilles préemballés de marque Dole et certaines légumes-feuilles préemballés de marque PC Biologique en raison de la bactérie *Listeria monocytogenes*». Publié le 22 janvier 2016. Récupéré le 3 novembre 2017 sur le site: *http://www.inspection.gc.ca/au-sujet-de-l-acia/salle-de-nouvelles/avis-de-rappel-d-aliments/liste-complete/2016-0-22c/fra/1453522915084/1453522920123.*

ACIA (Agence canadienne d'inspection des aliments), (2016b) «Avis de rappel d'aliments - Rappel de saumon sauvage du Sockeye fumé et saumon Sockeye sauvage du Pacifique fumé de marque *Sensations* par *Compliments* en raison de la bactérie *Listeria monocytogenes*». Publié le 17 septembre 2016. Récupéré le 18 novembre 2017 sur le site: *http://inspection.gc.ca/au-sujet-de-l-acia/salle-de-nouvelles/avis-de-rappel-d-aliments/liste-complete/2016-09-17/fra/1474161389022/1474161393340.*

AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), (2000) «Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*». Récupéré le 28 août 2017 sur le site: *http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/054000123/0000.pdf.*

Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), (2011) «*Listeria monocytogenes*. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments». Récupéré le 12 mars 2017 sur le site: *https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0171Fi.pdf.*

Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), (2014) Avis de l'Anses relatif à l'utilisation des phages dans les denrées alimentaires d'origine animale pour lutter contre les *Listeria*. Expertise relative à la saisine 2013-SA-0111. Récupéré le 12 avril 2017 sur le site: *https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2013sa0111.pdf*

Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), (2016) «Listériose: Maladie, agent responsable et rôle de l'Anses». Mis à jour le 8 juin 2016. Récupéré le 6 avril 2017 sur le site: *https://www.anses.fr/fr/content/list%C3%A9riose.*

ASPC (Agence de la santé publique du Canada), (2013) «Foodnet Canada, Rapport annuel 2013». Révisé le 14 décembre 2017. Récupéré le 4 janvier 2018 sur le site: *https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/aliments-et-nutrition/2013-foodnet-canada-rapport-annuel.html.*

ASPC (Agence de la santé publique du Canada), (2016) «Infographique : Maladies d'origine alimentaire, hospitalisations et décès au Canada» (moyennes annuelles). Révisé le 5 juillet 2016. Récupéré le 7 février 2018 sur le site: *https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/aliments-et-nutrition/infographique-maladies-origine-alimentaire-hospitalisations-deces-canada.html.*

Bulletin des agriculteurs, (2007) «La FDA autorise l'ajout de LISTEX à tous les produits alimentaires». Publié en juillet 2007. Récupéré le 20 janvier 2017 sur le site: *http://www.lebulletin.com/actualites/la-fda-autorise-lajout-de-listex-tous-les-produits-alimentaires.*

CCA (Commission du *Codex Alimentarius*), (2009) «Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods». CAC/GL 61 – 2007 (Modifié en 2009). Récupéré le 27 novembre 2017 sur le site: *http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/.*

CDC (Centers for Disease Control and prevention), (2002) «Public Health Dispatch: Outbreak of Listeriosis - Northeastern United States, 2002». *Morb. Mortal Weekly Rep,* **51(42)**: 950-951.

CDC (Center for Disease Control & Prevention), (2003) «Report on Foodborne Pathogens - 2003». Emerging Infection Program, *Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)*. Récupéré le 12 janvier 2017 sur le site: https://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2003_report.pdf.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), (2011) «Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from jenson farms, Colorado (final update)» Récupéré le 22 mai 2017 sur le site: *https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html.*

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), (2016) «Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update)». Récupéré le 22 mai 2017 sur le site: *https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html.*

CHP (Center for Health Protection - Hong Kong), (2010) «Epidemiology of listeriosis and prevention strategies». Récupéré le 30 septembre 2017 sur le site: *http://www.chp.gov.hk/files/pdf/epidemiology_of_listeriosis_and_prevention_strategies.pdf.*

CNRS (Centre national de recherche scient.), (2010) «L'huile essentielle de coriandre, un antimicrobien naturel». F. Tisserand. *Du champ à la table (Inist) Actualités de la recherche scientifique en alimentation, nutrition et agriculture.* Mis à jour 8 juillet 2016. Récupéré le 3 avril 2017 sur le site: http://duchampalatable.inist.fr/spip.php?article88.

CRVB Félix d'Hérelle (Centre de référence pour virus bactriens Félix d'Hérelle), Université Laval, (2018). Récupéré le 14 janvier 2018 sur le site: *https://www.phage.ulaval.ca/fr/accueil/.*

Directorate-General for Health and Consumers, (2009) In: *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. 28th Plenary* Bruxelles, Commission Européenne, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks.

Eliava Phage Therapy Center Ltd. (2015) «Se soigner en Georgie». Récupéré le 15 octobre 2017 sur le site. *http://www.sesoignerengeorgie.com/instituteliavadelaphagotherapie.html.*

FAO (United Nations Food and Agriculture Organisation), (1993) Les composants d'un détergent. In: *L'hygiéne dans l'industrie alimentaire: les produits et l'application de l'hygiéne*. J.-C. Bellouin. Étude FAO Production et santé animales. Rome, FAO. Récupéré le 12 décembre 2017 sur le site: *http://www.fao.org/docrep/004/T0587F/T0587F03.htm.*

Food Safety News, (2014) «Danish Listeria Outbreak Has Killed 15 People, 38 Have Been Sickened». Publié le 9 septembre 2014. Récupéré le 14 juin 2017 sur le site: *http://www.foodsafetynews.com/2014/09/danish-listeria-outbreak-claims-15-victims/#.VHg4sPmHh8E*

Gouvernement du Canada, (1981) Publication: «Rapport hebdomadaire des maladies au Canada (26 décembre 1981)». Récupéré le 10 septembre 2017 sur le site: *http://publications.gc.ca/site/archivee-archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection_2016/aspc-phac/H12-21-1-7-52.pdf.*

Gouvernement du Canada, (2010) Archives. «Présence possible de la bactérie *Listeria monocytogenes* dans certaines viandes prêtes-à-manger fabriquées par Dats Déli Européen (établissement 155)». Page modifiée le 28 juillet 2010. Récupéré le 2 avril 2017 sur le site: *https://www.canada.ca/fr/nouvelles/archive/2010/07/presence-possible-bacterie-listeria-monocytogenes-certaines-viandes-pretes-manger-fabriquees-dats-deli-europeen-etablissement-155--550229.html?=undefined&wbdisable=true.*

Gouvernement du Canada, (2016) «Surveillance de la listériose». Récupéré le 4 janvier 2017 sur le site: *https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/listeriose/surveillance-listeriose.html#s2.*

Gouvernement du Québec (2016) «La listériose». Portail santé mieux être. Mis à jour le 14 mars 2016 Récupéré le 16 avril 2017 sur le site: *http://sante.gouv.qc.ca/problemes-de-sante/listeriose/.*

ILSI (International Life Sciences Institute), Risk Science Institute, (2005) Achieving Contiuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis – A Risk-Based Approach. *J. of Food Prot*. **68(9)**: 1932-1994.

Intralytix (2017) «Listshield™». Récupéré le 16 juin 2017 sur le site: http://www.intralytix.com/index.php?page=prod&id=1.

InVS (Institut de Veille Sanitaire) «Nombre de cas de listérioses déclarés par an en France de 1999 à 2014». Mis à jour 19 novembre 2015. Récupéré le 10 mars 2017 sur le site: *http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Listeriose/Donnees-epidemiologiques.*

ISVM (International Society for Viruses of Microorganisms), (2017) «Resources». Récupéré le 14 mars 2017 sur le site: *http://www.isvm.org/resources.html.*

Microbiologiemédicale.fr, «Physiopathologie des méningites purulentes». Fig. 6 © Pascal Fraperie. Récupéré le 22 août 2017 sur le site: *http://microbiologiemedicale.fr/physiopathologie-et-diagnostic-des-infections/plan-lcr/physiopathologie-des-meningites-purulentes/.*

Microbiologie-médicale.fr, «Généralités sur les virus». B. Veron. Récupéré le 11 novembre 2016 sur le site: *http://www.microbiologie-medicale.fr/virologie/generalitesvirus.htm*

Ministère de la santé et des soins de longue durée de l'Ontario, (2008) «Éclosion de listériose 2008». Récupéré le 10 janvier 2017 du site du Ministère: *http://www.health.gov.on.ca/fr/public/publications/disease/listeria_2008.aspx.*

NCBI (National Center for Biotechnology Information), (2016) Programme de recherche de régions homologues (protéines) BLASTp. Récupéré le 18 septembre 2017 sur le site: *https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.*

Nouvel Observateur, (2016) «Caroline, sauvée de l'amputation grâce à des virus "mangeurs" de bactéries». Article de B. Rocfort-Giovanni du 30 janvier 2016. Récupéré le 12 septembre 2017 sur le site: *http://tempsreel.nouvelobs.com/societe/20160129.OBS3644/caroline-sauvee-de-l-amputation-grace-a-des-virus-mangeurs-de-bacteries.html*

Phageguard, (2016) «Listex™». Récupéré le 16 juin 2017 sur le site: *https://www.phageguard.com/listeria-solution/*

Phagoburn, (2018) «Media communications». Récupéré le 10 janvier 2018 sur le site: *http://www.phagoburn.eu/media-communication.html*

Rapport-Gratuit.com

Protecteur du citoyen (Québec), (2009) «Gestion de la crise de la listériose associée aux fromages québécois : Prévention, surveillance et gestion des risques». *Assemblée nationale du Québec.* Récupéré le 12 décembre 2016 sur le site: *https://protecteurducitoyen.qc.ca/sites/default/files/pdf/rapports_speciaux/listeriose.pdf.*

Santé Canada, (2011) «Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger». Récupéré le 19 janvier 2017 du site du Ministère: *http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes.*

Santé Canada, (2012) «Bactériophage de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*». Projet de décision d'homologation RD2012-21. Publié le 23 janvier 2012. Récupéré le 19 décembre 2016 sur le site: *http://publications.gc.ca/collections/collection_2012/sc-hc/H113-9-2012-4-fra.pdf.*

Santé Canada, (2016) «Proposition de Santé Canada visant à permettre l'utilisation d'un nouvel additif alimentaire, Carnobacterium divergens M35, en tant qu'agent de conservation antimicrobien dans le saumon tranché fumé à froid prêt à consommer et dans la truite tranchée fumée à froid prête à consommer». Publié le 7 juin 2016. Récupéré le 2 avril 2017 sur le site: *https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/participation-public-partenariats/proposition-permettre-recours-nouvel-additif-alimentaire-carnobacterium-divergens-agent-conservation-antimicrobien-saumon/consultation.html.*

USDA (United States Department of Agriculture), (2013) «Top 5 foodborne pathogens cost the U.S. economy $14 billion each year». *Economic Research Service.* Mis à jour le 9 juillet 2015. Récupéré le 26 août 2017 sur le site: *https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=78325.*

USFDA (U. S. Food and Drug Administration), (2006) GRAS Notice 218: «Bacteriophage P100 preparation GRAS Notification of Bacteriophage P100 for Use in Food. - USFDA». Récupéré le 16 janvier 2017 sur le site: *https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=218&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=218*.

USFDA (U. S. Food and Drug Administration), (2014) GRAS Notice 528: «Intralytix GRAS Notification for *Listshield* (bacteriophages cocktail) - USFDA». Récupéré le 16 janvier 2017 sur le site: *https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=528&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=528*

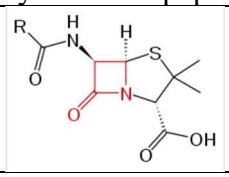
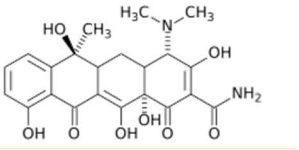
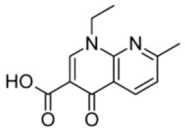
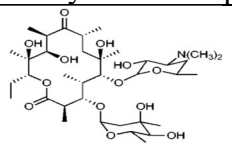
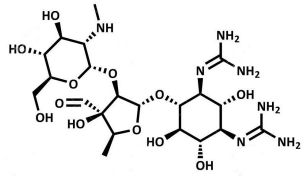
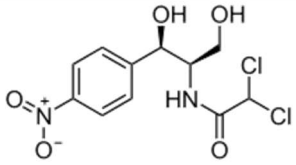
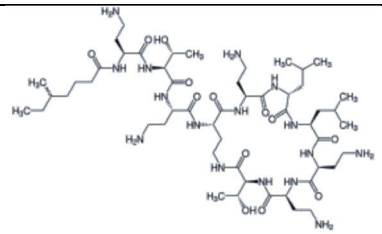
# ANNEXES

**Annexe 1. Réaction de Voges-Proskauer (VP)**

Production d'acétoïne à partir de la fermentation du glucose. L'oxydation de l'acétoïne produit du butanediol . En présence d'α-naphtol, le butanediol donne une réaction colorée rouge-rose.

Glucose ⟶ Pyruvate ⟶ Acétoïne ⟶ 2,3, Butanediol

**Annexe 2. Représentation moléculaire de quelques familles d'antibiotiques**

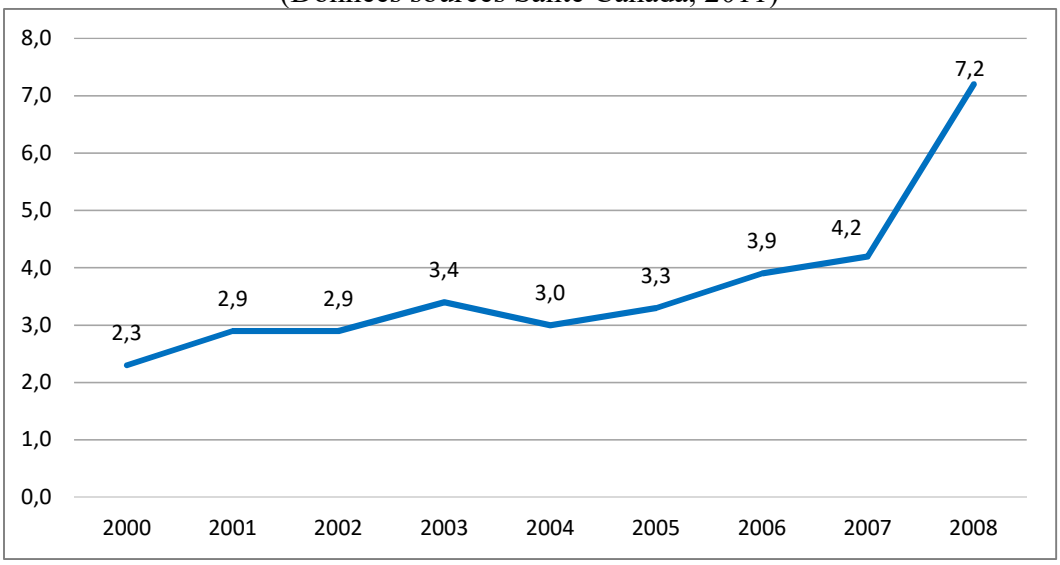
| | |
|---|---|
| *Bêta-lactamines (pénicilline)*<br>Interférence externe<br>Affecte la synthèse du peptidoglycane | *Cyclines (tétracycline)*<br>Interférence interne :<br>Affecte la biosynthèse des protéines |
|  |  |
| *Quinolones (acide nalidixique)*<br>Interférence interne<br>Affecte la réplication de l'ADN | *Macrolides (érythromycine)*<br>Interférence interne :<br>Affecte la biosynthèse des protéines |
|  |  |
| *Aminosides (streptomycine)*<br>Interférence interne :<br>Affecte la biosynthèse des protéines | *Phénicolés (chloramphénicol)*<br>Interférence interne<br>Inhibe la biosynthèse des protéines |
|  |  |
| *Polymixine (colistine)*<br>Affecte la membrane (interactions avec les phosphates et les lipopolysaccharides) fuite du contenu cellulaire | |
|  | |



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

**Annexe 3. Cas répertoriés de listériose (Canada - France)**

Taux canadien de listériose par million d'habitants de 2000 à 2008.
(Données sources Santé Canada, 2011)

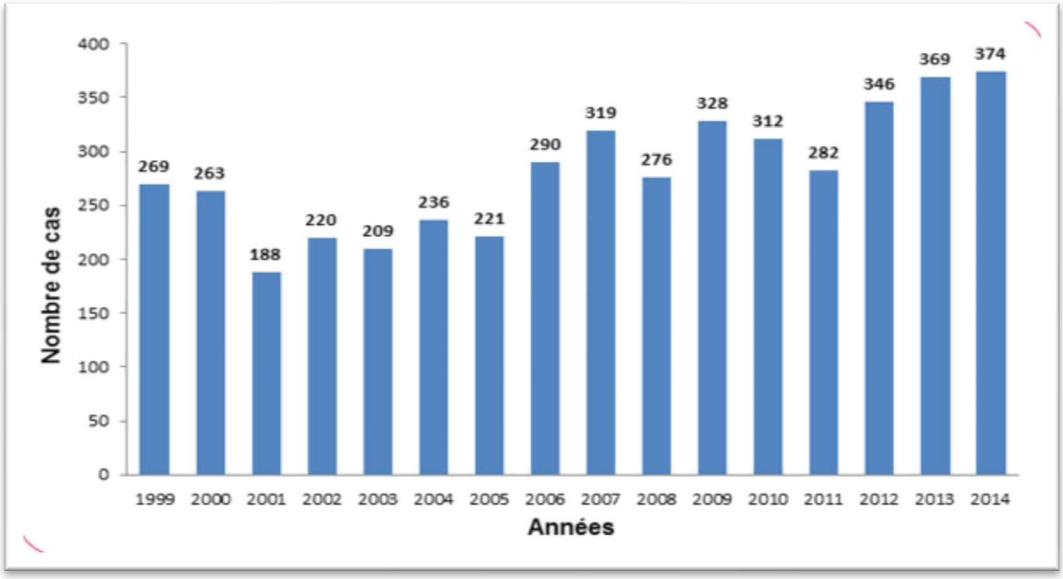



35 millions d'habitants au Canada, en moyenne 150 cas de listériose :
(150/35 = 4,3 cas par million d'habitants, en moyenne)

Le sérotype 1/2a est prédominant dans les isolats provenant de patients canadiens, suivi par les sérotypes 4b et 1/2b . (Clark *et al*., 2010)

---

Nombre de cas de listérioses déclarés par an en France 1999 à 2014. (InVS, 2015)




70 millions d'habitants en France (374/70) = 5,3 cas par million d'habitants en 2014)

**Annexe 4. Politique sur la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments**
(Santé Canada, 2011)

## Mise à jour de la politique de SC sur la présence de *Lm* dans les aliments PAM

– 2004 par rapport à 2011 –

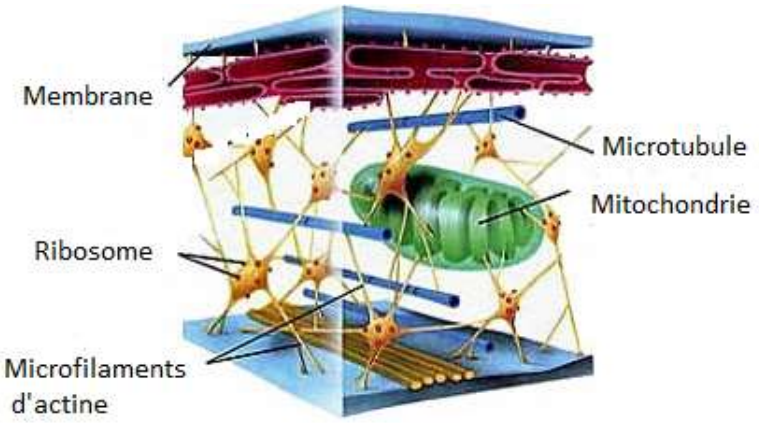
**6) De nouveaux critères de conformité du produit fini ont été élaborés afin de les aligner sur les normes internationales du Codex Alimentarius :**

| Catégories | Niveau d'intervention pour *Lm* | Nature de la préoccu-pation | Niveau de priorité |
|---|---|---|---|
| **1)** Les aliments PAM dans lesquels *Lm* **peut se multiplier** durant toute la durée de conservation prévue du produit. | Détecté dans 125 g (5 x 25 g) | Risque pour la santé 1 | Élevé |
| **2A)** Les aliments PAM dans lesquels le potentiel de prolifération de *Lm* **est limité** c.-à-d., les concentrations demeurent inférieures ou égales à 100 UFC/g durant toute la durée de conservation prévue du produit. Note: Un certain nombre de facteurs sera considéré relativement aux aliments qui peuvent appartenir à cette catégorie (c.-à-d., aliments pouvant contenir, à l'occasion, de faibles concentrations de *Lm* et ne comporter aucune étape de destruction (validation requise; p. ex., saumon fumé à froid) et/ou des aliments PAM dont la durée de conservation est ≤ 5 jours (validation non requise; p. ex., sushis)). | 100 UFC/g (5 x 10 g) | Risque pour la santé 2 | Moyen à faible |
| **2B)** Les aliments PAM dans lesquels *Lm* **ne peut pas proliférer** durant toute la durée de conservation prévue du produit (validation requise sauf si pH et les valeurs $a_w$ se situent dans la fourchette présentée précédemment ou si l'aliment est congelé). | | | Faible |

**Remarque :** La version de 2004 comportait trois catégories : 1) liée à une éclosion et/ou désignée à « risque élevé » selon l'évaluation de HHS/USDA (absence dans 50 g); 2) soutient la prolifération de *Lm* avec une DC > 10 jours (absence dans 25 g) et 3) soutient la prolifération *Lm* avec une DC ≤ 10 jours ou

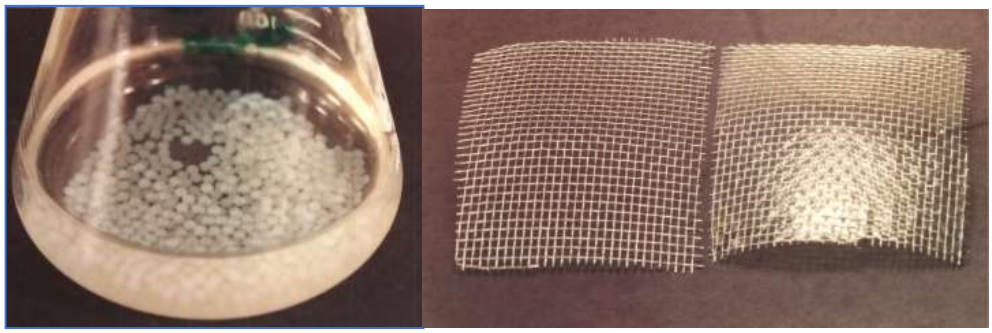
## Annexe 5. Microfilaments d'actine

L'actine est une protéine intracellulaire importante dans la cellule eucaryote. Cette protéine se présente sous forme de monomère globulaire (actine G) et sous forme de polymère (actine F). Le microfilament d'actine F est une structure polaire. La polymérisation de l'actine G en microfilaments d'actine F est catalysée par l'ajout d'ions $Mg^{2+}$, $K^{+}$ ou $Na^{+}$. Dans la cellule, il existe un équilibre entre la forme monomérique (G) d'actine et la forme filamenteuse (F). La transformation de l'actine G en actine F est régulée par des protéines associées à l'actine, en réponse à différents stimuli.




(Source de l'image : Pierre-Emmanuel CECCALDI, Institut Pasteur)

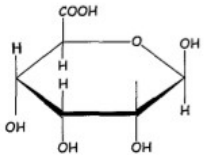
## Annexe 6. Immobilisation de bactéries dans des billes ou des filets d'alginate



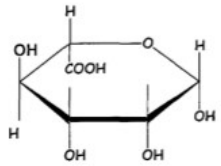
Exploration des techniques d'immobilisation (billes et filets). Brigitte Roy.

## Annexe 7. Formation des réseaux d'alginate

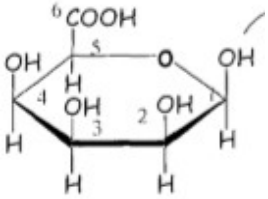
a) Formules chimiques des acides mannuronique et guluronique



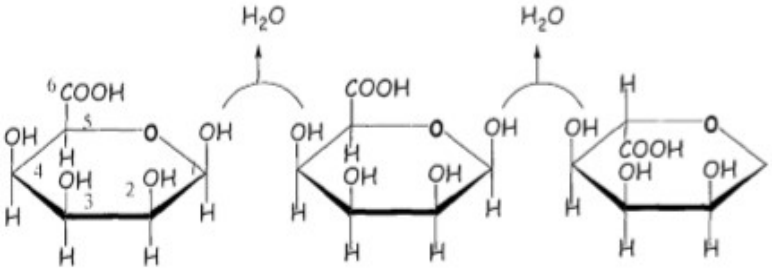
ACIDE MANNURONIQUE

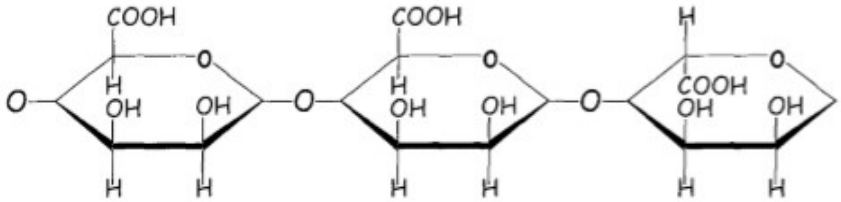


ACIDE GULURONIQUE

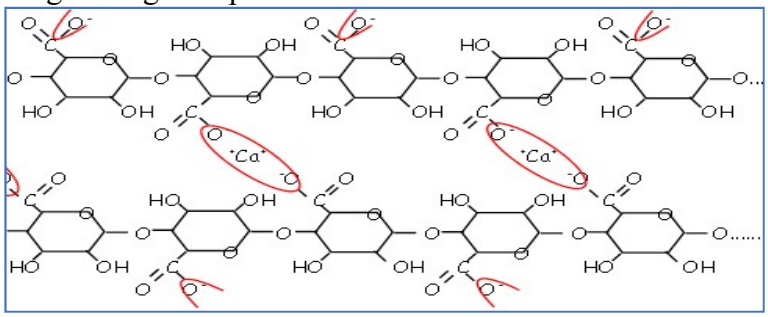


b) Étape d'hydratation



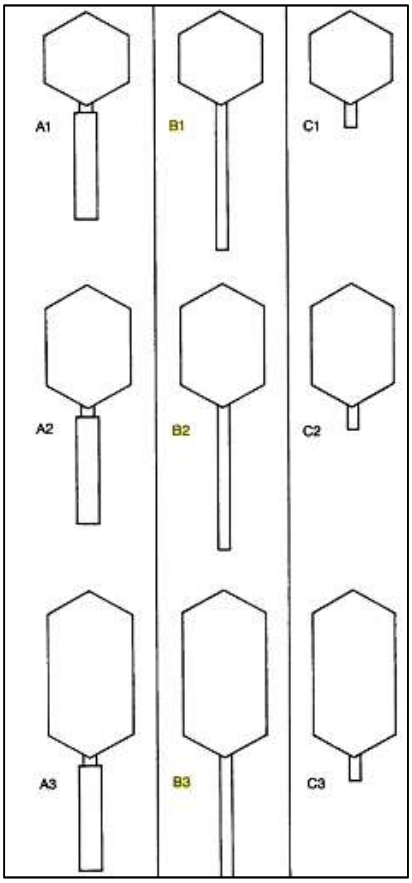


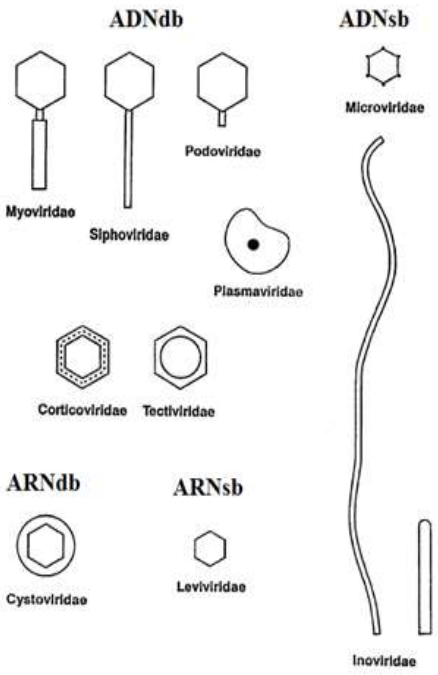
c) Formation du gel d'alginate par association avec les ions calcium



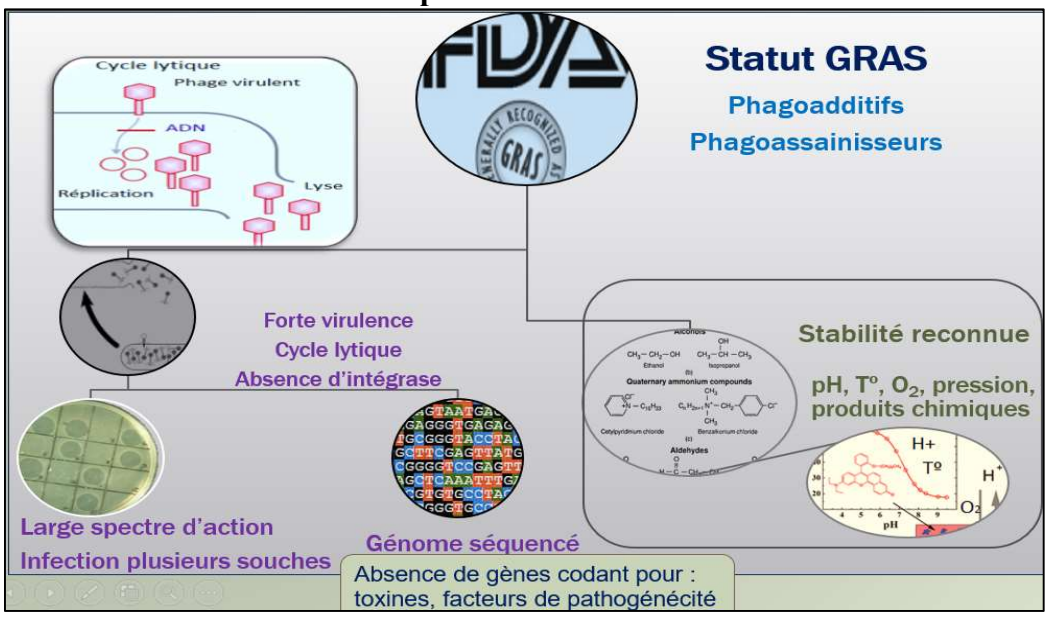
**Annexe 8. Morphologie des bactériophages (Adaptée de Ackermann, 2006)**

Le ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) regroupe les phages en 14 familles, dont quelques unes sont présentées dans le schéma qui suit. Les nouvelles méthodes de caractérisation (séquençage et protéomique virale) sont toutefois en voie de mener à des remaniements de taxons.



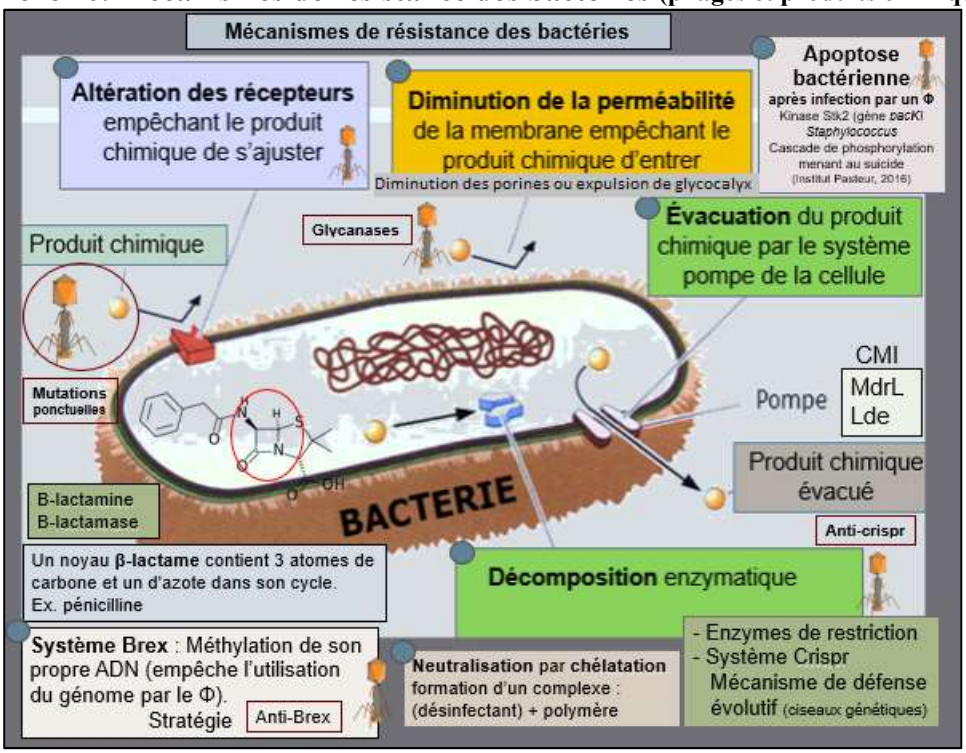



**Annexe 9. Principaux critères d'un statut GRAS**




Présentation soutenance 2018. Brigitte Roy.

**Annexe 10. Mécanismes de résistance des bactéries (phages et produits chimiques)**




Présentation soutenance 2018. Brigitte Roy.