

Université de Montréal

**Étude de la diversité, de la persistance et de la
formation du biofilm chez les souches de *Listeria
monocytogenes* dans des abattoirs de porc au Québec**

Par

Tamazight Cherifi

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph. D)
en sciences vétérinaires option microbiologie

Avril 2019

© Tamazight Cherifi, 2019

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée : Étude de la diversité, de la persistance et de la formation du biofilm
chez les souches de *Listeria monocytogenes* dans des abattoirs de porc au Québec

Présentée par
Tamazight Cherifi

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

M^{me} Mariela Segura
Présidente-rapporteuse

M. Philippe Fravalo
Directeur de recherche

M. Sylvain Quessy
Codirecteur

M^{me} Manon Racicot
Membre du jury

M. Alexandre Leclercq
Examineur externe

Résumé

Listeria monocytogenes est une bactérie Gram positif, largement présente dans différents types d'environnement, qui peut causer une maladie rare, mais grave, la listériose. Les caractéristiques de cette bactérie, sa pathogénie et sa capacité à survivre dans des conditions difficiles, font d'elle une bactérie qui suscite des inquiétudes particulièrement dans les industries agroalimentaires. Par son caractère ubiquitaire, elle se retrouve aussi dans ce type d'environnement et, par conséquent, peut contaminer les aliments. La persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries agroalimentaires est un phénomène établi, mais les mécanismes qui y conduisent font encore aujourd'hui débat. Par ailleurs, alors qu'une réglementation stricte a été mise en place dans les industries de transformation de produits prêts-à-manger en rapport avec les risques de contamination par *L. monocytogenes*, il n'y a, à ce jour que peu d'information disponible au Québec sur la présence de cette bactérie en amont de cette production, soit au niveau de la viande crue. Les objectifs de ce projet de thèse visent, d'une part, à étudier la distribution, la diversité et la persistance des souches de *L. monocytogenes* dans l'environnement de quatre abattoirs de porcs au Québec; de vérifier la présence de génotypes identifiés comme persistants dans les aliments et les cas de listériose humaine et d'établir les mécanismes de persistance de la bactérie dans l'environnement de ces industries.

Les résultats de ce projet de thèse ont montré qu'après les opérations de nettoyage et de désinfection, la composition de la contamination par *L. monocytogenes* selon les abattoirs et les secteurs était significativement différente. Ainsi, deux abattoirs ont montré une contamination plus élevée comparativement à un autre abattoir. Une importante diversité de souches de *L. monocytogenes* est présente dans l'environnement des abattoirs et des usines de découpe de viande. Cette diversité était généralement similaire entre les abattoirs sauf pour un seul abattoir qui a montré une diversité significativement plus élevée. La diversité des souches n'était pas variable en fonction de l'étape du processus d'abattage, soulignant la tolérance de ces souches aux stress spécifiques des différents environnements de ces industries. Cette étude a montré que la présence de souches persistantes de *L. monocytogenes* était plus importante au niveau des étapes post-éviscération de l'abattage, et particulièrement en découpe. Dans ces conditions, le risque de contamination des produits est très présent. La comparaison des caractéristiques

génotypiques des souches persistantes avec celles des souches isolées des aliments transformés et des cas de listériose humaine a montré un lien significatif entre ces souches. La relation entre la fréquence importante de détections de souches présentant ces profils au Québec, mais aussi au Canada et leur persistance dans les nombreux environnements agroalimentaires autres que celui des abattoirs et des salles de découpe des viandes reste à être documentée pour une meilleure compréhension de l'origine des listérioses humaines.

L'étude des différents mécanismes de persistance des souches de *L. monocytogenes* réalisée au cours de cette thèse a montré que la présence de gènes de résistance aux ammoniums quaternaires (QACs) dans certaines souches est particulièrement associée au caractère de persistance, alors qu'aucune différence dans la capacité à former du biofilm n'a été mise en évidence entre les souches persistantes et celles non persistantes. L'absence de caractère génétique évident et spécifique à la capacité de former le biofilm rend difficile l'association de ce dernier à la persistance des souches de *L. monocytogenes*. Néanmoins, le biofilm reste un phénomène pouvant expliquer en partie la persistance de *L. monocytogenes*. Par ailleurs l'étude de l'impact de la concentration en nutriments sur le biofilm de *L. monocytogenes* a montré qu'en conditions de limitation en nutriments, la structure du biofilm de *L. monocytogenes* était en forme de nid d'abeille attribuée à la présence d'une plus grande quantité d'ADN extracellulaire. Cette structure confère une meilleure stabilité au biofilm ce qui explique une plus forte biomasse.

Nous avons également démontré ici une association du genre *Listeria* avec d'autres genres bactériens de l'écosystème microbien résiduel de la surface de l'environnement de découpe des viandes. Ainsi, la co-occurrence de *Listeria spp.* avec *Pseudomonas spp.* laisse croire à la présence d'une interaction entre les espèces de ces genres. D'autre part, la présence de plusieurs genres dont *Sphingomonas*, *Paracoccus* et *Caulobacter* est négativement corrélée avec celle de *Listeria spp.* Ceci ouvre la voie à des études portant sur les interactions spécifiques entre ces genres bactériens et *Listeria*, et particulièrement l'espèce *monocytogenes*. L'ensemble de ces études éclaire le phénomène de persistance chez *L. monocytogenes* : il ne s'agit pas d'un mécanisme unique pour toutes les souches présentant ce caractère mais plutôt le résultat d'une sélection basée sur la résistance aux antimicrobiens, la capacité à former du biofilm en

interaction avec d'autres espèces bactériennes, le premier pouvant être nécessaire et suffisant. Cette sélection peut être favorisée également par l'existence d'une niche écologique favorable telle que des endroits difficiles d'accès au nettoyage et à la désinfection.

L'importance de considérer les risques de contamination de *L. monocytogenes* en amont de la production des produits prêts à manger à base de viande a été démontrée dans ce travail, dans la mesure où, à partir d'une grande diversité de souches présentes dans ce secteur, émerge une population présentant des profils génotypiques similaires à ceux retrouvés dans les aliments et les cas de listériose humaine. Cette étude permettra donc une reconsidération de l'importance d'une surveillance cohérente de *L. monocytogenes* en amont de la production de prêt à manger, afin de limiter ainsi les risques de contamination des matières premières des industries de transformation.

Mots-clés : *Listeria monocytogenes*, fréquence de détection, diversité, persistance, environnement, abattoirs, découpe, porc, biofilm, résistance aux désinfectants, microbiote des surfaces de convoyeurs de viande.

Abstract

Listeria monocytogenes is a Gram-positive bacterium widely distributed in various types of environment and can cause listeriosis, a rare but serious disease. The characteristics of this bacterium related to its pathogenesis and its ability to survive in harsh environments make it a harmful bacterium especially in the agri-food industries. Indeed, being an ubiquitous bacterium, it is also found in this type of environment leading to food contamination. The persistence of *L. monocytogenes* in the environmental food processing plants is a well-known phenomenon, but the mechanisms of persistence are still debated today. In addition, while strict regulations have been established in ready-to-eat industries in relation to the risk of contamination by *L. monocytogenes*, there is currently no information on the presence of this bacterium in early steps of pork product production in Canada. The aims of this project were 1) to investigate the distribution, diversity and persistence of *L. monocytogenes* isolates across slaughtering and cutting processes in four slaughterhouses, 2) to evaluate the association between the persistence attribute of *L. monocytogenes* genotypes and their detection in food and human listeriosis cases and 3) to study mechanisms involved in the persistence of *L. monocytogenes*, including biofilm formation ability, resistance to disinfectants and interaction with other bacteria from meat conveyor surfaces.

Results showed that after cleaning and disinfection operations, the composition of *L. monocytogenes* contamination according to slaughterhouses and sectors was significantly different. Thus, two slaughterhouses showed higher contamination compared to another slaughterhouse. Results have shown also that a significant diversity of *L. monocytogenes* strains was present in the environment of slaughterhouses and cutting areas. Overall, the diversity did not vary depending on slaughterhouses except for one slaughterhouse which exhibited a higher strain diversity. According to the stage of slaughter process, this diversity was not variable underlying the tolerance of these strains to the stress encountered within the different environments in these plants. This study showed that the presence of persistent strains of *L. monocytogenes* in the post-evisceration stages was greater, particularly in cutting areas, suggesting a possibility of repeated contamination of meat products.

When comparing the genetic profiles of persistent strains with strains isolated from processed and ready-to-eat foods and human listeriosis cases, a significant association was found, suggesting a persistence in other processing environments in addition to slaughterhouses.

Our studies of the different persistence mechanisms of *L. monocytogenes* strains have shown that Quaternary ammonium compounds (QAC) resistance genes are particularly associated with persistent strains while no difference in the ability to generate a biofilm was observed between persistent and non-persistent strains. The lack of obvious genetic attribute(s) and specificity in the various isolates biofilm formation ability makes it difficult to solely attribute to the latter to the persistence of *L. monocytogenes* strains. Nevertheless, biofilm remains a phenomenon that can partly explain the persistence of *L. monocytogenes*. Furthermore, the study of the co-occurrence of *Listeria spp.* with other bacterial genera of the cutting surfaces microflora showed that *Listeria spp.* co-occurs with *Pseudomonas spp.* suggesting a possible interaction between species from these two genera. In the other hand, several other genera, of which *Sphingomonas*, *Paracoccus* and *Caulobacter*, negatively affect *Listeria*, which would suggest that these bacteria inhibit or limit the growth of the genus *Listeria*, and potentially *L. monocytogenes*, by competition for colonizing this habitat or, more particularly, for nutrients.

Studies of these mechanisms have demonstrated that persistence of *L. monocytogenes* could not be explained by a single mechanism for all strains but through a selection phenomenon based on one or several attributes such as antimicrobial resistance, biofilm formation, and capacity to interact with other bacterial species. This selection pressure can also be affected by the existence of a favorable ecological niche such as difficult areas to access to disinfect.

In conclusion, the importance of contamination risks by *L. monocytogenes* in the pig slaughterhouses was demonstrated by the presence of a great diversity of strains at this level but, more importantly, by the finding that the likelihood to recover persistent strains may be enhanced through resistance to industrials disinfectants and, to a lesser extent, by biofilm formation. These persistent strains shared similar genetic profiles to those found in foods and human listeriosis. This study supports the importance of a consistent and comprehensive

monitoring of *L. monocytogenes* upstream of the ready-to-eat production, as a tool for limiting the risk of contamination of the raw materials of the processing industries.

Key-words: *Listeria monocytogenes*, distribution, diversity, persistence, slaughterhouse environment, cutting areas, pig, biofilm, resistance to disinfectants, microbiota of conveyor meat surfaces.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	3
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIÈRES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	12
Revue de littérature	12
Matériel et méthode	12
Article I	12
Article III	13
Article IV	13
LISTE DES FIGURES.....	14
Revue de littérature	14
Matériels et méthodes	15
Article I	15
Article II	16
Article III	17
Article IV	18
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	20
REMERCIEMENTS.....	22
I. INTRODUCTION.....	23
II. REVUE DE LITTÉRATURE.....	27
II.1 La listériose.....	28
II.1.1 Définition.....	28
II.1.2 Historique.....	28
II.1.3 Pathogénie chez l’Homme	30
II.1.4 Cycle infectieux de la listériose et facteurs de virulence	31
II.1.5 Listériose invasive	36
II.1.6 La listériose humaine : Groupes à risque	37
II.1.7 Données de listériose dans le monde	38
II.1.8 Données au Canada.....	39

II.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	41
II.2.1	Caractéristiques physico-chimiques : la clé de survie dans différents environnements	41
II.2.2	Structure phylogénétique de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
II.2.3	Méthode de caractérisation	44
II.2.4	Diversité et Distribution spatiotemporelle des souches de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
II.2.5	Facteurs de virulence spécifiques	50
II.3	<i>Listeria monocytogenes</i> dans les abattoirs de porcs	52
II.3.1	Épidémiologie de <i>Listeria monocytogenes</i>	52
II.3.2	Organisation des étapes d'abattage de porc et identification des risques de contamination	53
II.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i> dans les abattoirs et les usines de découpe : prévalence et distribution	56
II.3.4	Rôle de la contamination environnementale.....	57
II.4	Contamination des industries de transformation du prêt à manger et dans les ventes de détail	58
II.5	Persistance de <i>Listeria monocytogenes</i> dans l'environnement des abattoirs	59
II.5.1	Définition d'une souche persistante	59
II.6	Mécanismes de persistance	60
II.6.1	Formation du biofilm	61
II.6.2	Résistance aux désinfectants	68
II.6.3	Interaction entre différentes espèces microbiennes	77
II.6.4	Formation de niches écologiques	85
II.7	Réglementation sur la présence de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments au Canada	86
II.7.1	Contrôle de <i>Listeria</i> spp.	87
II.7.2	Contrôle dans l'environnement des industries	88
II.7.3	Contrôle des aliments PAM.....	89
II.8	Résumé de la littérature, problématique et objectifs	91
III.	MATÉRIEL ET MÉTHODE	94
III.1	Article I	95
	Distribution, diversity and persistence of <i>Listeria monocytogenes</i> isolates in pork slaughterhouses and association between persistence attribute of strains and detection in clinical isolates	95
III.2	Article II	134
	Impact of nutrient restriction on the structure of <i>Listeria monocytogenes</i> biofilm grown in a microfluidic system	134
III.3	Article III	163
	Genomic characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> isolates reveals that their persistence in a pig slaughterhouse is linked to the presence of benzalkonium chloride resistance genes	163
III.4	Article IV	201

Metagenomic study of cleaned and sanitised conveyor surfaces revealed the co-occurrence of <i>Listeria monocytogenes</i> with other bacterial genera and their respective diversity.....	201
IV. DISCUSSION GENERALE.....	213
IV.1 Distribution et diversité des souches de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les abattoirs.....	214
IV.1.1 Profil de contamination des abattoirs et usines de découpe par <i>Listeria monocytogenes</i>	214
IV.1.2 Diversité des souches le long du processus d’abattage et de découpe	216
IV.2 Persistance des souches de <i>Listeria monocytogenes</i>.....	219
IV.2.1 Dynamique des souches persistantes dans l’environnement de la production primaire	220
IV.2.2 Portion des souches persistantes en abattoir-découpe de porc parmi les souches isolées des aliments et des cas de listériose humaine.....	222
IV.3 Mécanismes de persistance de <i>Listeria monocytogenes</i>	224
IV.3.1 Formation de biofilm.....	224
IV.3.2 Résistance aux désinfectants	230
IV.3.3 Interaction avec le microbiote de l’environnement des usines de découpe	234
IV.4 Limites de l’étude	238
V. CONCLUSION	241
VI. PERSPECTIVES.....	246
VII. BIBLIOGRAPHIE	251
VIII. ANNEXES.....	286
ANNEXE 1: MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE: ARTICLE I.....	287
ANNEXE 2 : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE : ARTICLE III.....	292
ANNEXE 3: MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE: ARTICLE III.....	293
ANNEXE 4: MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE: ARTICLE IV	294
ANNEXE 5: ARTICLE V.....	298

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau 1: Liste des lignées phylogénétiques de <i>Listeria monocytogenes</i> avec les sérotypes et leurs caractéristiques. Adapté de (Orsi, den Bakker et al. 2011).....	21
Tableau 2: Schématisation des étapes d’abattage avec les différents aspects hygiéniques de chaque étape et les mesures préventives suggérées. Application du système HACCP sur ces étapes d’abattage. Reprise de Borch, Nesbakken et al. (1996).....	32
Tableau 3: Liste des désinfectants les plus communs en industrie agroalimentaire avec leurs avantages et inconvénients. Tableau adapté de Wirtanen and Salo (2003).	46
Tableau 4: Exemples de phénotype exprimés par les bactéries lors des phénomènes de compétition. Tableau adapté de Ghoul and Mitri (2016).....	59
Tableau 5: Description des niveaux de priorités des aliments tels qu’établis par Santé Canada.	66
Tableau 6: Tableau regroupant les différentes caractéristiques des aliments PAM permettant ou pas la prolifération de <i>L. monocytogenes</i> pendant la durée de conservation de ces aliments. Adapté de (Canada 2011).....	68

Matériel et méthode

Article I

Table 1 : Distribution of <i>Listeria monocytogenes</i> -positive samples in four slaughterhouses in Québec, between October 2013 and February 2015.....	122
Table 2: Distribution of <i>Listeria monocytogenes</i> serotypes in the four slaughterhouses under study.....	124
Table 3: Number of <i>Listeria monocytogenes</i> -positive samples and distribution of persistent pulsotypes among slaughterhouses and operation areas. Odds ratios from multi-level multivariable logistic regression analysis are used to present the associations.	125

Article III

Table 4 : Strain origin and pulsotype (as determined by CDC PulseNet PFGE protocol) of isolates obtained during monitoring sampling of an industrial slaughterhouse over a four weeks period. 188

Table 5 : Composition of the annotated high impact SNVs in the persistent groups A (table A) and B (table B) in *Listeria monocytogenes* strains isolated from an industrial slaughterhouse over four weeks with their position and the altered nucleotide according to the references of the respective persistent groups. 193

Table 6 : In silico and phenotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains from group A, B, and C isolated from an industrial slaughterhouse over a four weeks or three years (for Lis8216) period; In silico identification of determinants for persistence. Phenotypic determination of resistance to BC in *L. monocytogenes* strains isolated: Minimal inhibitory concentrations of all isolates. PCR screening test to identify the *bcrABC* cassette in the studied strains. 198

Article IV

Table 7 : Bacteriological detection of *L. monocytogenes* on a slaughterhouse conveyor surfaces after cleaning and sanitation. Results were shown according to the four sampling periods with one year between sp1 and sp2 and one month (for sp2, sp3 and sp4) of interval between each period. 208

Table 8 : Pairwise Permanova analysis based on Bray-Curtis and Jaccard distance matrices with 999 permutations. Pseudo-F test was used to compare the four sampling periods..... 209

Liste des figures

Revue de littérature

Figure 1 : Schématisation du cycle infectieux de la listériose. Image reprise de Vazquez-Boland, Kryptou et al. (2017).....	31
Figure 2 : Schématisation des différents récepteurs des cellules de l'hôte reconnus par <i>L. monocytogenes</i> . Image reprise de Pizarro-Cerda and Cossart (2018)	33
Figure 3 : Schématisation des processus infectieux de <i>Listeria monocytogenes</i> à l'intérieur d'une cellule de l'hôte et les facteurs de virulence impliqués dans la survie, l'échappement de la vacuole et du système immunitaire de l'hôte. Image reprise de Pizarro-Cerda and Cossart (2018).....	35
Figure 4 : Nombre de cas et Taux par 100 000 des cas signalés de maladies au fil du temps au Canada, groupés par maladie. Maladies à déclaration obligatoire en direct, Agence de la Santé Publique du Canada	40
Figure 5 : Organisation phylogénétique des lignées de <i>Listeria monocytogenes</i> (Bergholz, Shah et al. 2018)	47
Figure 6 : Analyse phylogénétique des isolats cliniques de <i>L. monocytogenes</i> obtenus entre 1988 et 2010 au Canada. Image reprise de Knabel, Reimer et al. (2012)	49
Figure 7 : Fréquence relative des complexes clonaux avant et à partir de l'année 2000. Résumé de dix études (Bergholz, Shah et al. 2018).	50
Figure 8 : Famille des internalines identifiées dans la souche de référence de <i>L. monocytogenes</i> EGD-e. A) représentation des internalines avec un site d'ancrage LPXTG (I), un module GW (II) ou des internalines secrétées (III) (Bierne, Sabet et al. 2007).	52
Figure 9 : Schématisation des étapes de formation du biofilm (Veerachamy, Yarlagadda et al. 2014).....	62
Figure 10 : Organisation du biofilm de <i>L. monocytogenes</i> . A) Structure en nid d'abeille du biofilm de <i>L. monocytogenes</i> sur une surface de polystyrène observé par microscope à balayage (Marsh, Luo et al. 2003). B) structure en couches multicellulaires du biofilm de de <i>L. monocytogenes</i> cultivé en condition statique reprise de Rieu, Briandet et al. (2008).	63
Figure 11 : Schématisation du système microfluidique. A) Image représentant le système microfluidique, le Bioflux. B) Représentation schématique d'une plaque de 48 puits. C)	

Schématisation du système microfluidique montrant le développement d'un biofilm. D) Image représentant les chambres de cultures avec les puits contenant le milieu de culture propre d'un côté et du milieu utilisé de l'autre côté du serpent. 65

Figure 12 : Schématisation du mécanisme d'action des QACs sur les bactéries (Jennings, Minbiole et al.2015)..... 72

Figure 13 : Schématisation des familles de pompes à efflux présentes chez les bactéries Gram positif et négatif (AIRES 2011). 74

Figure 14 : Représentation des exemples de symbiose entre deux espèces bactériennes, le flagelle de *P. thermopropionicum* adhère à *M. thermautotrophicus* (A) pour faciliter les échanges de gaz H₂ entre les deux microorganismes. De plus, la protéine FlipD se situant à la surface du flagelle de *P. thermopropionicum* stimule le processus de méthanogénèse par la bactérie *M. thermautotrophicus* (B). La bactérie motile *C. aggregatum* est entouré d'un épibionte non mobile (C). Une interaction entre *Pseudomonas putida* (en vert) qui croit au-dessus de la bactérie *Acinetobacter* sp souche C6 (en rouge) à partir de laquelle elle reçoit des métabolites (D). Figure et légende reprises et adaptées de Marx et al (Marx 2009). 79

Figure 15 : Modélisation des conditions conduisant à l'acquisition ou l'expression d'une compétition entre des espèces bactériennes. Image reprise de Ghoul et al 2016 (Ghoul and Mitri 2016). 81

Matériels et méthodes

Article I

Figure 16: Representation of number of isolates per pulsotype. The persistent pulsotypes are colored in red. The new pulsotypes (not observed in the PulseNet Canada database prior to discontinuation in favor of whole genome sequencing) are labeled with an asterix. 126

Figure 17 : Dendrogram of PFGE-ApaI (A) and AscI (B) profiles from 58 *L. monocytogenes* pulsotypes. 128

Figure 18 : Venn diagram with the numbers of shared pulsotypes among the four slaughterhouses A, B, C and D. 129

Figure 19 : Pulsotype Diversity of *L. monocytogenes* isolates collected from swine slaughterhouses. A) Pulsotype diversity according to the four seasons. B) Pulsotype diversity

according to two seasons, Fall and Summer. C) Pulsotype diversity according to the slaughterhouses, A, B, C and D. D) Pulsotype diversity according to the slaughterhouses, A, B, C. E) Pulsotype diversity according to the operating area. One characterized isolate per sample was selected randomly, rarefaction curves were produced by the iNEXT package, R v 3.4.1. 130

Figure 20 : Proportion of persistent *Listeria monocytogenes* pulsotypes observed in food and human listeriosis cases from 2000 to 2016 in Quebec according to the database of the Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ). **: $p < 0.01$ 131

Figure 21 : Proportion of persistent *Listeria monocytogenes* pulsotypes harboring both the benzalkonium chloride *bcrABC* resistance cassette and the *emrE* multidrug transporter gene. **: $p < 0.01$ 132

Figure 22 : Proportion of *Listeria monocytogenes* pulsotypes harboring both the benzalkonium chloride *bcrABC* resistance cassette and the *emrE* multidrug transporter gene relative to their origin, the most (yes) vs. the less exposed (No) sites to disinfectants. Significance: N.S: $p > 0.05$ 133

Article II

Figure 23 : biofilm visualization of two strains of *Listeria monocytogenes* – Lm76 and Lm132 – after 24h of incubation at 30°C in microfluidic conditions. Biofilm was grown in BHI medium (left images) and BHI/10 (right images); A) Biofilm stained with Crystal violet 0.1% B) 3D reconstruction of *L. monocytogenes* biofilm stained with live/dead; Syto9 showing live cells in green and Propidium iodide showing dead/damaged cells and e-DNA in red (B). 155

Figure 24 : Composition of dead and live cells in the biofilm of Lm76 and Lm132 strains of *L. monocytogenes* formed in rich medium BHI and diluted medium BHI/10 for 24h; A) individual visualization of live population of the biofilm (left images), dead population (middle image) and the merge of the two images which represents the compilation of all images taken from the top of the biofilm to the bottom and corresponds to the total biomass formed in the biofilm (right image). B) higher magnification (taken with a 100X objective) of Lm76 biofilm grown in the diluted medium BHI/10 showing dead (right image) and live (left image) biomass organization; arrows show filaments mostly present in dead biomass in the biofilm. 157

Figure 25 : biofilm visualization of two strains of *Listeria monocytogenes*: Lm76 and Lm132 after 24h of incubation at 30°C static conditions. Biofilm was grown in BHI medium (right images) and BHI/10 (left images); A) Biofilm stained with Crystal violet 0.1%. B) 3D reconstruction, zoomed images of a view from above of *L. monocytogenes* biofilm stained with live/dead; Syto9 showing live cells in green and Propidium Iodide showing dead/damaged cells and e-DNA in red..... 159

Figure 26 : Biovolume calculation of biofilm formed in microfluidic conditions by *Listeria monocytogenes* Lm76 and Lm132 strains grown in a rich medium BHI and poor medium BHI/10 for 24h at 30°C; A) and B) Total biovolume of biofilm formation by Lm76 and Lm132 strains respectively which corresponds to the some of the live and dead biomass in each biofilm; C) and D) Biovolume of live (green cells) and dead (red cells) biomasses in Lm76 and Lm132 biofilm respectively. * P<0.05 160

Figure 27 : Biovolume calculation of biofilm formed in static conditions by *Listeria monocytogenes* Lm76 and Lm132 strains grown in a rich medium BHI and poor medium BHI/10 for 24h at 30° C; A) and B) Total biovolume of biofilm formation by Lm76 and Lm132 strains Total biovolume of biofilm formation by Lm76 and Lm132 strains respectively which corresponds to some of the live and dead biomass in each biofilm; C) and D) Biovolume of live (green cells) and dead (red cells) biomasses in Lm76 and Lm132 biofilm respectively. * P<0.05 161

Figure 28 : Biofilm of Lm76 and Lm132 grown under BHI or BHI/10 medium as a control (right images) and BHI or BHI/10 containing 100µg/ml of DNase I (left images). All biofilms were stained with Syto9 and PI dyes after 18h with DNase treatment or without treatment. The images show, from the left to the right, biofilm stained with Syto9 and PI without treatment (the two left images) and biofilm stained with Syto9 and PI after DNase treatment to show the decrease of e-DNA and dead/damaged biomass..... 162

Article III

Figure 29 : Phylogeny reconstruction of the persistent groups A, B and the sporadic strains group C isolated from an industrial slaughterhouse over a four weeks period; the tree was based on the cgMLST allelic profile distances. The interactive tree of life (ITOL) was used to visualize the tree (Letunic and Bork 2016). 190

Figure 30 : Minimum spanning tree based on high quality core genome SNV positions identified amongst 6 genomes over 80% of the reference genome for the group A (2A), and amongst 19 genomes over 80% of the reference genome for the group B (2B). The visualization of the MST was done using GrapeTree (Zhou, Alikhan et al. 2017)..... 191

Figure 31 : Number of SNVs in *Listeria monocytogenes* isolates isolated from an industrial slaughterhouse over four weeks according to their annotations and function predictions using the snpEff in the persistent groups A and B. All the inferred functions to the known bacteriophage proteins were grouped in “Bacteriophage proteins”, all hypothetical proteins were grouped in one cluster, and the other affected functions related to the backbone genome of *L. monocytogenes* were grouped. 192

Figure 32 : Phylogenetic distribution of the resistance genes bcrABC and stress response genes (ssi-1) in *Listeria monocytogenes* strains isolated from an industrial slaughterhouse over four weeks; the presence-absence heatmap of the bcrABC and ssi-1 in the persistent and sporadic groups are shown in orange when present and blue when absent..... 196

Figure 33 : Multiple sequence alignment of the bcrABC genes (accession number JX023284.1) and pLM80 cont 507 (accession number: AADR01000010) with a large plasmid identified in in persistent group B as shown in selected strain p964 (p964) and in a closely related strain Lis8316, isolated three years after the isolation of the rest group B strains. 198

Figure 34 : Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* strains from persistent groups A, B and sporadic group C isolated from a pig slaughterhouse at three or four visits (for group B). A) comparison of biofilm formation ability between the group A, B and C in the absence of BC. B) comparison of biofilm formation ability between the group A, B and C in the presence of BC. C) Effect of BC at 3.125 and 0.78 ppm on biofilm formation capacity of persistent strains from the group A and B and the sporadic strains C. Significance, n.s: non-significant, **** : p<0.0001, *** : p=0.0014..... 199

Article IV

Figure 35 : Violin box plot representation of alpha diversity of bacterial community from cutting facility conveyor-surface. a) Diversity was measured by Shannon index and its evenness according to the sampling periods. b) Diversity was measured by Shannon index and its evenness according to positive samples to *Listeria monocytogenes*. For sampling period

category, significance: p-values: *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. For PositiveToLmonocytogenes category, Wilcoxon test was used to compare means. Significance: p -not significant (n.s) when: $p > 0.05$ 224

Figure 36 : Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of Bray-Curtis and Jaccard distances of bacteria community identified using 16s Miseq sequencing technology on samples isolated from cutting facility conveyor-surfaces according to sampling period (a and b) and samples positive to *Listeria monocytogenes* in culture-based method (c and d). For sampling.period category, pairwise permanova with 999 permutations (using pseudo-F ratios) was used to compare between sampling periods. For PositiveToLmonocytogenes category, analysis of variance was performed using distance matrices of beta diversities indices (Bray-Curtis and Jaccard). 226

Figure 37 : Relative frequency of different taxonomic profiles identified from cutting-facility conveyors surfaces. a) Relative abundance of the top ten phyla, all phyla with relative abundance inferior to 1% were grouped into “others” group. b) Relative abundance of the top twenty genus according to the sampling periods. c) Relative abundance of the top twenty genus according to the presence (pos) and absence (neg) of *L. monocytogenes*. 228

Figure 38 : Network construction based on spearman, Pearson correlations and Bray-Curtis, Kulback-Liebler dissimilarities and mutual information of bacterial community at genus level. a) General network of all positive interactions (co-presence) between communities, clustered according to modularity class (communities sharing most links between each other), the size of each node referred to the number of degrees (links). b) Negative interaction (mutual exclusion) of all bacterial communities. 229

Figure 39 : Network representation of interaction between *Listeria* genus and other bacterial communities identified from meat conveyor surfaces. a) Positive interaction of bacterial communities in *Listeria* genus network. b) Negative interaction between *Listeria* genus and other bacteria. The size of nodes refers to the relative abundance of the genus. Node color refer to the module (community) to which bacteria belong. 231

Liste des abréviations

ABC: ATP binding cassette
ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments
ActA: Actin assembly-inducing protein
ADN-e: ADN extracellulaire
BC: Benzalkonium Chloride
BPF: Bonnes pratiques de fabrication
C1q : Complement component
CC: Clonal Complex
CDC: Centers for Disease and Prevention
cgMLST: core genome multi locus sequence typing
Cbl: Ubiquitin ligase
EFSA: European Food Safety Authority
ÉU: États-Unis
FcγR1a:Fc gamma receptor
FpbA :(fibronectin binding protein A)
gC1qR:gC1q receptor
HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point
HGF: Hépatocyte Growth Factor
Hpt: Hexoses phosphate
InlA:Internalin A
InlB: Internalin B
InlC: Internalin C
Lde: *Listeria* drug efflux
LLO: Listeriolysin O
LLS:Listeriolysin S
LNM: Laboratoire national de microbiologie
LRRs: Leucine rich repeat
LSPQ: Laboratoire de santé publique du Québec
Mdr L: Multidrug resistance *Listeria*
MDR: multidrug resistance

Met: mesenchymal-epithelial transition factor

MLST: multi locus sequence typingmulti locus sequence typing

MpL: Metalloprotéase L

MVLST: multi virulence locus sequence typing

OMS: Organisation mondiale de la santé

PAM: produits prêt-à-manger

PFGE: Pulsed field Gel Electrophoresis

PlcA: Phospholipase A

PlcB: Phospholipase B

QACs: Quaternary ammonium compounds Composés (« Composés d'ammonium quaternaires »)

RND: Resistance nodulation division

ST: Sequence Type

UFC: Colony forming unit (« Unité Formant Colonie »)

Vip:Virulence protein

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, parmi eux :

Mon directeur de thèse, Dr Philippe Fravalo, pour ton soutien et ta disponibilité durant toutes ces années. Merci d'avoir été présent tout au long de ce parcours. Je te remercie également pour toute la confiance que tu m'as accordée pour mener à bien ce projet, je crois profondément que cela m'a permis de découvrir à la fois mes points forts et faibles.

Mon co-directeur, Dr Sylvain Quessy, merci pour ta confiance et ta disponibilité. Je garderai en mémoire tes qualités humaines, tes conseils n'ont jamais fait défaut et m'ont permis d'avancer de façon très efficace.

Dre Julie Arsenault, pour ta grande implication dans ce projet de thèse. Sache que ta rigueur scientifique et qualités d'enseignement sont d'une très grande inspiration pour moi, merci pour tous tes conseils tant précieux.

Je remercie nos collaborateurs de Santé Canada, Kevin Tyler, Karine Hébert et Dr Franco Pagotto pour toute votre implication dans ce projet de thèse et merci pour tout le temps que vous avez pris pour répondre à mes questionnements.

Aux membres et anciens membres de la CRSV, Nicole, Sophie, Christine, Virginie, Alexandre, je vous remercie infiniment pour votre présence tant réconfortante durant toutes ces années.

Ce projet n'aurait pas vu le jour sans le financement du CRSNG et des industries. Je remercie également le CRIPA et le GRESA pour les bourses qu'ils m'ont accordées durant ces dernières années.

Ma famille, merci pour vos encouragements et votre soutien inconditionnel.

Enfin, à mon cher mari, Kamel, c'est avec une grande et sincère émotion que je t'écris ces quelques lignes. Je te serai éternellement reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour que ce jour puisse arriver. Merci pour ton soutien tant affectif que moral tout au long de ces années.

Mes enfants, Ania et Yani d'amour, vous qui ne demandez rien d'autre que ma présence auprès de vous. Une présence que je n'ai pas su assurer à bien des reprises, j'espère que vous me pardonneriez mes petits amours.

I. Introduction

Retrouvée dans plusieurs environnements naturels, mais aussi dans l'environnement des industries agroalimentaires, *Listeria monocytogenes* est un pathogène alimentaire pouvant causer la listériose, une maladie rare, mais avec un taux de mortalité très élevé particulièrement pour des groupes à risques (de Noordhout, Devleeschauwer et al. 2014). L'importance de ce pathogène a été mise en exergue dans plusieurs cas d'épidémies ayant causé la mort de nombreuses personnes au Canada et ailleurs ces dernières années (Maury, Tsai et al. 2016). L'une des raisons qui expliquent la faculté de cette bactérie à causer ces infections d'origine alimentaire est qu'elle possède une grande tolérance aux conditions difficiles pour d'autres bactéries et peut croître à basse température, en présence importante de sel et dans un milieu acide (Bergholz, Shah et al. 2018). Ceci contribue à faire d'elle une bactérie difficile à éliminer de l'environnement des industries alimentaires.

Il existe de plus en plus de preuves que les souches de *L. monocytogenes* responsables de cas groupés ou sporadiques de listériose invasive possèdent un ou plusieurs facteurs de virulence spécifiques (Radoshevich and Cossart 2018). De plus, des facteurs reliés à la survie et à la persistance dans l'environnement ainsi qu'à la susceptibilité de l'hôte peuvent contribuer à l'occurrence de l'infection (Orsi, Borowsky et al. 2008, Vazquez-Boland, Kryptou et al. 2017, Radoshevich and Cossart 2018). En effet, la capacité de *L. monocytogenes* à persister dans l'environnement des industries agroalimentaires a été rapportée dans plusieurs études (Orsi, Borowsky et al. 2008, Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014). Cette persistance peut aller jusqu'à plusieurs années, malgré le nettoyage et la désinfection (Orsi, Borowsky et al. 2008).

Les causes et mécanismes conduisant à la persistance de *L. monocytogenes* peuvent être divers et ont déjà fait l'objet de plusieurs études. Ces mécanismes seraient liés 1) à la capacité de la bactérie de former un biofilm, ce qui constitue une barrière physique contre les désinfectants industriels, 2) à l'acquisition de gènes de résistance aux désinfectants et/ou 3) à la cooccurrence avec d'autres bactéries sous forme de biofilms mixtes (Fagerlund, Møretro et al. 2017). L'importance de la formation de biofilm dans la persistance apparaît cruciale. En effet, différentes études suggèrent que le biofilm de *L. monocytogenes* lui permet de survivre dans l'environnement de production, de coloniser les surfaces de production, de résister aux

désinfectants (Ferreira, Wiedmann et al. 2014, Wang, Ray et al. 2015, Buchanan, Gorris et al. 2017). En revanche, on ne connaît que très peu les mécanismes reliant la production de biofilm et la persistance. En effet, si plusieurs études ont réussi à démontrer que des souches de *L. monocytogenes* forment plus de biofilm soit par une plus forte adhésion aux surfaces ou par la production d'une plus forte biomasse (Lunden, Miettinen et al. 2000, Borucki, Peppin et al. 2003, Møretrø and Langsrud 2004), d'autres n'ont pas pu trouver de différence dans la capacité à former le biofilm entre les souches persistantes et celles qui sont transitoires (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Nilsson, Ross et al. 2011, Costa, Bertolotti et al. 2016, Koreňová, ORAVCOVÁ et al. 2016).

Par ailleurs, d'autres études indiquent qu'un autre déterminant pourrait participer à cette persistance : la résistance aux désinfectants couramment employés en production alimentaire. Toutefois, les mécanismes sous-jacents impliqués dans ce phénomène restent là encore mal connus.

Les nouvelles méthodes de séquençage de génomes entiers des isolats et de caractérisation de la composition d'écosystèmes microbiens permettent d'envisager l'étude de ce phénomène de persistance chez *L. monocytogenes*. Ainsi, il est possible de mieux étudier les contributions relatives de différents genres microbiens à l'établissement du biofilm de *L. monocytogenes* et en particulier de préciser le phénomène de co-occurrence. Bien que certains chercheurs aient commencé à étudier ce phénomène (Fox, Solomon et al. 2014, Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretrø et al. 2017, Heir, Møretrø et al. 2018), très peu d'études, une seule à notre connaissance, a envisagé l'ensemble du microbiote des surfaces de production (Fox, Solomon et al. 2014) pour établir un lien avec la présence de *Listeria*, considérée au niveau du genre. L'étude du comportement de souches de *Listeria monocytogenes* dans des conditions de co-culture, donc basées sur la sélection différentielle des espèces sur des milieux sélectifs n'est que peu représentative des conditions auxquelles *L. monocytogenes* est soumise dans les environnements de production. Il devient donc impératif d'étudier, idéalement à partir d'échantillonnages *in situ*, les interactions entre les genres bactériens, incluant les composantes de l'environnement, pour mieux comprendre le phénomène de persistance.

Le contrôle des bactéries pathogènes repose en premier lieu sur une compréhension de l'épidémiologie de celles-ci dans une perspective de la ferme à la table. Or, très peu d'études, particulièrement aucune au Canada, ne se sont penchées sur la contribution de la contamination issue de la production primaire ou transformation primaire (animal sur pied et carcasse/pièces de découpe) à la contamination et la distribution de *L. monocytogenes* lors des différentes étapes de transformation des viandes. Tout en permettant potentiellement l'identification de meilleurs moyens de contrôle du pathogène en amont de la chaîne de production, ce type d'étude peut aussi nous permettre de caractériser les souches aux différentes étapes du processus et d'identifier les déterminants (facteurs environnementaux ou gènes) qui permettent la survie et donc, d'avancer vers une meilleure compréhension de l'importance du phénomène de persistance dans l'épidémiologie de la bactérie en industrie agroalimentaire.

L'hypothèse à la base de ce projet est qu'il existe des déterminants génétiques reliés à la persistance des souches de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires qui leur donnent un avantage dans la perspective de la contamination du produit et ultimement leur permettent de jouer un rôle dans l'exposition de l'Homme.

C'est dans ce contexte que ce projet s'inscrit. Les objectifs de cette thèse étaient donc 1) d'étudier la prévalence, la distribution, la diversité et la persistance des souches de *L. monocytogenes* dans les différentes étapes de transformation primaire du porc au Québec, 2) de procéder à la caractérisation des souches en lien avec la persistance, incluant la production de biofilm, la résistance aux désinfectants et l'association entre la persistance des souches et la détection des profils PFGE de ces souches dans les isolats d'aliments et des cas de listériose humaine et 3) de caractériser le microbiote des surfaces de production et l'association de ses composantes avec *Listeria monocytogenes*, pour mieux comprendre l'importance du phénomène de cooccurrence bactérienne dans le phénomène de persistance.

II. Revue de littérature

II.1 La listériose

II.1.1 Définition

La listériose est une maladie le plus souvent d'origine alimentaire causée par les espèces pathogènes appartenant au genre *Listeria*. Jusqu'à présent, seules les espèces *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* et occasionnellement des isolats atypiques de *L. innocua* (Moura, Disson et al. 2019) ont été impliquées. La première étant responsable de la très grande majorité des cas humains, nous allons concentrer cette recension de la littérature uniquement sur cette espèce, cible de notre recherche. La gravité de la maladie varie selon le groupe de personnes infectées, elle peut aller d'un syndrome pseudo grippal à une infection systémique pouvant atteindre plusieurs organes tels que les reins, le foie, le sang et le système nerveux central.

C'est une maladie relativement rare parmi les toxi-infections alimentaires cependant, comme les conséquences sur la santé de l'Homme sont particulièrement importantes, c'est une infection qui a généré un intérêt majeur en santé publique et pour l'industrie agroalimentaire. En effet les taux d'hospitalisation et de mortalité reliés à cette toxi-infection sont les plus élevés dans les pays occidentaux avec une létalité pouvant atteindre 9 cas par million d'habitants et par an (Scallan, Hoekstra et al. 2011, de Noordhout, Devleeschauwer et al. 2014).

II.1.2 Historique

Contrairement aux autres toxi-infections alimentaires telles que les salmonellose, shigellose et yersiniose, la listériose n'a pas été nommée tout de suite après la découverte de l'agent pathogène incriminé (Seeliger 1988). *Bacterium monocytogenes* fut la première désignation de cette bactérie découverte par Murray, Webb et al. (1926) après une enquête approfondie lors d'une épidémie touchant les animaux de laboratoire (lapins et cochon d'Inde) à Cambridge (Dworkin 2006). D'autres désignations ont suivi avant que Pirie (Pirie 1927) ne propose le nom *Listeria* en l'honneur du Dr Lister qui a découvert l'antisepsie.

La listériose fut appelée longtemps *Listerella* avant la désignation actuelle de la maladie (listériose) ne fasse partie de l'usage général (Seeliger 1988). Après sa caractérisation, la listériose a été longtemps observée chez les ruminants et les animaux domestiques, y causant des épidémies, mais elle était rarement décrite chez les humains. Une souche de *L. monocytogenes* isolée d'un cas humain a été déposée à l'institut Pasteur en 1921 (Dumont and Cotoni 1921). Par la suite, la bactérie a été isolée à partir d'autres cas humains en 1937 tel que rapporté dans de précédentes revues (Seeliger 1988, Hof 2003). Cependant, ces épisodes n'ont pas suffisamment suscité l'intérêt de la communauté scientifique pour considérer *L. monocytogenes* comme un pathogène important en santé humaine (Hof 2003).

Il a fallu attendre jusqu'à 1949 pour que les scientifiques ne s'intéressent à ce pathogène alors qu'il a causé une importante épidémie de listériose chez des nouveaux-nés en Allemagne. C'est un jeune bactériologiste, J. Potel qui isole *L. monocytogenes* à partir de différents organes de 85 nouveau-nés ou mort-nés (Reiss, Potel et al. 1951) décrivant la listériose comme étant une granulomatose infantisepique. Dans la même période, des infections périnatales ont été observées et étudiées par H.P.R Seeliger. À partir de cette période, une nouvelle ère de recherche sur la listériose a débuté.

Selon les chercheurs de l'époque qui se sont intéressés à *Listeria monocytogenes*, cette bactérie a été considérée comme zoophilique puisqu'elle a été observée chez plusieurs espèces animales et qu'elle survit aussi bien dans les sangs chauds ou froids des animaux (Gray and Killinger 1966, Ralovich 1984). Cependant cette description ne tenait pas compte d'autres caractéristiques physico-chimiques de *L. monocytogenes* telles que sa capacité à croître à basse température (en dessous de 4°C) et à sa tolérance à de fortes concentrations en sel (jusqu'à 10%) (Seeliger 1988). En regard de ces caractéristiques, *L. monocytogenes* a longtemps été considérée comme étant une bactérie du sol (Seeliger 1988). Elle a été isolée à partir de tous les types de sols dans différents environnements naturels ou ceux entourant les humains et animaux.

La source de contamination des humains par *L. monocytogenes* a longtemps été obscure (contamination tellurique ou par contact direct avec un animal infecté) jusqu'à ce qu'une

enquête plus exhaustive soit réalisée lors d'une large épidémie de listériose. Cette épidémie, circonscrite géographiquement à Halifax (Canada), impliqua 34 cas (des femmes et des nouveau-nés), avec 47% de fatalité. C'est de cette façon que pour la première fois un aliment : une salade de choux, a été incriminé dans la survenue d'une listériose (Schlech III, Lavigne et al. 1983). C'est aussi cette épidémie qui a donné naissance au critère microbiologique de 100 CFU/g qui est utilisé dans le *Codex alimentarius*.

Depuis, l'association très régulière de cas (particulièrement dans les contextes épidémiques) avec un aliment source confirme sans équivoque la maladie comme une zoonose très majoritairement alimentaire (Scallan, Hoekstra et al. 2011, Buchanan, Gorris et al. 2017, Salama, Embarek et al. 2018).

II.1.3 Pathogénie chez l'Homme

Deux principaux syndromes sont décrits dans la littérature suite à l'exposition au microorganisme : un syndrome qui reste confiné au tractus intestinal et à ses nœuds lymphatiques, appelé forme non invasive, et un syndrome qui implique une dissémination systémique, la listériose invasive (Figure 1). Dans les deux cas, les premières étapes de l'infection font suite à l'ingestion d'aliments contaminés et sont les mêmes : entrée par voie orale, survie aux conditions acides dans l'estomac, attachement à des récepteurs situés sur les cellules intestinales et dans d'autres cellules, l'E-cadherin et le récepteur Met qui est le récepteur de l'*hepatocyte growth factor* (HGF) et enfin multiplication à l'échelle des cellules de l'hôte (Vazquez-Boland, Kuhn et al. 2001).

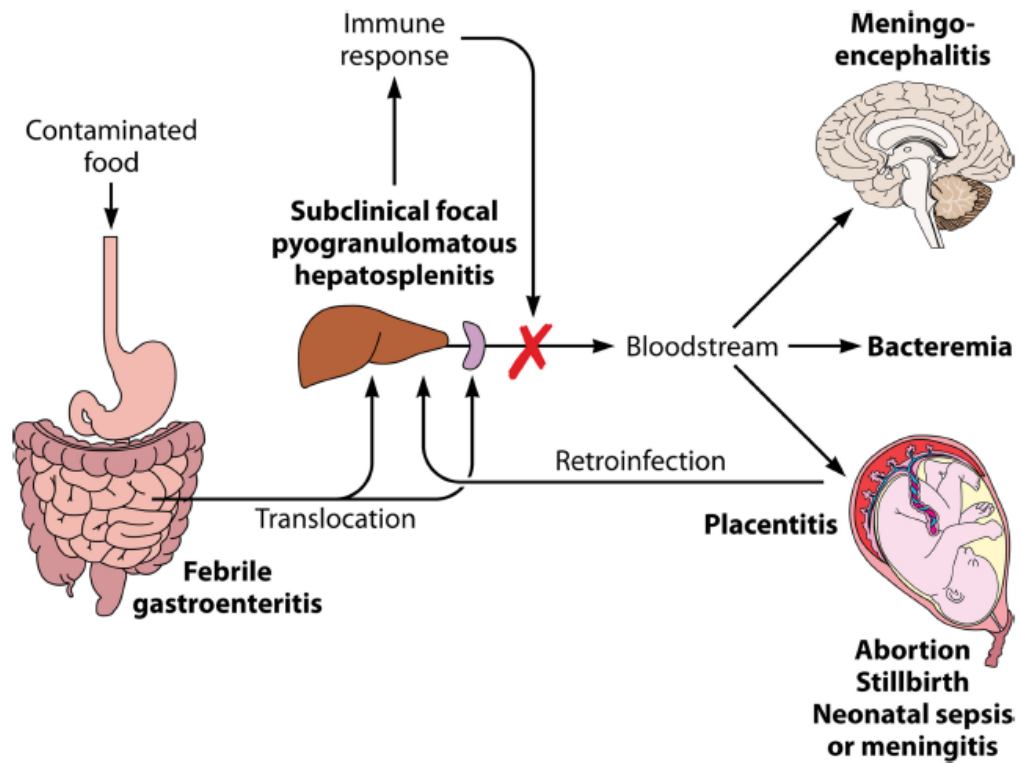


Figure 1 : Schématisation du cycle infectieux de la listériose. Image reprise de Vazquez-Boland, Kryptou et al. (2017)

II.1.4 Cycle infectieux de la listériose et facteurs de virulence

Dans le cas de la forme non invasive, suite à la consommation d'aliments contaminés par *L. monocytogenes*, cette dernière réussit à échapper à l'acidité de l'estomac grâce à une enzyme, la glutamate décarboxylase, dont l'activité permet de confiner les protons à l'extérieur de la bactérie (Cotter, Gahan et al. 2001).

II.1.4.1 Internalisation de la bactérie

La bactérie réussit à entrer dans la cellule grâce aux internalines A et B (InlA et InlB), qui permettent l'internalisation de la bactérie dans une vacuole grâce à l'interaction entre ces protéines et des récepteurs membranaires eucaryotes : E-cadhérine et Met respectivement (Pizarro-Cerdá, Kühbacher et al. 2012). Ces récepteurs peuvent se retrouver sur plusieurs types de cellules non phagocytaires telles les cellules en gobelet et les trophoblastes ou des cellules phagocytaires telles que les monocytes (Pizarro-Cerda and Cossart 2018).

La protéine de surface de *L. monocytogenes*, l'InlA, interagit par son dernier domaine riche en leucine (LRRs) avec l'E-cadhérine au niveau des cellules non phagocytaires. Cette interaction va conduire à la phosphorylation et à l'ubiquitination du domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine par la kinase Src et l'ubiquitine ligase Hakai respectivement (Figure 2). L'autre protéine de surface de *L. monocytogenes*, l'InlB, va quant à elle, interagir avec le récepteur d'une partie du complément C1q (gC1qR) et avec les glycosaminoglycanes via la partie C-terminale de l'InlB après sa solubilisation ce qui va permettre l'interaction entre la partie N-terminal de l'InlB riche en LRRs avec le récepteur tyrosine kinase Met et une dimérisation de ce dernier va s'enclencher. Cette interaction va conduire également au recrutement de l'ubiquitine ligase Cbl, responsable de l'ubiquitination de la partie cytoplasmique du récepteur Met (Figure 2). Une internalisation de *L. monocytogenes* dans les monocytes et les fibroblastes via une interaction avec le récepteur Fc-gamma (FcγR1a) est documentée (Figure 2), cependant l'élément avec lequel ce récepteur interagit avec la bactérie reste à découvrir (Radoshevich and Cossart 2018).

Les différentes interactions décrites plus haut vont favoriser la polymérisation de l'actine qui est le processus clé de la réorganisation de la membrane cytoplasmique et donc l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules de l'hôte (Pizarro-Cerda and Cossart 2018). La formation de la vacuole d'internalisation correspond à une endocytose clathrine-dépendante suivant une voie de type zipper (Cossart and Veiga 2008).

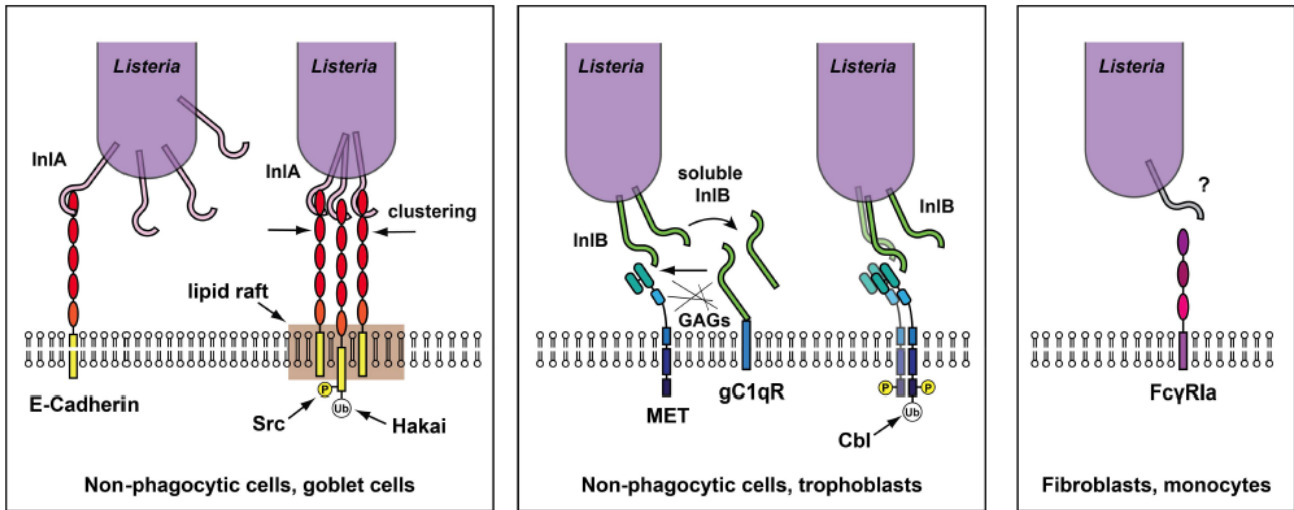


Figure 2 : Schématisation des différents récepteurs des cellules de l'hôte reconnus par *L. monocytogenes*. Image reprise de Pizarro-Cerda and Cossart (2018)

Une fois le cytoplasme atteint, emprisonnée dans la vacuole, la bactérie va s'en échapper par la perméabilisation de sa membrane par le biais de la sécrétion de la listériolysine O (LLO), une toxine responsable de la formation de pores dans la vacuole et avec l'aide des phospholipases (PLC) A et B et des métalloprotéases (Mpl). Bien que le premier rôle décrit de la LLO soit lié à la perméabilisation de la vacuole, des études ont montré que cette toxine est capable de former également des pores dans la membrane plasmique et elle intervient dans la déstabilisation de la composition du cytosol en affectant les mitochondries conduisant à la fragmentation de cette dernière, une étape nécessaire à la survie et la multiplication de *L. monocytogenes* (Hamon, Ribet et al. 2012). D'autres organelles sont aussi affectées par LLO telles que le réticulum endoplasmique, en induisant la réponse au stress de ce dernier (Pillich, Loose et al. 2012), et les lysosomes, cependant les mécanismes d'action sont encore méconnus dans ce cas (Malet, Cossart et al. 2017). La LLO agit aussi sur la sumoylation des protéines, un mécanisme post-traductionnel important permettant aux cellules eucaryotes de modifier rapidement et spécifiquement l'activité des protéines clés à l'intérieur de ces cellules (Ribet, Hamon et al. 2010). Il a été démontré que *L. monocytogenes* agissait sur l'enzyme E3 SUMO,

réduisant sa conjugaison avec d'autres protéines, ce qui favoriserait l'établissement de l'infection (Ribet, Hamon et al. 2010).

À l'échelle du cytoplasme, *L. monocytogenes* va se multiplier en utilisant les hexoses phosphate intracellulaires grâce à des transporteurs d'hexose-6-phosphate (Hpt) et de la lipoate protein ligase (LplA) (Vazquez-Boland, Kuhn et al. 2001, Pizarro-Cerda and Cossart 2018). Elle recrute alors l'actine cellulaire par polymérisation grâce à la protéine ActA (produite de façon polaire sur la bactérie), la formation d'une comète d'actine permet à la bactérie de se propulser vers la périphérie et traverser la paroi cellulaire pour rejoindre les cellules adjacentes. La sécrétion d'internaline C (InlC) lui permet de produire des protrusions en affectant la rigidité du cytosquelette et fragilisant les jonctions apicales des cellules épithéliales pour atteindre la cellule adjacente (Rajabian, Gavicherla et al. 2009). Cette protéine affecte également les signaux du système immunitaire en empêchant la translocation du facteur NF- κ B vers le nucléole (Gouin, Adib-Conquy et al. 2010, Radoshevich and Cossart 2018). Par ailleurs, *L. monocytogenes* induirait la cassure des brins d'ADN en bloquant la réponse au dommage de l'ADN (DDR) via la dégradation du senseur Mre11 en présence de LLO (Samba-Louaka, Pereira et al. 2014). Cette action a pour effet de retarder le cycle cellulaire et cela favoriserait la multiplication de *L. monocytogenes* à l'intérieur de la cellule (Leitão, Catarina Costa et al. 2014).

À l'échelle du nucléole, des protéines sécrétées par *L. monocytogenes* modulent l'activité du système immunitaire de l'hôte. Ainsi, la protéine LntA de *L. monocytogenes* agit au niveau du répresseur de la chromatine BAHD1 en formant un complexe pour activer la transcription des gènes dit « stimulés par l'interféron », nécessaires pour une infection plus efficace et par une multiplication plus importante de la bactérie (Bierne, Tham et al. 2009). Plus récemment, une autre protéine, OrfX a été décrite, qui interagit avec la protéine régulatrice RybP amortissant ainsi, selon l'hypothèse des auteurs, la réponse oxydative dans les macrophages par modulation des réponses transcriptionnelles de l'hôte (Prokop, Gouin et al. 2017).

Ces facteurs de virulence sont régulés par une seule protéine; *protein regulator factor A* (PrfA), laquelle sera activée par la température (Radoshevich and Cossart 2018). Ce même facteur de virulence est régulé par un autre; c'est le facteur sigma (σ^B) qui serait indispensable dans la virulence de *L. monocytogenes* (Nadon, Bowen et al. 2002).

Le rôle de tous ces facteurs de virulence sont illustrés dans la Figure 2.

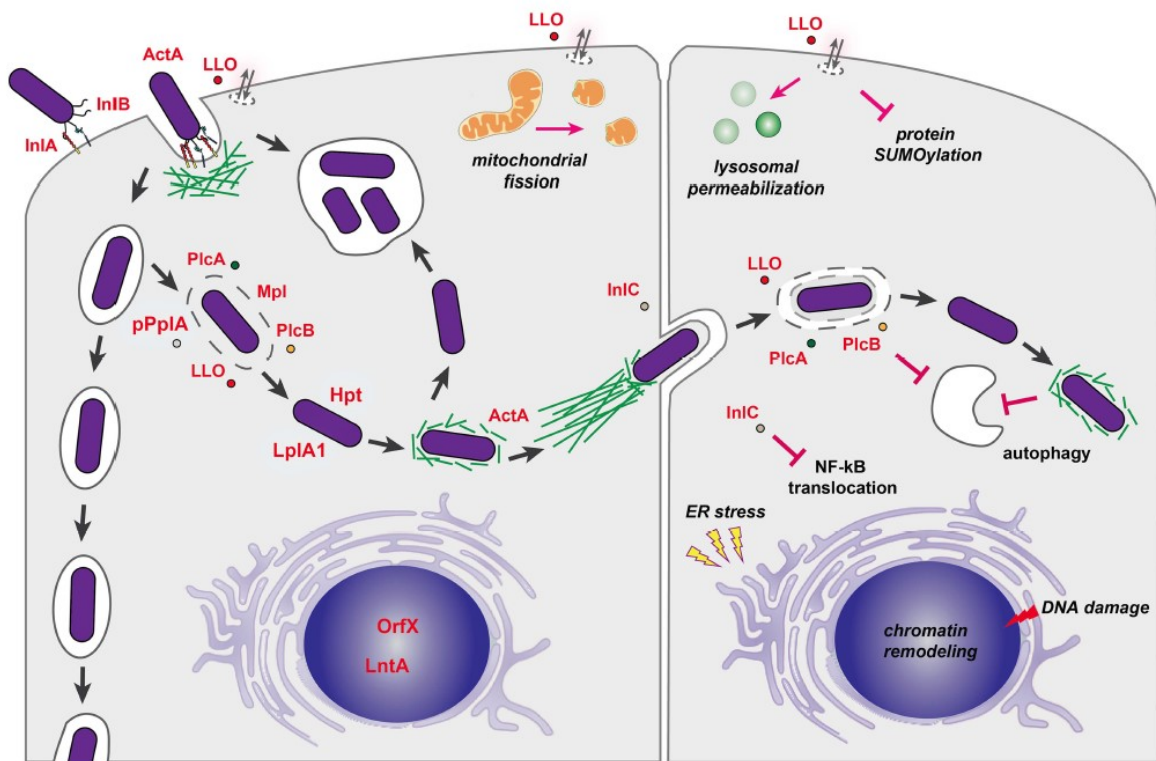


Figure 3 : Schématisation des processus infectieux de *Listeria monocytogenes* à l'intérieur d'une cellule de l'hôte et les facteurs de virulence impliqués dans la survie, l'échappement de la vacuole et du système immunitaire de l'hôte. Image reprise de Pizarro-Cerda and Cossart (2018)

II.1.4.2 Autres facteurs de virulence

Il est à noter qu'alors que tous les facteurs de virulence cités plus haut ont été très bien documentés auparavant, il y a de nouveaux facteurs de virulence qui sont impliqués dans le processus d'infection de *L. monocytogenes* tels que la découverte de la listeriolysin S (LLS) dans des souches épidémiques (Cotter, Draper et al. 2008), laquelle est une hémolysine qui s'apparente à la LLO et est importante pour établir une infection par *L. monocytogenes*.

D'autres facteurs de virulence ont été découverts et qui interviennent principalement dans l'internalisation de la bactérie. Il s'agit de 1) la protéine P60 qui est une protéine de 60 kDa et qui intervient dans la multiplication des bactéries dans la cellule de l'hôte (Wuenscher, Köhler et al. 1993); 2) La protéine Ami et la protéine FpbA (*fibronectin binding protein A*) qui sont des protéines de surface et qui interviennent dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte (Milohanic, Jonquière et al. 2001); 3) Les protéines Vip et Aut sont également des protéines de surface, elles interviendraient dans l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules hôte, ces protéines sont absentes dans les espèces non pathogènes du genre *Listeria* (Cabanès, Dussurget et al. 2004, Cabanès, Sousa et al. 2005).

II.1.5 Listériose invasive

Lorsque la bactérie passe dans la circulation et se propage au foie, au cerveau ou au placenta, on parle alors de la forme invasive de l'infection. Il est bien connu, depuis des décennies, que certains sérotypes (4b) sont plus souvent associés aux formes invasives et/ou aux foyers épidémiques de listériose, ce qui suggère que certaines lignées seraient plus virulentes (Vazquez-Boland, Kuhn et al. 2001). Ce n'est toutefois que récemment que l'on a pu démontrer que certains clones, appartenant au sérotype 4b, possèdent des facteurs de virulence qui expliquent leur tropisme pour certains tissus extra-intestinaux. En effet, des études portant sur la caractérisation génomique des souches impliquées dans des neuro-listérioses ont démontré la présence spécifique de gènes situés sur l'opéron du système de transport et de phosphorylation des sucres *pts* dans un clone appartenant à ce sérotype (Maury, Tsai et al. 2016). Ce système

permet le transport et la phosphorylation des sucres, mais on ignore encore le mécanisme exact par lequel il contribue à ce type d'infection.

L'interaction avec le microbiote intestinal est également une étape clé pour établir une infection par *L. monocytogenes*. Ainsi, il a été démontré récemment que la LLS était excessivement sur-réglée dans l'intestin de modèles animaux (Quereda, Dussurget et al. 2016). Cette protéine qualifiée d'hémolysine auparavant (Cotter, Draper et al. 2008) jouerait également le rôle d'une bactériocine capable d'éliminer certaines espèces bactériennes (telles *Prevotella spp*, *Allobaculum spp* et *Streptococcus spp*), dans le contexte de compétition inter-bactéries d'un modèle d'infection *in vivo* (Quereda, Dussurget et al. 2016).

La période d'incubation de la listériose peut être longue, elle varie de 24 h à 70 jours (Nadon, Bowen et al. 2002, Goulet, King et al. 2013) selon la sévérité des symptômes (gastroentérite vs méningo-encéphalite), ce qui rend son diagnostic à une phase précoce difficile dans le contexte où les symptômes pour cette maladie sont non spécifiques (Awofisayo-Okuyelu, Verlander et al. 2016).

II.1.6 La listériose humaine : Groupes à risque

Bien que la listériose puisse toucher n'importe quel sujet, il y a néanmoins une population qui est plus à risque de contracter la maladie, il s'agit des personnes âgées, immunodéprimées, les femmes enceintes et les enfants de bas âge.

II.1.6.1 Cas des personnes âgées

Une très récente étude en France est considérée comme l'étude la plus complète et plus représentative à l'heure actuelle sur la surveillance de la listériose humaine (Brouwer and van de Beek 2017, Charlier, Perrodeau et al. 2017). Cette étude a été menée sur 818 patients atteints de listériose et elle a montré que les formes les plus graves de listériose, la neurolistériose et la bactériémie, étaient observées principalement chez les personnes âgées avec un âge moyen de

73 et 67 ans, respectivement selon les deux formes de la maladie (Charlier, Perrodeau et al. 2017).

Il a été démontré que le taux de mortalité lié à la bactériémie (46%) était significativement plus élevé que celui lié à la neurolistériose (40 %) (qui se manifeste dans 84 % des cas par une méningo-encéphalite). Ce taux élevé de mortalité est principalement lié à la présence de cancer chez ces sujets, lorsque plusieurs organes sont affectés, ou à une comorbidité décompensée (Charlier, Perrodeau et al. 2017).

II.1.6.2 Cas des femmes enceintes

Dans cette même étude, 80 % des femmes enceintes présentant une listériose invasive subissent des complications fœtales ou néonatales alors que la mort fœtale a été de 24 % (Charlier, Perrodeau et al. 2017). Il est à noter que ce taux de mortalité a été observé depuis longtemps et a été rapporté dans plusieurs études, ce qui fait de la listériose la plus grave infection d'origine alimentaire. Ceci souligne également une incidence stable de cette maladie chez ces sujets (de Noordhout, Devleeschauwer et al. 2014).

II.1.7 Données de listériose dans le monde

La listériose est considérée comme une maladie rare du fait de sa faible incidence. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que la listériose survient entre 0,1 à 10 cas par million d'habitants et par an selon les pays et les régions du monde (O'Msbrien 2018). Cependant, le taux de mortalité de cette maladie est très haut avec 20 à 30 % de mortalité, particulièrement chez les groupes à risque (de Noordhout, Devleeschauwer et al. 2014).

Dans un rapport de l'autorité européenne en sécurité des aliments (EFSA) publié en 2017, le taux de notification de listériose a augmenté significativement entre 2008 et 2016 dans les pays membres, avec une surreprésentation du groupe des personnes âgées (Authority, Prevention et al. 2017). Parmi les produits alimentaires présentant une non-conformité par rapport au critère

Listeria, les poissons, les produits de la pêche et les aliments prêts-à-manger à base de viande sont classés en première ligne avec un niveau de non-conformité de 6.2 % et 2.5 % respectivement (Authority Prevention 2017).

Aux États-Unis (ÉU), le taux de mortalité lié à la listériose était de 21 % entre 2008-2011 et l'incidence moyenne annuelle était de 0.29 cas par 100 000 habitants (Control and Prevention 2013). Toujours dans ce rapport du Centre for disease control and prevention (CDC), les personnes âgées avec une immunodéficience représentent la population la plus touchée, avec 58 % des cas, suivie des femmes enceintes avec 14 %. Le fromage à pâte molle était l'aliment le plus incriminé dans ces éclosions (Control and Prevention 2013).

Enfin, la plus récente et importante épidémie dans le monde est survenue en Afrique du sud avec 1034 cas confirmés, 42 % des cas étaient des nouveau-nés (Salama, Embarek et al. 2018). Le taux de mortalité de 28.6 % est comparable à celui d'autres pays du monde (de Noordhout, Devleeschauwer et al. , Hernandez-Milian and Payeras-Cifre 2014).

II.1.8 Données au Canada

Au Canada, sauf pour le Québec, entre 1995 et 1999 tous les cas de listériose étaient rapportés par les provinces et territoires, à travers le système national de surveillance des maladies à déclaration obligatoire. À partir de l'année 2000, la listériose n'était plus une maladie à déclaration obligatoire au niveau national, bien qu'au niveau des provinces, la maladie reste à déclaration obligatoire. Le Québec ne met en place cette déclaration obligatoire qu'à partir de 2004 (Farber, Kozak et al. 2011). Depuis 2007 jusqu'à présent, seule la listériose invasive est considérée à nouveau comme une maladie à déclaration obligatoire à l'échelle nationale au Canada (ASPC 2018).

L'incidence de listériose au Canada entre 2001 et 2008 a connu une augmentation pour atteindre le taux le plus élevé en 2008 avec 0.7 cas par 100000 habitants, tel que le montre la Figure 4. L'éclosion de listériose la plus grave ayant touché le Canada est celle de 2008, reliée

à la consommation de produits prêts-à-manger à base de viande, elle a été à l'origine de 57 cas avec 23 décès (Farber, Kozak et al. 2011).

Une récente étude estime qu'annuellement au Canada, il y a 247 hospitalisations liées à la listériose et jusqu'à 60 décès (Thomas, Murray et al. 2015). Il est à noter que le nombre de cas de listériose au Canada est relativement faible comparativement aux États-Unis. Cependant, la comparaison apparaît hasardeuse, car les systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire ne sont pas comparables : notamment sur les méthodes d'estimation du nombre d'hospitalisation et de mort et sur la définition de symptômes liés à la maladie (ASPC 2018).

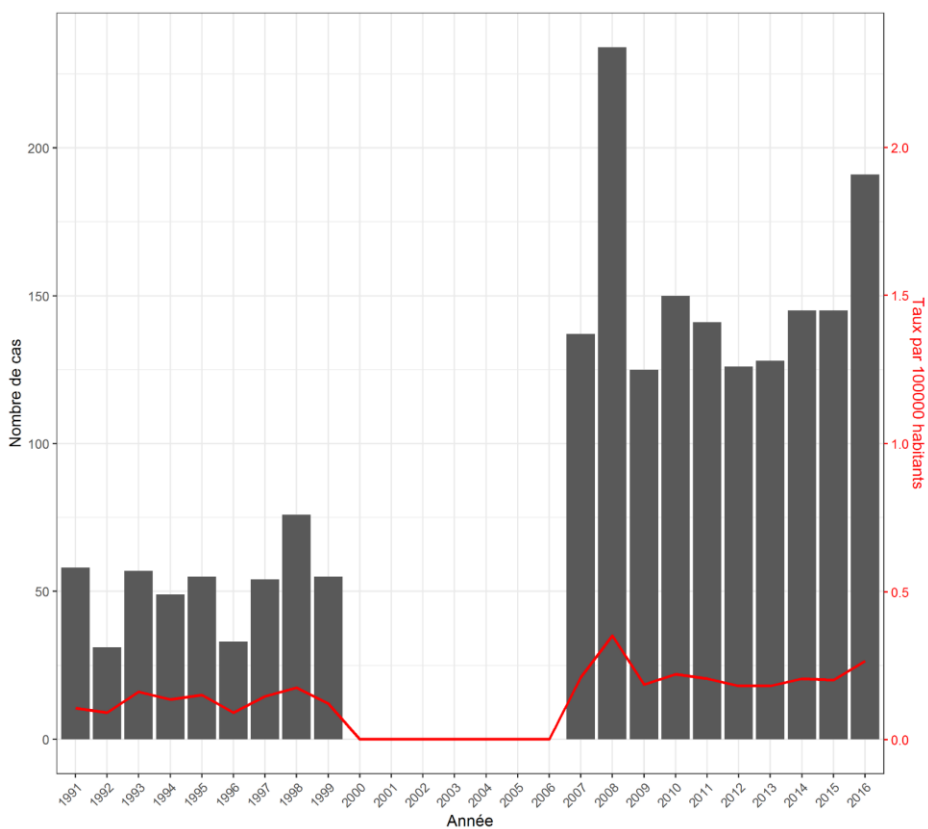


Figure 4 : Nombre de cas et Taux par 100 000 des cas signalés de maladies au fil du temps au Canada, groupés par maladie. Maladies à déclaration obligatoire en direct, Agence de la Santé Publique du Canada

II.2 *Listeria monocytogenes*

II.2.1 Caractéristiques physico-chimiques : la clé de survie dans différents environnements

L. monocytogenes est une bactérie ubiquitaire et le fait qu'elle soit capable de croître dans différents environnements est dû à certaines caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, *L. monocytogenes* fait face à plusieurs conditions de stress depuis son introduction dans la chaîne de production alimentaire jusqu'à sa transmission dans l'hôte (Gurtler, Doyle et al. 2017).

Dans la nature, et notamment dans le sol, *L. monocytogenes* est confrontée à un environnement où les nutriments peuvent être rares et faire l'objet d'une forte pression de compétition par les autres bactéries. D'autres parts, les conditions de température et de pH peuvent être suboptimales et vont également influencer la capacité de cette bactérie à survivre (Gurtler, Doyle et al. 2017). Dans la chaîne alimentaire, les traitements thermiques et le froid, l'acidité, l'augmentation de l'osmolarité et le stress oxydatif que peuvent causer les agents de désinfection vont aussi influencer la capacité de *L. monocytogenes* à survivre dans les matrices alimentaires (Gurtler, Doyle et al. 2017). Pour faire face à tous ces facteurs de stress, *L. monocytogenes* va déclencher une série de réponses plus ou moins spécifiques. Ainsi, quand *L. monocytogenes* est soumise à des températures élevées (45°C), des protéines de choc thermique (HSP) sont fortement induites pour préserver les protéines de la bactérie ou pour détruire les protéines qui sont mal assemblées ou dénaturées (van der Veen, Hain et al. 2007, Van Der Veen, Abee et al. 2009). Un processus semblable a été décrit pour la tolérance aux basses températures (Wemekamp-Kamphuis, Karatzas et al. 2002, Tasara and Stephan 2006, Chan, Boor et al. 2007). En effet, *L. monocytogenes* peut résister au froid à des températures allant à 1°C (Junttila, Niemelä et al. 1988, Ryser and Marth 2007) grâce à des protéines de choc au froid dites cold choc protéines (CSP) qui vont, par le même principe que les HSP (car toutes deux font partie de la famille des protéines chaperonnes), préserver les protéines par repliement (Schmid, Klumpp et al. 2009).

L. monocytogenes tolère des concentrations en sel jusqu'à 1.9 M (Ribeiro and Destro 2014, Shahamat, Seaman et al. 1980) grâce au maintien de l'osmolarité du milieu extérieur environnant directement la bactérie par la synthèse de molécules telles la glycine, bétaïne, proline et la carnitine (Angelidis and Smith 2003; Fraser et al. 2003 ; Gardan et al. 2003a ; Okada et al. 2008 ; Sleator et al. 2003).

Une possible croissance à des pH entre 4 et 5 (pour une activité de l'eau de 0,8) a été aussi rapportée (Ferreira, Barbosa et al. 2011, Parish and Higgins 1989, Petran and Zottola 1989, George and Lund 1992) et ceci grâce à plusieurs systèmes de résistance à l'acidité tels que la F₀-F₁ ATPase, les systèmes Glutamate décarboxylase et Arginine déiminase qui sont responsables des réactions de décarboxylation par captation ions H⁺ et production des ions ammonium (Gurtler, Doyle et al. 2017). Il est à noter également que *L. monocytogenes* est un des rares pathogènes alimentaires à pouvoir survivre à une a_w en dessous de 0,93 (Petran and Zottola 1989, Farber and Addison 1994).

Ces réponses au stress sont également possibles grâce à des régulateurs tels le facteur SigmaB qui intervient dans la régulation de ces réponses au sein de la bactérie (régulon) (Gurtler, Doyle et al. 2017).

II.2.2 Structure phylogénétique de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie Gram positif appartenant à la famille des *Listeriaceae* (Phylum des Firmicutes), au genre *Listeria*. Ce genre comprend actuellement 17 espèces reconnues : *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floldensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* et *Listeria booriae*. Parmi toutes ces espèces, seules *Listeria monocytogenes* et *ivanovii* sont des pathogènes (Orsi and Wiedmann 2016).

La population de *L. monocytogenes* est structurée en quatre lignées phylogénétiques distinctes : lignée de I à IV et un total de 13 sérotypes sont identifiés et distribués au sein de ces différentes lignées comme présentées dans le tableau 1 (Orsi, den Bakker et al. 2011, Haase, Didelot et al. 2014). Il est remarquable que les sérotypes appartenant à la lignée I soient surreprésentés dans les cas de listériose humaine, particulièrement le sérotype 4b (Maury, Tsai et al. 2016, Lee, Chen et al. 2018), alors que les sérotypes de la lignée II sont fréquemment isolés dans l’environnement des industries alimentaires et des aliments. Les sérotypes appartenant aux lignées III et IV sont quant à eux le plus souvent isolés chez les animaux et plus spécifiquement les ruminants (Orsi, den Bakker et al. 2011).

Tableau 1 : Liste des lignées phylogénétiques de *Listeria monocytogenes* avec les sérotypes et leurs caractéristiques. Adapté de (Orsi, den Bakker et al. 2011).

Lignée	Première identification	Sérotype	Caractéristiques génétiques	Distribution
I	Décrit la première fois avec la méthode MLEE [§] (Piffaretti, Kressebuch et al. 1989)	1/2b, 3b, 3c, 4b	Peu de diversité Peu de recombinaison	Surreprésenté dans les isolats de cas de listériose humaine
II	Décrit la première fois avec la méthode MLEE [§] (Piffaretti, Kressebuch et al. 1989)	1/2a, 1/2c, 3a	Plus grande diversité Plus haut niveau de recombinaison	Isolé à partir de différentes sources; surreprésentation dans les aliments et l’environnement naturel
III	Décrit la première fois par analyse partielle de séquence (Rasmussen, Skouboe et al. 1995).	4a, 4b, 4c	Très grande diversité Niveau de recombinaison moyen	La plupart des isolats sont obtenus à partir des ruminants
IV	Décrit la première fois comme une lignée IIIB (Ward, Ducey et al. 2008)	4a, 4b, 4c	Très grande diversité Peu d’isolats sont étudiés	La plupart des isolats sont obtenus à partir des ruminants

§ : Multilocus Enzyme Electrophoresis

II.2.3 Méthode de caractérisation

Le geno-serotypage est une méthode de caractérisation des isolats de *L. monocytogenes* universellement reconnue (Borucki and Call 2003). Elle est basée sur les variations dans l'antigène somatique (O) et flagellaire (H) (Seeliger and Höhne 1979). Les isolats de *L. monocytogenes* étant très clonal (Call, Borucki et al. 2003, Orsi, Borowsky et al. 2008) et ainsi l'évolution clonal est parallèle entre les antigènes O et H avec les gènes de virulence (Vines, Reeves et al. 1992, Ericsson, Unnerstad et al. 2000).

La méthode basée sur l'analyse de restriction du génome par des enzymes par une électrophorèse sur gel en champs pulsé (PFGE) est encore aujourd'hui la méthode de référence pour la caractérisation des souches de *L. monocytogenes*. Cette méthode a été développée par Brosch, Buchrieser et al. (1991) elle est basée sur l'utilisation de deux enzymes de restriction, *ApaI* et *AscI*, qui permettent de générer des profils génétiques, après migration dans un gel d'agarose soumis à des champs pulsés d'orientations variables pour permettre la migration de gros fragments d'ADN. C'est une méthode dont le protocole est standardisé par PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org/>) et elle est utilisée dans de nombreux pays, ce qui permet de comparer les profils des souches en utilisant une base de données unique.

Cependant, avec l'arrivée du séquençage de nouvelle génération ces dernières années, le PFGE commence à être mis de côté au profit de nouvelles méthodes de caractérisation plus discriminantes calquée dans son principe sur le typage par séquençage multilocus (MLST), méthode de typage basée initialement sur le séquençage de 7 gènes de ménage (Ragon, Wirth et al. 2008), mais qui utilise l'information acquise sur le génome conservé (core genome : cg) des souches; c'est le typage cgMLST (Moura, Criscuolo et al. 2016, Moura, Tourdjman et al. 2017) ou sur le genome entier; le wgMLST (Hingston, Chen et al. 2017). Il existe aussi d'autres méthode de caractérisation genomique basée sur soit des mutation ponctuelles tel que la méthode snvphyl (Nadon, Van Walle et al. 2017, Petkau 2017).

II.2.3.1 Principes du typage basé sur le génome

Le principe du typage axé sur le génome est basé sur une première étape qui est le séquençage du génome de la bactérie qui utilise des approches appelées massivement parallèles permettant de séquencer des centaines de milliers de fragments d'ADN simultanément, c'est le séquençage de nouvelle génération. Il existe aujourd'hui plusieurs technologies de séquençages et même si la plateforme de séquençages et la biochimie utilisée diffèrent, la structure reste similaire (Nadon et al. 2017). La première étape consiste en 1) l'extraction de l'ADN; 2) la préparation de la librairie qui consiste en la fragmentation de l'ADN soit par des méthodes mécaniques ou enzymatiques, l'ajout des adaptateurs et des indexes pour l'identification des fragments d'ADN et l'amplification; 3) la préparation du séquençage par la fixation de l'ADN et l'amplification et enfin 4) début de séquençage (Nadon, Van Walle et al. 2017).

La deuxième étape consiste à analyser les données de séquençage. Les fragments d'ADN ainsi séquencés ou appelés communément « reads » seront analysés par des outils bioinformatiques pour enlever les adaptateurs et aussi les fragments de mauvaise qualité seront retirés de la banque de lecture (Nadon, Van Walle et al. 2017). Une étape d'assemblage de ces fragments est nécessaire dans le cas des typages par MLST (wg/cgMLST) qui consiste à placer les fragments séquencés dans le bon ordre. Cet assemblage peut être réalisé en utilisant un génome de référence ou par l'utilisation de la méthode d'assemblage *de novo*.

Le séquençage du génome entier permet pour *L. monocytogenes*, de réaliser le MLST à partir de 1748 gènes dans le cas du cgMLST. Un type core genome est défini comme étant un groupe de souches dont les séquences des 1748 gènes de ménage diffèrent d'au plus 7 allèles (Moura, Criscuolo et al. 2016).

Dans ces deux études, les auteurs ont montré que le cgMLST permettait de décrire une plus grande variabilité génétique au sein d'un complexe clonal (CC) donné (Moura, Criscuolo et al. 2016). Les génotypes obtenus par cette méthode sont souvent regroupés en complexes

clonaux autour des isolats ayant un même type MLST (ST) ou qui diffèrent d'au plus d'un allèle dans un contexte de lien épidémiologique clair entre les souches de *L. monocytogenes* (Knabel, Reimer et al. 2012, Cantinelli, Chenal-Francisque et al. 2013).

II.2.4 Diversité et Distribution spatiotemporelle des souches de *Listeria monocytogenes*

Des études de diversité des souches de *L. monocytogenes* ont montré que les quatre lignées de *L. monocytogenes* sont composées de plusieurs CCs tels que montré dans la Figure 5 (Ragon, Wirth et al. 2008, Haase, Didelot et al. 2014). Des études de phylogénie ont montré que les souches de la lignée I ont un taux de recombinaison homologue très bas comparé à celles de la lignée II (Orsi, den Bakker et al. 2011). Ce fait pourrait appuyer l'hypothèse expliquant la surreprésentation des souches de cette lignée (lignée II) dans l'environnement. En effet, cette hypothèse stipule que les souches de la lignée II ont une meilleure capacité d'adaptation dans l'environnement grâce à l'acquisition de nouveaux éléments génétiques tels que des plasmides contenant des gènes de résistance aux métaux toxiques (Orsi, den Bakker et al. 2011). De manière générale, *L. monocytogenes* est l'une des espèces bactériennes qui a un taux de recombinaison le plus bas et il est, d'ailleurs, bien accepté par la communauté scientifique que le génome de *L. monocytogenes* est très stable (Ragon, Wirth et al. 2008, Orsi, den Bakker et al. 2011, Moura, Criscuolo et al. 2016).

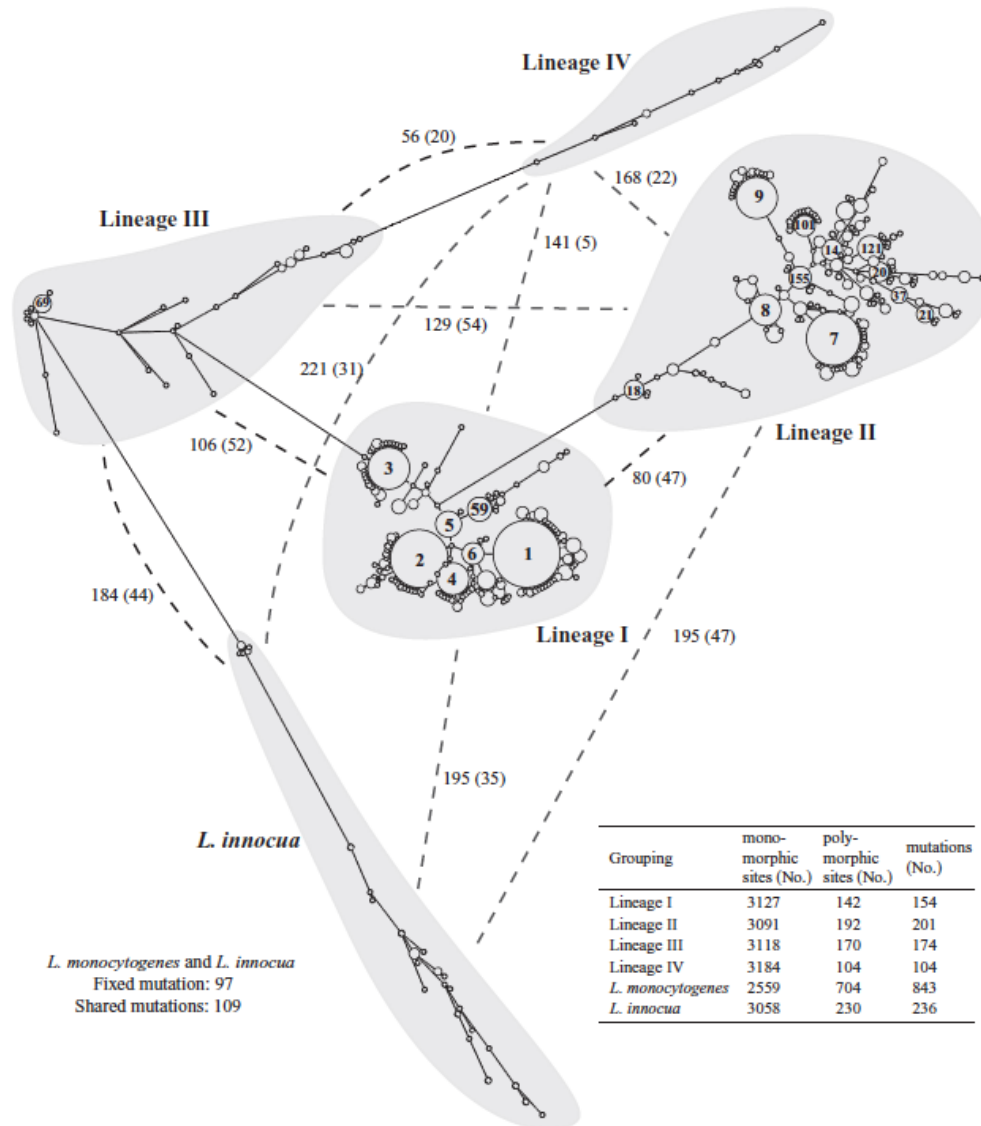


Figure 5 : Organisation phylogénétique des lignées de *Listeria monocytogenes* (Bergholz, Shah et al. 2018)

Les CCs de *L. monocytogenes* sont largement distribués dans l’environnement, les aliments, les animaux et les humains (dans les cas de listériose) et 72 % (sur ~2000 isolats) de ces CCs ne sont pas reliés à une source écologique unique (Haase, Didelot et al. 2014). Cependant, la distribution de ces CCs dans les différentes sources n’est pas homogène, particulièrement pour les isolats retrouvés dans les cas humains. En effet, plusieurs études ont

montré que les CCs tels : CC1, CC2, CC4 et CC6, tous font partie du sérotype 4b, sont plus fréquents dans les cas humains alors qu'ils sont sous représentés dans les aliments (Ragon, Wirth et al. 2008, Haase, Didelot et al. 2014, Maury, Tsai et al. 2016, Lee, Chen et al. 2018) ce qui suggère une pathogénicité élevée pour certains CCs, notamment les CC1 et CC4 (Maury, Tsai et al. 2016, Bergholz, Shah et al. 2018). Cependant, pour l'ensemble des CCs prédominants dans les cas de listériose humaine, il est encore difficile d'expliquer cette prédominance (Bergholz, Shah et al. 2018). Une faible capacité à survivre dans l'environnement et/ou la présence d'attributs de virulence particuliers dans ces clones sont suggérés (Bergholz, Shah et al. 2018).

Au Canada, une étude a montré que le CC8, appartenant au sérotype 1/2a, était prédominant dans les cas de listériose, avec une incidence de 54,8 % (Figure 6) (Knabel, Reimer et al. 2012) alors qu'il ne représente plus que 8% des cas de listériose si plusieurs régions du monde sont considérées (Bergholz, Shah et al. 2018). Ceci suggère que des groupes clonaux peuvent être prédominant uniquement dans une région du monde donnée, ce qui pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs tels que des habitudes alimentaires différentes et /ou des conditions environnementales particulières (Bergholz, Shah et al. 2018).

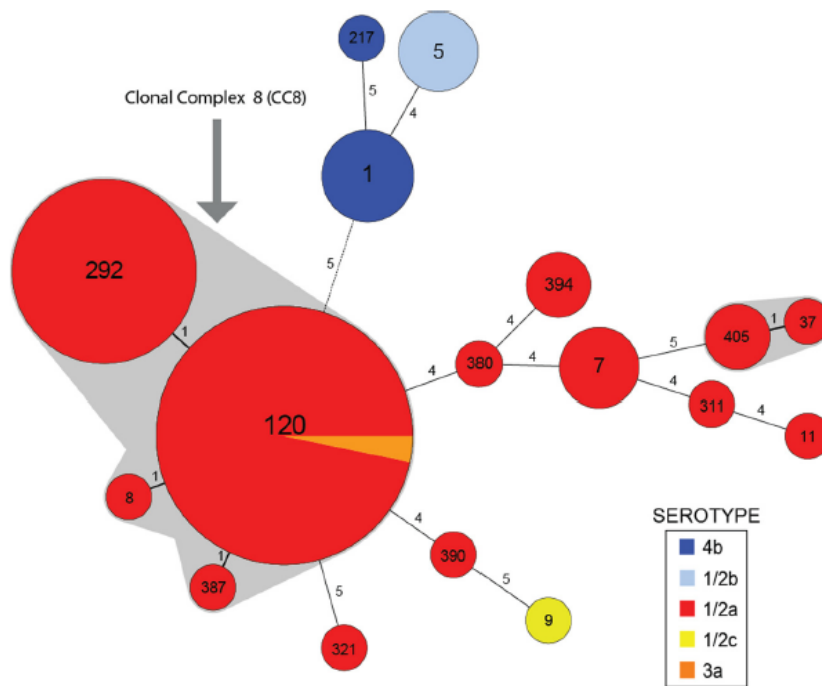


Figure 6 : Analyse phylogénétique des isolats cliniques de *L. monocytogenes* obtenus entre 1988 et 2010 au Canada. Image reprise de Knabel, Reimer et al. (2012)

L’analyse de plusieurs isolats appartenant à différents CCs couvrant plusieurs années et à travers plusieurs études indépendantes a montré l’émergence de certains clones, alors que d’autres seraient en déclin. Ainsi, le clone CC1 qui était historiquement le clone le plus dominant, depuis les années 2000, a vu sa prévalence diminuer régulièrement alors que les clones CC8, CC9 et CC121 ont émergé au cours de cette période (Figure 7) (Bergholz, Shah et al. 2018). Cependant, l’émergence de certains clones peut être le résultat d’une augmentation de prévalence dans un seul pays, ce qui reflète une fois de plus la distribution non homogène des CCs dominants à travers les régions du monde. Ceci est possiblement relié à des habitudes et des conditions environnementales différentes telles que décrit plus haut, et qui justifie également une analyse attentive de l’évolution de la représentation des CC dans le monde tout en tenant compte des circonstances des épidémies.

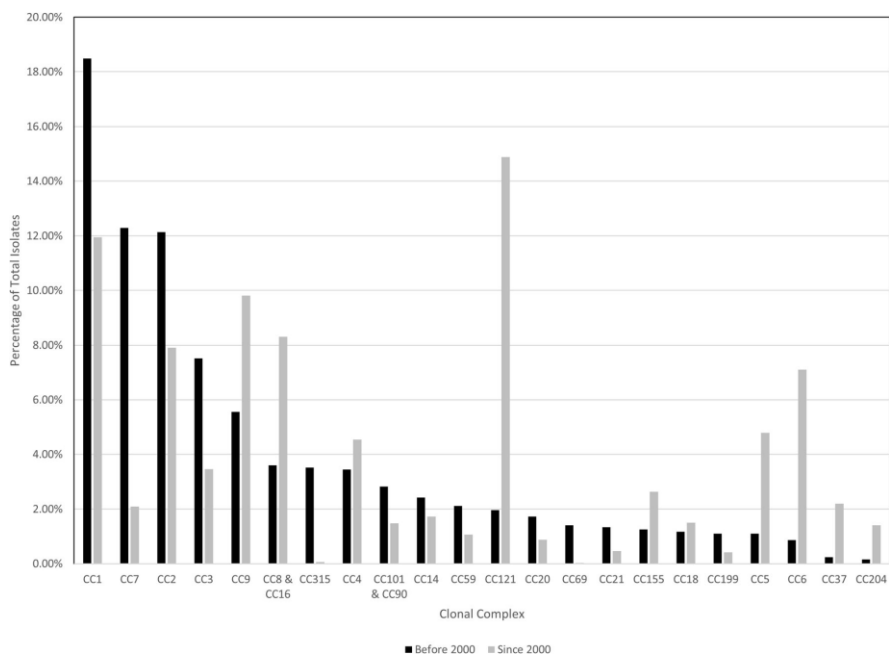


Figure 7 : Fréquence relative des complexes clonaux avant et à partir de l’année 2000. Résumé de dix études (Bergholz, Shah et al. 2018).

II.2.5 Facteurs de virulence spécifiques

II.2.5.1 Cas des clones hypervirulents

Bien que tous les sérotypes de *L. monocytogenes* soient capables de causer la listériose, la prédominance des sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b dans les cas de listériose humaine est manifeste. Ces trois sérotypes regroupent 95 % de ces cas (Jacquet, Doumith et al. 2004). Plus de la moitié des listérioses humaines sont causées par des souches de sérotype 4b, ce qui suggère un potentiel de virulence supérieur pour ce sérotype (Vazquez-Boland, Kuhn et al. 2001, Bergholz, Shah et al. 2018). De récentes études ont montré que certains clones appartenant au sérotype 4b possédaient des facteurs de virulence particuliers, tels qu’entre autres, l’hémolysine LLS et le système de phosphorylation et de transport du cellobiose (Cotter, Draper et al. 2008, Moura,

Criscuolo et al. 2016), ce qui expliquerait leur hypervirulence pour l'Homme et particulièrement leur tropisme pour les tissus nerveux lors de neurolistériose (Maury, Tsai et al. 2016).

II.2.5.2 Cas des clones avec une virulence atténuée par une internaline A tronquée

L'internaline A est une protéine de surface de 800 aa qui appartient à la famille des internalines (qui compte 21 protéines). Leur structure est assez conservée, ces molécules possèdent une région répétitive riche en Leucine et un site d'ancrage avec un motif LPXTG (ou un module WG) qui permet la fixation de ces protéines sur les parois bactériennes (Figure 8) (Cabanes, Dehoux et al. 2002, Bierne, Sabet et al. 2007, Pizarro-Cerdá, Kühbacher et al. 2012). Comme évoqué plus haut, son rôle dans l'internalisation de la bactérie dans les cellules épithéliales humaines apparaît essentiel pour l'établissement de l'infection à *L. monocytogenes* (Lecuit 2005). Plusieurs études ont montré que des isolats de *L. monocytogenes* présentait un gène de *inlA* avec un codon stop prématuré (conséquence de l'apparition d'un SNP dans la région codante) ce qui conduisait à la traduction d'une protéine InlA tronquée (Nightingale, Windham et al. 2005, Nightingale, Ivy et al. 2008, Van Stelten and Nightingale 2008). L'hypothèse qui a alors prévalu était que les souches qui présentaient ce type d'*inlA* seraient moins virulentes, hypothèse supportée par des études sur des modèles animaux ou *in vitro* (Van Stelten, Simpson et al. 2011, Cruz, Pitman et al. 2014).

Ces mutations ponctuelles se produisent à plusieurs endroits sur la protéine de telle sorte qu'on compte aujourd'hui 18 mutations différentes et plus spécifiquement, de plus en plus d'études démontrent que ces mutations sont retrouvées plus fréquemment dans les isolats appartenant à la lignée II et que ces mêmes isolats sont majoritaires dans les industries alimentaires ou leur environnement, comparativement aux isolats issus de cas de listériose humaine (Gray, Zadoks et al. 2004, Jacquet, Doumith et al. 2004, Van Stelten, Roberts et al. 2016). Ces études supportent l'hypothèse selon laquelle la sous-représentation de la lignée II dans les cas de listériose humaine serait due à une atténuation de la virulence liée à la présence d'une protéine InlA tronquée (Gray, Zadoks et al. 2004, Jacquet, Doumith et al. 2004, Van Stelten and Nightingale 2008, Van Stelten, Simpson et al. 2010).

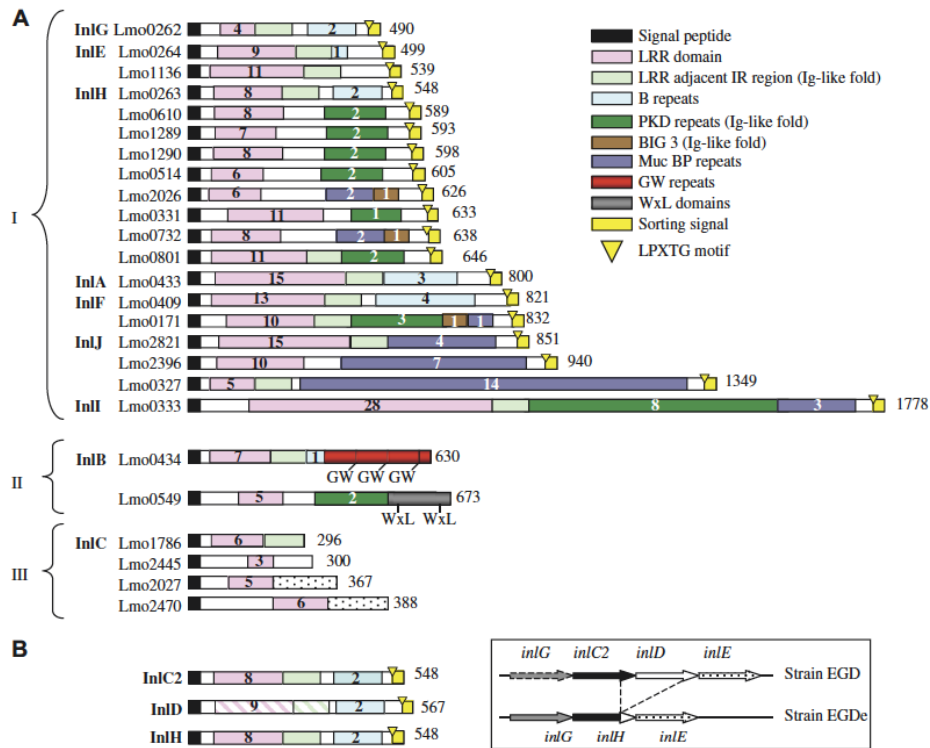


Figure 8 : Famille des internalines identifiées dans la souche de référence de *L. monocytogenes* EGD-e. A) représentation des internalines avec un site d’ancrage LPXTG (I), un module GW (II) ou des internalines secrétées (III) (Bierne, Sabet et al. 2007).

II.3 *Listeria monocytogenes* dans les abattoirs de porcs

II.3.1 Épidémiologie de *Listeria monocytogenes*

Lors de différentes épidémies de listériose survenues dans de nombreux pays incluant le Canada, les produits à base de viande ont été souvent impliqués (Currie, Farber et al. 2015, Wang, Qian et al. 2015, Henri, Félix et al. 2016, Authority, Prevention et al. 2017) ce qui justifie l’intérêt porté à cette filière.

L’importance des abattoirs comme source potentielle de contamination des matières premières destinées aux usines de transformation des viandes, mais aussi des produits de détail, a conduit certains chercheurs à étudier la prévalence de cette bactérie dans l’environnement des

abattoirs ou sur les carcasses de porcs (Giovannacci, Ragimbeau et al. 1999, Ortiz, Lopez et al. 2010, Ortiz, López-Alonso et al. 2016).

II.3.2 Organisation des étapes d'abattage de porc et identification des risques de contamination

Les étapes d'abattage des porcs sont organisées en quatre secteurs principaux : l'attente, l'abattage, l'éviscération, qui est précédée par une étape d'habillage, et la réfrigération. Ces étapes sont illustrées dans le tableau 2. Une description des principales étapes ou sous-étapes qui sont considérées comme des points critiques selon le système HACCP a été produite dans une étude précédente (Borch, Nesbakken et al. 1996).

Dans les parcs d'attente, les animaux arrivent et subissent une première inspection appelée inspection *ante mortem*. Tous les porcs visiblement malades ou qui le sont potentiellement (suspects) seront alors isolés dans un parc à part pour faciliter l'inspection ultérieure.

L'étape d'étourdissement des animaux est réalisée en vue de la préparation à l'abattage. À ce stade de l'abattage, le risque de contamination entre les animaux par les pathogènes alimentaires en général a été rapporté (Borch, Nesbakken et al. 1996). L'étape d'abattage consiste en l'insensibilisation des animaux suivie de l'étape de saignée qui a pour but la mort par exsanguination. Le risque de contamination à ce stade est associé à la contamination par le matériel de saignée notamment (Borch, Nesbakken et al. 1996).

L'étape d'échaudage qui consiste à faire tremper les carcasses dans des cuves contenant de l'eau chauffée à 60°C pendant quelques minutes (Borch, Nesbakken et al. 1996) va permettre une réduction considérable des bactéries à la surface des carcasses. Cependant à l'étape d'épilage, qui permet d'enlever les poils sur la peau, le risque de contamination/recontamination est plus que probable par les équipements. Le même cycle de décontamination puis recontamination va se produire dans les étapes de flambage et l'étape de polissage respectivement qui permettent d'éliminer tous les poils. L'éviscération qui consiste à enlever les viscères est l'une des étapes

critiques, car les risques de contamination des carcasses sont multiples dus au risque de perforation des organes tels que la langue, le pharynx, les intestins en plus de la contamination croisée possible par le matériel utilisé pour ce processus.

L'étape d'inspection permet de vérifier l'état sanitaire des carcasses et dans ce cas l'inspection elle-même constitue un risque de contamination pour les carcasses par la manipulation. La fente dorsale consiste à sectionner les carcasses en deux et l'enlèvement de la tête sont les dernières étapes d'abattage et les risques de contaminations dans ces étapes sont liés la contamination par la tête et par le matériel (Borch, Nesbakken et al. 1996). Les carcasses sont conduites dans une salle de réfrigération pour leur distribution ultérieure. Certains abattoirs possèdent des usines de découpe où les carcasses sont découpées en plusieurs parties (coupes) avant de les envoyer vers les industries de transformation ou pour l'exportation.

Tableau 2 : Schématisation des étapes d'abattage avec les différents aspects hygiéniques de chaque étape et les mesures préventives suggérées. Application du système HACCP sur ces étapes d'abattage. Adapté de Borch, Nesbakken et al. (1996)

Étape du process	Aspect hygienique	Actions préventives	CP/PCC
1)Attente	Contamination entre les animaux	Nettoyage et désinfection	PC
2)Étourdissement			PC
3)Saignée	-Contamination par le matériel (couteau, aiguiseurs, etc) -Réduction du niveau de contamination bactérienne	Nettoyage et désinfection	PC
4)Échaudage	Recontaminaton par les machines	Temps/température	PC
5)Épileuse	Réduction du niveau de contamination bactérienne	Nettoyage et Désinfection	PC
6)Flambage	Contamination par les machines	Temps/température	PC
7)Polissage	Contamination par la langue, le pharynx, les amygdales, les intestins et par le matériel	Nettoyage et désinfection	PC
8)Eviscération	Contamination par la fondeuse ou la scie	Résection du rectum Instruction de travail Désinfection des outils	PCC
9)Fondeuse	Contamination lors de l'inspection Contamination par la tête	-Vitesse de la ligne Température de l'eau	PC
10)Inspection du produit		-Désinfection du matériel	PCC
11)Enlèvement de la tête		Instruction de travail Désinfection du matériel	PCC

Ces dispositions générales sont valables pour l'ensemble des pathogènes alimentaires, et notamment ceux apportés par l'animal vivant par un portage intestinal (*Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *E coli* pathogènes). Des dispositions particulières additionnelles peuvent être envisagées face à un pathogène comme *L. monocytogenes* qui présente des aptitudes à la colonisation des usines. Aussi la description spécifique du risque *Listeria* dans ce type d'usine est nécessaire (Herenda, Chambers et al. 2002).

II.3.3 *Listeria monocytogenes* dans les abattoirs et les usines de découpe : prévalence et distribution

Plusieurs études portant sur la prévalence de *L. monocytogenes* dans les abattoirs et les usines de découpe de porcs ont déjà été réalisées (Autio, Säteri et al. 2000, Lindblad, Lindmark et al. 2007, Lopez, Villatoro et al. 2008, Ortiz, López et al. 2010, Prencipe, Rizzi et al. 2012, Meloni, Piras et al. 2013, Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014). La prévalence générale de *L. monocytogenes* avant le nettoyage et la désinfection dans les abattoirs et les usines de découpe de porcs varie entre 9 et 33 % dans les pays européens comme l'Espagne, la Finlande et l'Italie (Autio, Säteri et al. 2000, Ortiz, Lopez et al. 2010, Meloni, Piras et al. 2013, Morales-Partera, Cardoso-Toset et al. 2018). La contamination de l'environnement des usines d'abattage et de découpe du porc après nettoyage et désinfection varie entre 9 et 18.3 %, mais il semble que les sites en contact direct avec les produits crus sont les plus contaminés (Chasseignaux, Toquin et al. 2001, Ortiz, López et al. 2010), ce qui serait dû à une recontamination de la salle de réfrigération où la contamination par *L. monocytogenes* est l'une des plus élevées (Van den Elzen and Snijders 1993). Par ailleurs, en ce qui a trait à la contamination environnementale, les surfaces en contact et non en contact avec les produits étaient contaminées avec une prévalence comparable, soit 23 et 25 % respectivement (Meloni, Piras et al. 2013).

D'autres études ont rapporté des taux de détection de *L. monocytogenes* élevés dans d'autres types de viandes telles que la volaille et la viande rouge. En effet, au Brésil, les poitrines

et les cuisses de poulets étaient contaminées par *L. monocytogenes* à 8,6 et 44,2 % à l'abattoir (Schäfer, Steffens et al. 2017). De semblables résultats sont obtenus au Bangladesh avec 8,3% de détection dans la volaille (Islam, Husna et al. 2016). Par ailleurs, dans une étude récente visant à déterminer l'incidence de *L. monocytogenes* dans la viande de volaille commercialisée en Europe a montré que la prévalence de ce pathogène était de 19,3 % (Gonçalves-Tenório, Silva et al. 2018). Dans une autre étude menée dans l'environnement des industries de transformation des viandes (porcs, bœuf, mouton et volaille) en Europe, la fréquence de détection de *L. monocytogenes* a atteint 32% (Muhterem-Uyar, Dalmaso et al. 2015). Dans une autre étude chez le porc, les amygdales et la langue étaient les plus contaminées avec jusqu'à 12 % et 39 % de prévalence de *L. monocytogenes* respectivement (Autio, Säteri et al. 2000, Morales-Partera, Cardoso-Toset et al. 2018).

II.3.4 Rôle de la contamination environnementale

À travers le portrait dressé plus haut quant à la contamination de *L. monocytogenes* dans les industries, il apparaît clairement que la contamination de l'environnement des abattoirs contribue à l'augmentation du risque de contamination des matières premières (carcasse et /ou la viande coupée). De plus, des études précédentes ont montré que la contamination environnementale est la principale source de contamination des produits alimentaires (Ojeniyi, Christensen et al. 2000).

À l'échelle des abattoirs et des usines de découpe, des études ont montré qu'une re-contamination des carcasses dans les salles de réfrigération se produisait, car la prévalence de *L. monocytogenes* peut y être très forte (Roetterud and Nesbakken 1991, Nesbakken, Nerbrink et al. 1994). L'environnement des abattoirs est donc considéré comme une source importante de contamination des matières premières (viande découpée ou carcasse) par *L. monocytogenes* (Nesbakken, Kapperud et al. 1996, Thévenot, Dernburg et al. 2006). Par ailleurs, la détection de *L. monocytogenes* dans l'environnement est considérée comme étant le meilleur moyen de l'évaluation de l'efficacité du contrôle de cette bactérie dans les industries de transformation des produits alimentaires (Tompkin 2002).

II.4 Contamination des industries de transformation du prêt à manger et dans les ventes de détail

La contamination des produits carnés transformés par *L. monocytogenes* est souvent rapportée, particulièrement pour les aliments qui permettent la croissance de *L. monocytogenes* (Farber, Pagotto et al. 2007). Des prévalences de 3,24 et 10 % ont été rapportées dans des viandes crues ou saucisses (Thevenot, Delignette-Muller et al. 2005, Kamper, Kahmann et al. 2006, Meloni, Consolati et al. 2014). Il a été rapporté également que la prévalence de *L. monocytogenes* dans les produits finis crus à base de viande peut être de l'ordre de 15% (Chasseignaux, Toquin et al. 2001) et peut aller jusqu'à 40% de produits contaminés. Pour les produits prêt-à-manger, les niveaux de contamination rapportés sont plus faibles (2,3 % (Chasseignaux, Toquin et al. 2001, Gudbjörnsdóttir, Suihko et al. 2004). Le haut niveau de contamination des produits finis crus peut s'expliquer par le processus de transformation et le matériel utilisé qui pourrait jouer un rôle dans la contamination croisée du produit (Vogel, Huss et al. 2001, Vogel, Jørgensen et al. 2001). D'autres produits ont également des prévalences de *L. monocytogenes* variables. Ainsi, dans les commerces de détail, les taux de contamination des viandes de poulet et de bœuf sont de 19 et 23 % respectivement et ce taux peut atteindre 26 % quand il s'agit de poulet pané et congelé (Canada. 2017). Il est par ailleurs intéressant de noter que dans une étude réalisée sur *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries de transformation et de détail, une prévalence de 6,3 % a été rapportée (Madden, Hutchison et al. 2018), un taux de contamination avoisinant celui souvent retrouvé dans l'environnement d'abattoirs et d'usines de découpe de viandes crues (Ortiz, López et al. 2010).

À l'échelle de l'environnement, il a été rapporté que la première cause de contamination des aliments par *L. monocytogenes* est reliée à l'environnement des industries de transformation (Kathariou 2002).

Les sources d'entrée de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries de transformation peuvent être multiples telles que les matières premières ou le circuit des

personnes et des équipements (Buchanan, Gorris et al. 2017). Elle a été aussi détectée dans l'environnement des épiceries (Hoelzer, Pouillot et al. 2015, Wang, Ray et al. 2015).

II.5 Persistance de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement des abattoirs

Tel que mentionné précédemment, bien que la réglementation sur la gestion du risque de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires puisse être parfois stricte, l'élimination de ce danger biologique reste un réel défi pour les industriels. Cette situation peut être illustrée par l'introduction du communiqué de presse présenté par le président de la société Maple leaf en pleine crise de listériose au Canada en 2008 : « La bactérie *Listeria* est présente dans toutes les usines d'aliments, tous les supermarchés et probablement toutes les cuisines » (<https://www.mapleleaffoods.com/fr/news/maple-leaf-fait-le-point-sur-les-protocoles-de-d-marrage-de-la-production-son-usine-de-bartor-road-2/>). Une des causes qui pourrait expliquer la présence récurrente de la bactérie dans les environnements agroalimentaires est le phénomène de persistance de *L. monocytogenes* qui est bien décrit dans la littérature (Mędrala, Dąbrowski et al. 2003, Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014, Ortiz, López-Alonso et al. 2016).

II.5.1 Définition d'une souche persistante

La persistance d'une souche dans l'environnement est un phénomène qui peut impliquer plusieurs facteurs à la fois c'est pourquoi il n'existe pas une définition unique pour une souche persistante. Les auteurs s'entendent à dire qu'une souche est définie comme persistante si elle est retrouvée dans un même endroit à plusieurs reprises après nettoyage et désinfection (Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014). Ainsi, certains auteurs définissent la persistance dans leurs études de manière aussi peu précise que « des souches persistantes sont isolées à répétition d'échantillons de lait dans une même ferme » (Muraoka, Gay et al. 2003) ou

beaucoup plus précisément définie comme « des isolats collectés au moins trois fois à l'intérieur d'une période d'une année ou plus, à des dates différentes sur des équipements et sur les produits finaux » (Dauphin, Ragimbeau et al. 2001, Lunden, Autio et al. 2003, Latorre, Van Kessel et al. 2011). D'autres ont défini la persistance pour une souche lorsqu'elle « est retrouvée au moins cinq fois avec six mois d'intervalle » (Leong, Alvarez-Ordóñez et al. 2014).

Une des difficultés pour les chercheurs qui étudient le phénomène de persistance est de faire la distinction entre une souche persistante et une souche récurrente qui traduit une entrée répétée (Carpentier and Cerf 2011). Cependant, plusieurs études résumées dans Ferreira, Wiedmann et al. (2014) ainsi que dans Møretro and Langsrud (2004) ont confirmé la capacité de *L. monocytogenes* à persister dans l'environnement des industries agroalimentaires. La persistance d'une souche implique également que c'est un clone qui persiste dans un environnement, il est donc important d'utiliser des méthodes de caractérisation très discriminantes pour mieux identifier les clones. Jusqu'à très récemment, la méthode de l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) après restriction du génome entier par deux enzymes *ApaI* et *AscI* (Graves and Swaminathan 2001) était la méthode de caractérisation la plus discriminante et la plus utilisée pour le typage des souches persistantes de *L. monocytogenes* (Ragimbeau 2002, Marsh, Luo et al. 2003, Ortiz, Lopez et al. 2010, Latorre, Van Kessel et al. 2011, Luo, Zhang et al. 2017). D'autres études de persistance sont basées sur la caractérisation du génome entier de *L. monocytogenes* particulièrement avec l'arrivée du séquençage de nouvelle génération qui ont démontré qu'une plus grande discrimination entre les pulsotypes pouvait être atteinte (Orsi, Borowsky et al. 2008, Stasiewicz, Oliver et al. 2015, Ortiz, López-Alonso et al. 2016).

II.6 Mécanismes de persistance

La persistance de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires peut être reliée à plusieurs facteurs qui sont encore assez peu compris (Ferreira, Wiedmann et al. 2014). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer le phénomène de persistance de *L. monocytogenes* à savoir sa capacité à adhérer aux surfaces et à former le biofilm (Lunden,

Miettinen et al. 2000, Borucki, Peppin et al. 2003), sa capacité de résister aux désinfectants industriels (Aase, Sundheim et al. 2000, Lunden, Autio et al. 2003, Holah, Bird et al. 2004, Wulff, Gram et al. 2006) et plus récemment, l'interaction avec l'écosystème microbien de l'environnement des industries agroalimentaires (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017).

II.6.1 Formation du biofilm

Le biofilm est initié grâce à la capacité des bactéries à adhérer à des surfaces diverses, qui peuvent être biotiques, telles que les muqueuses respiratoires, ou abiotiques, allant des roches dans la nature, à des équipements et surfaces dans les industries agroalimentaires et les hôpitaux. La formation du biofilm passe par 1) l'adhésion d'agrégats de bactéries sur ces surfaces 2) la formation de micro-colonies par les premières bactéries qui ont colonisé la surface et la sécrétion de matrice extracellulaire composée de polymères d'exopolysaccharides, d'ADN et de protéines 3) La maturation du biofilm par la croissance des micro-colonies et enfin 4) la dispersion des bactéries du biofilm mature pour coloniser d'autres surfaces et recommencer le cycle (Veerachamy, Yarlagadda et al. 2014). Ces différentes étapes sont résumées dans la figure 9.

La plupart des bactéries vivent en communauté au sein d'un biofilm et ce mode de vie contribue à la persistance des bactéries dans un environnement difficile par la protection que la matrice extracellulaire confère. L'organisation en biofilm augmente la disponibilité des nutriments par des échanges et élimine les métabolites toxiques. Enfin, la structure en biofilm, par la proximité qu'elle permet entre bactéries, facilite l'acquisition de certains caractères génétiques tels que la résistance aux antibiotiques (Davey and O'toole 2000).

Le biofilm représente l'une des causes majeures de contamination récurrente de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers. Plusieurs études, rapportées par Simoes et al (2010), ont démontré que la persistance et le biofilm de certains pathogènes

alimentaires tels que *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp*, *Escherichia coli* O157:H7 se retrouvaient sur les surfaces en contact des aliments et affectaient la qualité et la salubrité des aliments (Simoes, Simões et al. 2010).

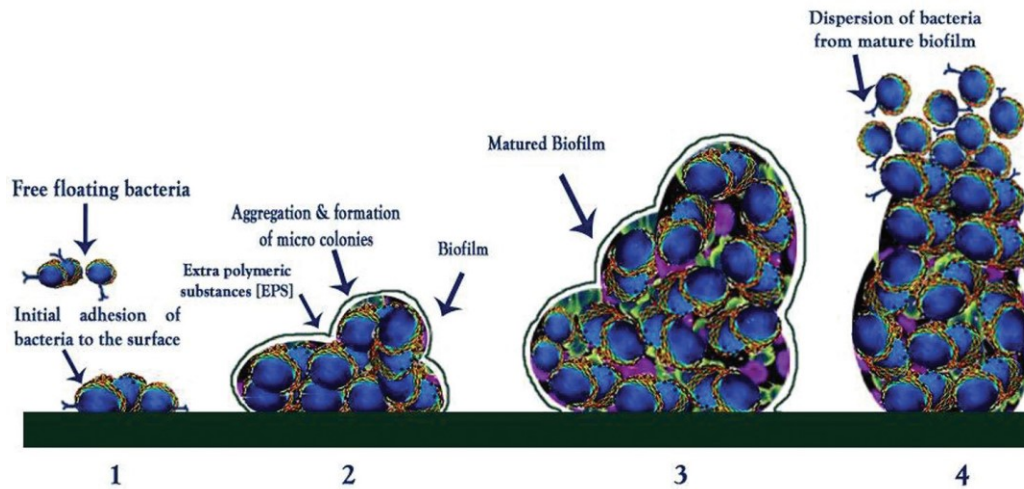


Figure 9 : Schématisation des étapes de formation du biofilm (Veerachamy, Yarlagadda et al. 2014)

La structure du biofilm de *L. monocytogenes* a été décrite dans plusieurs études soit sous forme de nid d'abeille (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Marsh, Luo et al. 2003, Guilbaud, Piveteau et al. 2015), de structure filamenteuse (Monk, Cook et al. 2004, Rieu, Briandet et al. 2008, Renier, Chagnot et al. 2014) ou une structure en multicouche cellulaire telles que montré dans la figure 10 (Rieu, Weidmann et al. 2007). Ce biofilm est composé d'ADN extracellulaire (ADN-e), lequel est considéré le principal élément de la matrice extracellulaire chez *Listeria monocytogenes* (Harmsen, Lappann et al. 2010, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013). Des études ont montré qu'un traitement à la DNase d'un biofilm de *L. monocytogenes* conduisait à sa disparition; seuls quelques amas bactériens restent sur la surface traitée (Harmsen, Lappann et al. 2010, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013, Zetzmann, Okshevsky et al. 2015). De plus, l'ADN-e du biofilm de *L. monocytogenes* joue un rôle important dans les premières étapes de l'attachement des bactéries aux surfaces (Harmsen, Lappann et al. 2010). Enfin, contrairement

aux biofilms formés par d'autres bactéries pour lesquels la matrice extracellulaire du biofilm est composée principalement de polysaccharides tel que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Donlan 2002), la présence de ces derniers dans les biofilms de *Listeria* n'a pas pu être mise en évidence (Combrouse, Sadovskaya et al. 2013).

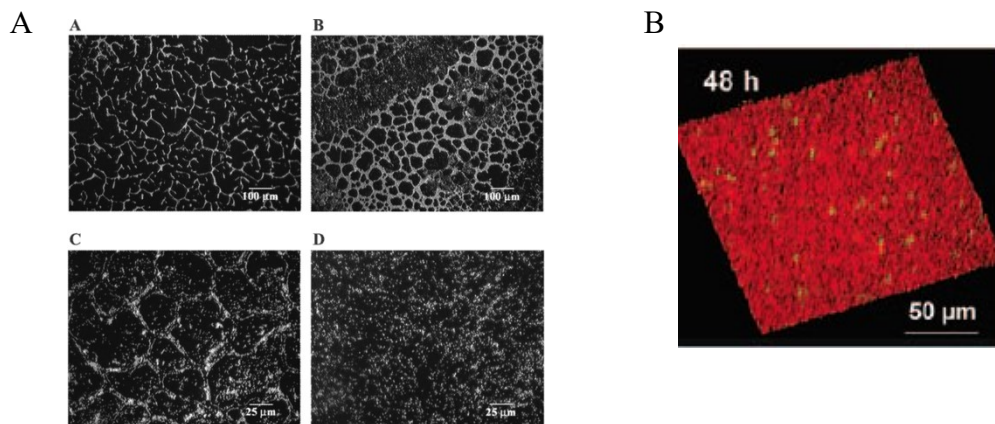


Figure 10 : Organisation du biofilm de *L. monocytogenes*. A) Structure en nid d'abeille du biofilm de *L. monocytogenes* sur une surface de polystyrène observé par microscope à balayage (Marsh, Luo et al. 2003). B) structure en couches multicellulaires du biofilm de *L. monocytogenes* cultivé en condition statique reprise de Rieu, Briandet et al. (2008).

II.6.1.1 Méthodes et conditions utilisées pour l'étude du biofilm de *Listeria monocytogenes*

L'étude du biofilm de *L. monocytogenes* est un élément essentiel afin de comprendre sa formation avant d'envisager de le contrôler. Le choix des conditions et de la méthode utilisées pour l'étude du biofilm sont donc importants. La méthode la plus utilisée pour produire et étudier le biofilm de *L. monocytogenes* est la méthode dite statique, qui est basée sur la culture des souches dans des conditions qui ne permettent pas le renouvellement d'apport en nutriments (ni l'élimination de métabolites) en utilisant soit des plaques de 96 puits, des chambres de cultures ou des coupons (Norwood and Gilmour 2001, Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Borucki, Peppin et al. 2003, Marsh, Luo et al. 2003, Monk, Cook et al. 2004, Stepanovic, Cirkovic et al.

2004, Sela, Frank et al. 2006, Pilchová, Hernould et al. 2014, Guilbaud, Piveteau et al. 2015). Pour la quantification de la biomasse de biofilm, la méthode de coloration au Cristal Violet est le plus souvent utilisée (Lunden, Miettinen et al. 2000, Djordjevic, Wiedmann et al. 2002) alors que pour l'étude de l'architecture et de l'organisation des micro-colonies, la microscopie à épifluorescence et la microscopie électronique sont les plus utilisées (Marsh, Luo et al. 2003, Guilbaud, Piveteau et al. 2015).

L'autre méthode, de plus en plus utilisée, est basée sur l'utilisation de conditions dynamiques de culture. Dans cette méthode l'apport en nutriments et l'élimination des cellules planctoniques et des métabolites sont effectués en continu. Les études qui se sont basées sur cette méthode utilisent le système flow Cell qui est composé de chambres de cultures laminaires. Il est le plus souvent couplé au microscope à fluorescence (Rieu, Weidmann et al. 2007, Rieu, Briandet et al. 2008, Zetzmann, Okshevsky et al. 2015). L'avantage de cette méthode est son principe de flux en continu, qui permet au biofilm de croître dans des conditions contrôlées et l'étude de la formation de la structure et de l'organisation du biofilm en temps réel (Tolker-Nielsen and Sternberg 2014). La divergence de certains résultats entre des études précédentes peut être liée au type de méthode de formation du biofilm utilisée. Ainsi, Rieu et al (Rieu, Weidmann et al. 2007) a montré que l'expression du gène du système *agr*, impliqué dans le quorum sensing et connu pour son rôle dans la formation du biofilm de *L. monocytogenes*, est différente dépendamment de la méthode de culture du biofilm utilisée. Quand celui-ci est cultivé en conditions statiques, l'expression du système *agr* serait absente alors que dans un biofilm de la même souche, cultivé en conditions dynamiques, l'expression de ces gènes est détectée (Rieu, Weidmann et al. 2007).

Une nouvelle méthode de formation de biofilm bactérien est née ces dernières années. Elle est basée sur le principe du flux continu des nutriments et elle repose sur des conditions microfluidiques (Janakiraman, Englert et al. 2009). En effet, le système est basé sur l'utilisation de chambres de culture mesurant quelques micromètres de longueur et de largeur. L'avantage de cette méthode repose sur la précision du contrôle des conditions entourant la production du biofilm telles que la température et surtout de la force de cisaillement imposée au biofilm (fonction du flux appliqué) (Janakiraman, Englert et al. 2009, Benoit, Conant et al. 2010). La

surface microscopique des chambres de culture permet de mieux contrôler ces conditions et de mieux étudier la structure et la composition du biofilm grâce à la possibilité d’observer l’évolution du biofilm en temps réel (Kim, Park et al. 2012). Un exemple d’un système microfluidique est illustré dans la figure 10. Le principe repose sur l’utilisation d’un système pneumatique (pompe à efflux contrôlé), équipé d’une plaque chauffante réglable (Figure 11) sur lequel des plaques composées de chambres de culture microscopiques sont déposées. Les premiers puits des plaques servent d’inoculum et les deuxièmes puits servent à récupérer le milieu de culture usé (Figure 11).

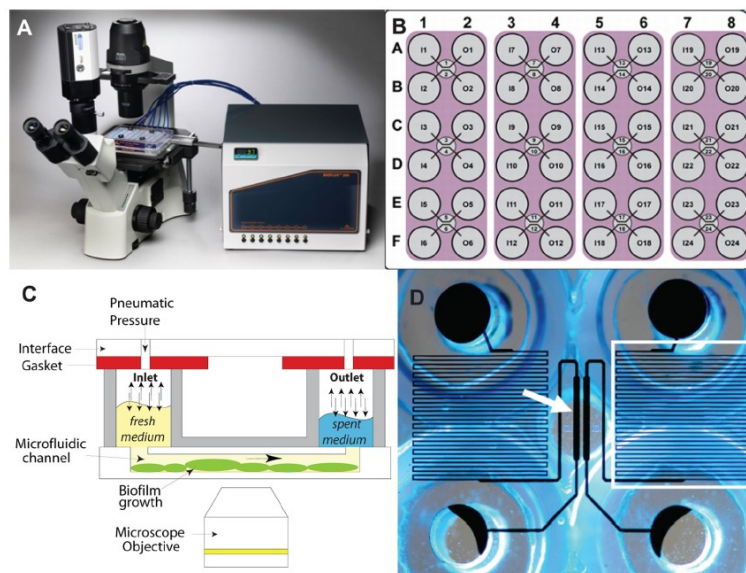


Figure 11 : Schématisation du système microfluidique. A) Image représentant le système microfluidique, le Bioflux. B) Représentation schématique d’une plaque de 48 puits. C) Schématisation du système microfluidique montrant le développement d’un biofilm. D) Image représentant les chambres de cultures avec les puits contenant le milieu de culture propre d’un côté et du milieu utilisé de l’autre côté du serpentin.

II.6.1.2 **Persistence de *Listeria monocytogenes* et formation de biofilm**

Plusieurs études se sont intéressées à la capacité des souches persistantes de *L. monocytogenes* à former le biofilm sur différents types de surfaces et les résultats de ces études divergent. Ainsi, certains auteurs ont observé que des souches persistantes, isolées des industries de transformation et de l'environnement des fermes, formaient plus de biofilms que les souches dites sporadiques lorsqu'on utilisait des surfaces en acier inoxydable (Norwood and Gilmour 2001, Nowak, Cruz et al. 2017).

Une autre étude comparant également des souches persistantes et sporadiques suggère que les souches persistantes ne forment pas plus de biofilm que les souches sporadiques puisque la moitié de celles-ci produisaient après 72h la même biomasse (voire plus) que les souches qualifiées de persistantes (Lunden, Miettinen et al. 2000). D'autres études après cette dernière n'ont pas pu montrer de différence significative dans la capacité à former le biofilm entre les souches persistantes et sporadiques (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Harvey, Keenan et al. 2007). Il semble que la notion de persistance peut être indépendante de la capacité de formation de biofilm : des souches persistantes étudiées divergeaient dans leur capacité à former le biofilm (Miranda 2017).

Ces résultats divergents soulignent la difficulté d'étudier le biofilm dans des conditions qui sont souvent loin des réalités environnementales auxquelles cette bactérie fait face. Il est donc probable que les différentes méthodes utilisées dans ces études ainsi que les conditions de croissance du biofilm jouent un rôle important dans la divergence des résultats (Ferreira, Wiedmann et al. 2014).

II.6.1.2.1 *Facteurs influençant la formation du biofilm de *Listeria monocytogenes**

- **Limitation en nutriments**

Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation du biofilm de *L. monocytogenes*, le premier à considérer est la disponibilité des nutriments. En effet, des études ont montré qu'un milieu pauvre en nutriments augmente la biomasse du biofilm formé par *L. monocytogenes* (Zhou, Feng et al. 2012, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013, Kadam, den Besten et al. 2013). De telles observations pourraient être expliquées par le fait qu'en condition limitée en nutriments, il y a induction de la mort et de la lyse cellulaire, ce qui permettra d'autant la libération de l'ADN-e. Ceci a été décrit pour le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Mai-Prochnow, Evans et al. 2004, Bayles 2007, Allocati, Masulli et al. 2015). La composition du milieu de culture influence également la formation du biofilm de *L. monocytogenes*. Par exemple, un milieu de culture riche en glucose conduit à une biomasse plus importante du biofilm (Zameer, Gopal et al. 2010).

- **Température**

La température peut influencer la formation du biofilm de *L. monocytogenes*. En effet, les biomasses de biofilm formées par certaines souches de *L. monocytogenes* à 4, 12 et 22°C étaient plus élevées que celle obtenue après incubation à 37°C (Di Bonaventura, Piccolomini et al. 2008). Le mécanisme suggéré pour cette influence indirecte de la température sur la formation du biofilm de *L. monocytogenes* est qu'à 37°C la bactérie perd son flagelle alors que ce dernier joue un rôle important dans l'adhérence des cellules aux surfaces lors des premières étapes de formation du biofilm (Lemon, Higgins et al. 2007).

- **Quorum sensing**

Le quorum sensing est un mécanisme de régulation de l'expression de certains gènes d'une bactérie. Celui-ci conduit à la sécrétion de molécules appelées auto-inducteurs dont la concentration augmente en fonction de la densité cellulaire (Miller and Bassler 2001). Le quorum sensing, qui agit comme un moyen de communication entre les bactéries, intervient à plusieurs niveaux tels que la symbiose, la virulence, la formation de biofilm ou la production d'antibiotiques (Miller and Bassler 2001). Dans le cas du biofilm de *L. monocytogenes*, deux

systèmes du quorum sensing sont décrits : les systèmes Agr (accessory genes regulator) et Lux S (Autret, Raynaud et al. 2003, Sela, Frank et al. 2006, Rieu, Weidmann et al. 2007).

Le système *agr* est organisé en opéron et est constitué de quatre gènes : *agr A et C* codant pour la régulation de la réponse et la production d'une Histidine Kinase respectivement, *agr B* codant pour le peptide précurseur et conduisant à la maturation du peptide auto-inducteur 2 (AI 2) lequel est codé par *agr D* (Rieu, Weidmann et al. 2007). Le système LuxS code pour une enzyme S-ribosylhomocysteinase responsable de la catalyse du précurseur de l'AI-2 (Vendeville, Winzer et al. 2005). De nombreuses études ont démontré que ces deux systèmes jouent un rôle important dans la formation du biofilm de *L. monocytogenes*. L'importance du système *agrBDCA* dans la formation du biofilm de *L. monocytogenes* est bien documentée (Riedel, Monk et al. 2009, Garmyn, Gal et al. 2011) et plus spécifiquement, Rieu, Weidmann et al. (2007) a démontré qu'en absence du système *agrBDCA*, l'adhésion de *L. monocytogenes* est compromise et la formation de biofilm également. Le système LuxS également aurait un rôle dans la formation du biofilm de *L. monocytogenes*, mais tel que l'a démontré une précédente étude, l'expression de LuxS entraîne une diminution de l'attachement et de la formation du biofilm. Le système LuxS serait donc un inhibiteur du biofilm de *L. monocytogenes* (Sela, Frank et al. 2006).

D'autres facteurs peuvent influencer la formation du biofilm de *L. monocytogenes* tel que le type de surface. Il semble que *L. monocytogenes* forme un biofilm plus important sur le verre comparativement au polystyrène et à l'acier inoxydable, en tenant compte de la température également (Di Bonaventura, Piccolomini et al. 2008).

II.6.2 Résistance aux désinfectants

II.6.2.1 Types de désinfectants utilisés en industries agroalimentaires

L'utilisation de désinfectants dans les industries agroalimentaires est importante, car le nettoyage et la désinfection quotidienne des surfaces de travail conditionne la production

d'aliments sécuritaires avec une durée de vie acceptable. L'efficacité de ces désinfectants va donc diminuer les risques de contamination des produits par des bactéries (Wirtanen and Salo 2003). Un désinfectant utilisé dans une industrie agroalimentaire doit être sécuritaire, facile à utiliser, facile à rincer et ne pas laisser de résidus toxiques (Wirtanen and Salo 2003). Plusieurs désinfectants sont approuvés pour leur utilisation dans les industries agroalimentaires (Wirtanen and Salo 2003). Ils sont soit à base de chlore, d'ammonium quaternaire, d'oxydants tels que l'acide peracétique, des persulfates, des iodophores ou de surfactants (Wirtanen and Salo 2003). Le tableau 3 résume les avantages et les inconvénients de ces désinfectants.

Tableau 3: Liste des désinfectants les plus communs en industrie agroalimentaire avec leurs avantages et inconvénients. Tableau adapté de Wirtanen and Salo (2003).

Désinfectant	Avantages	Inconvénients
Alcool	Efficace contre les cellules végétatives, non-toxique, facile à utiliser, incolore, soluble dans l'eau, volatile.	Microbiostatique, non efficace contre les spores
Acide peracétique	Efficace à de faibles concentrations, large spectre d'action, efficace contre les spores, pénétration dans les biofilms, non-toxique	Corrosif, instable
Peroxyde d'Hydrogène	Se décompose en eau et oxygène, relativement non toxique, facile à utiliser, déstabilise le biofilm et facilite son détachement.	Nécessite de grandes concentrations, corrosif

Chlorine	Efficace à faible concentration, large spectre antimicrobien, facile à utiliser, permet le détachement des microbes, bon marché.	Produits intermédiaires toxiques, développement de résistance, présence de résidus corrosif, interagit avec les polymères extracellulaires, décoloration, production de gaz explosif.
Hypochlorine	Bon marché, efficacité à large spectre antimicrobien, facile à utiliser, permet le détachement microbien.	Instable, toxique, oxydatif, corrosif, croissance rapide, ne prévient pas l'adhésion, décoloration des produits.
Chlorine dioxide	Efficace à de faibles concentrations, il peut produit sur-place et son efficacité est faiblement dépendante du pH	Produits intermédiaires toxiques, production de gaz explosif.
Composés d'ammonium quaternaire (QACs)	Efficace, non-toxique, prévient la croissance microbienne, permet le détachement microbien, non irritant, non corrosif, inodore et ne présente pas de flaveur.	Inactivé par le pH bas et les sels (Ca^{2+} et Mg^{2+}), développement de la résistance.
Iodophores	Non-corrosif, facile à utiliser, non irritant, activité à large spectre	Dispendieux, présence de flaveur et d'odeur, forme des composants colorés en interaction avec l'amidon.
Ozone	Se décompose en oxygène, ne laisse pas de résidus, élimine les biofilms	Corrosif, s'inactive facilement, réagit avec les produits organiques (époxydes).
Glutaraldehyde	Efficace à de petites concentrations, bon marché, non-corrosif	Faible pénétration dans le biofilm, se dégrade en acide formique

Les désinfectants les plus utilisés sont les QACs et les composés chlorés. L'activité antimicrobienne des composés chlorés est engendrée lorsque ces derniers sont ajoutés à l'eau, l'acide hypochlorique formé va se dissocier en anions hypochloriques et en protons (Wirtanen and Salo 2003). Les QACs sont très utilisés dans les industries agroalimentaires, mais aussi dans d'autres établissements tels que ceux de l'industrie pharmaceutique (Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012).

Les autres désinfectants cités dans le tableau 3 peuvent être utilisés du fait de leur efficacité contre beaucoup d'autres bactéries (Wirtanen and Salo 2003). C'est le cas de l'acide peracétique, des iodophores et de l'ozone. Par contre, ils comportent des inconvénients importants tels que la non-stabilité pour l'ozone et l'acide peracétique, et la présence d'odeur ou potentiellement de coloration indésirable dans le cas des iodophores (Wirtanen and Salo 2003).

II.6.2.2 Mode d'action des QACs

Le Benzalkonium Chloride (BC) est le QAC le plus utilisé dans les industries agroalimentaires (Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012). Grâce à leur nature amphiphile, les QACs possèdent des propriétés de détergents contre les microorganismes (Jennings, Minbiole et al. 2015). L'interaction entre les QACs, dont le groupement azote est positivement chargé, avec les phospholipides acides de la membrane des bactéries qui sont négativement chargés, va permettre l'intégration des QACs dans cette membrane, ce qui conduit à la perte du matériel cytoplasmique et à la lyse cellulaire tel que résumé dans la figure 11 (Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012, Jennings, Minbiole et al. 2015). Les QACs vont solubiliser les composants de la membrane par la formation d'agrégats micellaires et peuvent également conduire à la rupture et la dénaturation de la structure des protéines et des enzymes (Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012) (figure 12).

Étant donné que les QACs agissent sur la membrane phospholipidique des bactéries, ils seraient plus efficaces contre les bactéries Gram positifs du fait de la présence d'une seule membrane phospholipidique et d'une paroi de peptidoglycanes (Jennings, Minbiole et al. 2015).

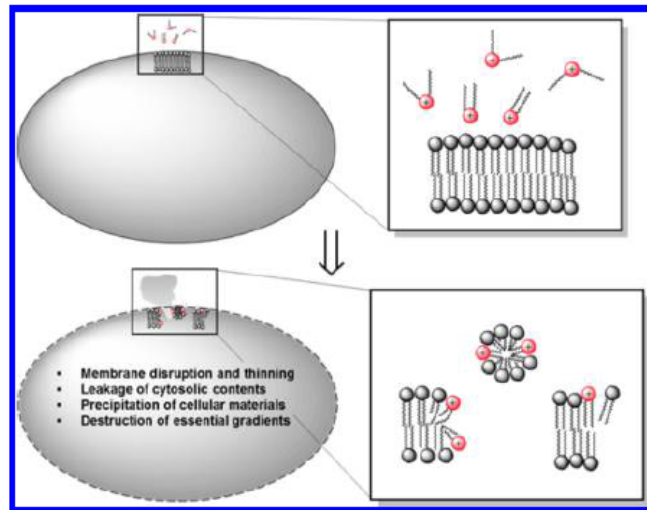


Figure 12 : Schématisation du mécanisme d'action des QACs sur les bactéries (Jennings, Minbiole et al.2015)

II.6.2.3 Développement de la résistance aux QACs

La faible réactivité des QACs et leur longévité font que ces molécules sont accumulées dans l'environnement, ce qui expose les bactéries à des concentrations sous-létales de ce désinfectant et par conséquent induit le développement d'une résistance (Jennings, Minbiole et al. 2015). Plusieurs mécanismes de résistance aux QACs ont été décrits tels que la réduction de l'expression de porines chez certaines bactéries Gram négatif comme *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Salmonella* (Tabata, Nagamune et al. 2003, Bore, Hebraud et al. 2007, Karatzas, Randall et al. 2008). La présence d'éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les transposons et les intégrons ont été aussi associés à des concentrations minimales inhibitrices élevées. Un autre mécanisme de résistance, lié à l'expression des pompes à efflux, a été décrit pour beaucoup de

bactéries notamment chez *L. monocytogenes* (Romanova, Wolffs et al. 2006, Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012).

II.6.2.4 Résistance par la surexpression de pompes à efflux

Les protéines pompe à efflux sont considérées comme des protéines de multi-résistance (MDR), car elles confèrent une résistance à de nombreux biocides dont les QACs (Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012). Les protéines du type pompe à efflux ont pour fonction d'extruder les biocides de l'intérieur de la bactérie, elles sont subdivisées en deux superfamilles : les ABC (ATP-Binding-Cassette) transporteurs qui sont des transporteurs primaires et les familles utilisant le potentiel électrochimique membranaire qui sont des transporteurs secondaires appartenant aux familles SMR (Small Multidrug Resistant), MFS (Major facilitator Superfamily), RND (Resistant-Nodulation-Division) et MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion) (AIRES 2011). Il y a donc des pompes à efflux qui utilisent leur propre énergie soit par la dissipation du gradient de protons (SMR, MFS, RND), d'ions Na^+ (MATE) ou par hydrolyse de l'ATP (ABC) tel que schématisé dans la figure 13.

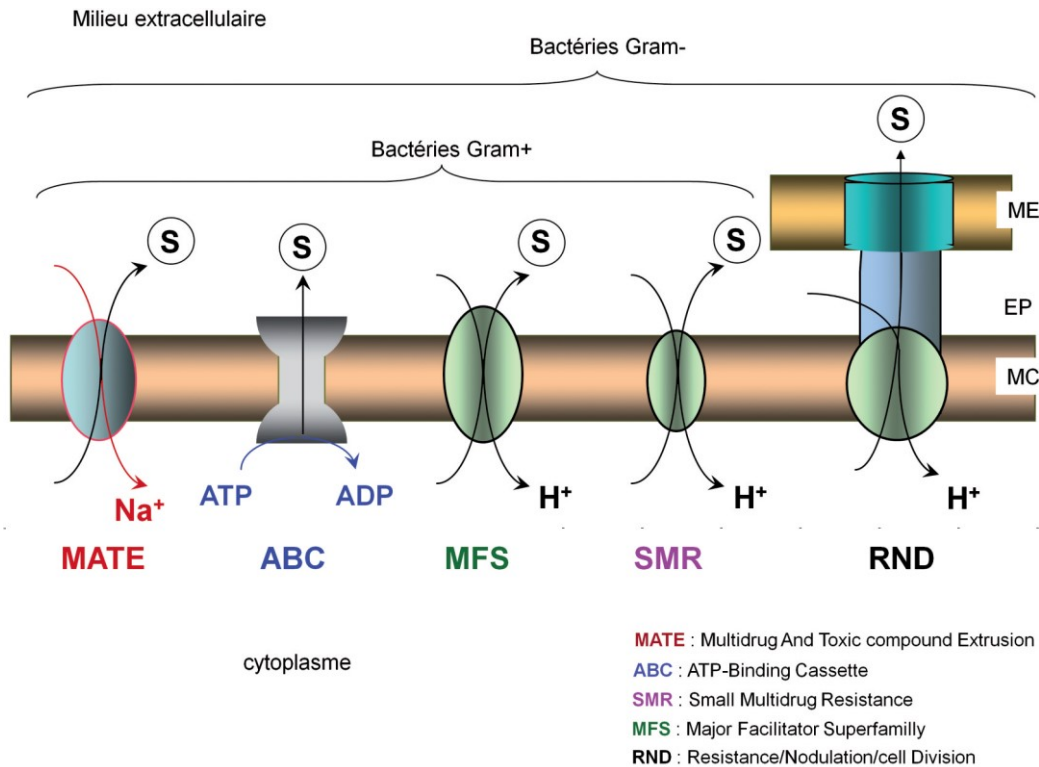


Figure 13 : Schématisation des familles de pompes à efflux présentes chez les bactéries Gram positif et négatif (AIRES 2011).

II.6.2.5 Mécanismes de résistance chez *Listeria monocytogenes*

Le mécanisme de résistance aux QAC relié à la surexpression des pompes à efflux est le mécanisme le plus étudié chez *L. monocytogenes* (Aase, Sundheim et al. 2000, Romanova, Wolffs et al. 2006). Les premières pompes à efflux à avoir été associées à la résistance aux QACs ont été les MdrL (multidrug resistant *Listeria*), responsables de la détoxification des macrolides et céfotaximes ainsi que les métaux lourds et le Bromure d'ethidium et les Lde (*Listeria* drugs efflux) responsables de la résistance aux fluoroquinolones et aux agents intercalant de l'ADN (Mata, Baquero et al. 2000, Mereghetti, Quentin et al. 2000, Godreuil, Galimand et al. 2003).

L'acquisition des pompes à efflux se fait à travers des éléments génétiques mobiles et recombinaison par transfert horizontal, le plus souvent impliquant des phages ou d'autres

espèces de *Listeria*, ou même d'autres espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*, (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016).

Il existe plusieurs systèmes à efflux liés à la résistance aux QACs chez *L. monocytogenes* lesquels sont acquis soit à travers un transposon tel que le *qacH* par le transposon Tn6188 (Müller, Rychli et al. 2013) ou encore par l'acquisition de plasmides tels que le système *bcrABC* véhiculé par le plasmide pLM80 (Elhanafi, Dutta et al. 2010). D'autres systèmes de pompes à efflux originaires retrouvés chez les staphylocoques telles que *qacA/B* (Xu, Li et al. 2014) ou dans d'autres espèces de *Listeria* sont retrouvés également chez *L. monocytogenes* (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016). Alors que le système *qacA/B* appartient à la famille des MFS (Paulsen, Brown et al. 1996), tous les autres systèmes de pompes à efflux codant pour la résistance au benzalkonium chloride (BC), un QAC très utilisé dans les industries agroalimentaires, font partie de la famille des SMR (Jiang, Yu et al. 2016). Un autre gène, *emrE*, de résistance au QAC a été récemment décrit et code pour une nouvelle pompe à efflux qui est retrouvée majoritairement dans le sérotype 1/2a au Canada (Kovacevic, Ziegler et al. 2016).

D'autres mécanismes peuvent également intervenir dans la résistance de *L. monocytogenes* aux QACs et sont liés à la modification des acides gras et des phospholipides membranaires, ce qui conduit à une surface cellulaire plus anionique et plus hydrophobe (Fox, Leonard et al. 2011). Ce mécanisme rend le passage des QACs à travers la membrane plus difficile par la réduction de la perméabilité membranaire (To, Favrin et al. 2002). Par ailleurs, de récentes études ont démontré que des concentrations sous-létales des antimicrobiens augmentent le stress oxydatif dû à l'augmentation de la concentration des radicaux libres, ce qui va promouvoir l'activation de plusieurs cascades génétiques comme l'apparition de mutations, celles-ci vont déclencher la réponse SOS (Rodríguez-López, Rodríguez-Herrera et al. 2018).

II.6.2.6 Association entre la résistance aux QACs et la persistance de *Listeria monocytogenes*

Plusieurs études ont rapporté la résistance de certaines souches de *L. monocytogenes* aux QACs et plus spécifiquement au BC dans différentes industries agroalimentaires et dans plusieurs pays. En effet la résistance au BC a été constatée dans 7 à 79 % des isolats (Aase, Sundheim et al. 2000, Tamburro, Ripabelli et al. 2015, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016, Meier, Guldimann et al. 2017). Dans ces études le nombre d'isolats étudiés est variable ce qui peut expliquer la grande variabilité de la fréquence de résistance au BC. D'autre part, les conditions d'isolement de *L. monocytogenes* peuvent également influencer la fréquence de résistance, tel que l'isolement après nettoyage et désinfection dans le cas de l'étude d'Ortiz et al (Ortiz, López-Alonso et al. 2016) où la fréquence de résistance au BC est la plus élevée (79 %). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du BC, dans le cas des souches résistantes, étaient entre 4 et 32 mg.L⁻¹, mais la CMI la plus fréquente pour ces isolats, toutes études confondues, oscille autour de 10 mg.L⁻¹ (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016).

Il est important de noter que même si les souches de *L. monocytogenes* sont considérées résistantes aux QACs, elles restent sensibles aux concentrations d'usage dans les industries, qui sont entre 200-1000 ppm et qui sont bien supérieures aux CMI trouvées dans toutes ces études (Fox, Leonard et al. 2011, Tezel and Pavlostathis 2015, Moretro, Schirmer et al. 2017). Ce paradoxe est lié à la fois à l'environnement dans lequel les souches de *L. monocytogenes* sont présentes et aux caractéristiques de certains QACs. En effet, dans les industries agroalimentaires les surfaces sont souvent humides, particulièrement lors du nettoyage, ce qui a pour effet de diminuer les concentrations des QACs et qui a pour conséquence l'exposition des bactéries présentes à des concentrations sous-létales (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016). De plus, des caractéristiques de biodégradabilité de certains désinfectants peuvent aussi influencer l'apparition de la résistance. En effet, il a été rapporté que les QACs ne sont pas biodégradables en conditions aérobies ce qui conduit à leur accumulation dans l'environnement et ce qui a pour conséquence des fluctuations dans les concentrations réelles de ces QACs (sublétales, inhibitrices, surlétales) dans les installations. Cette fluctuation peut conduire à l'apparition de la résistance (Tezel and Pavlostathis 2015).

Bien que la résistance au BC ait été retrouvée dans plusieurs souches de *L. monocytogenes* et dans plusieurs environnements d'industries agroalimentaires, il y a encore

très peu d'études qui ont démontré une association entre la résistance aux QACs et la persistance des souches de *L. monocytogenes* (Aase, Sundheim et al. 2000, Lunden, Autio et al. 2003, Fox, Leonard et al. 2011, Ortiz, López et al. 2014, Ortiz, López-Alonso et al. 2016). De plus, seulement une étude a pu démontrer la présence d'un déterminant génétique dans la souche de *L. monocytogenes* résistante au BC, qui est aussi persistante (Ortiz, López-Alonso et al. 2016), alors que dans les autres études, seule une association phénotypique entre la résistance au BC et la persistance des souches de *L. monocytogenes* a pu être observée (Aase, Sundheim et al. 2000, Lunden, Autio et al. 2003, Fox, Leonard et al. 2011).

La majorité des études ont montré que le gène de résistance *qacH* est prédominant. En effet, sur 26 profils MLVA des isolats de *L. monocytogenes* identifiés collectés dans l'industrie de viande et de saumon en Norvège, 5 profils avaient le gène *qacH* alors que seulement un profil portait la cassette *bcrABC* (Moretro, Schirmer et al. 2017). Dans d'autres études, alors que la résistance au BC était entre 10 et 12 %, parmi 392 isolats issus de Suisse et de Finlande respectivement, plus de 50 % des isolats portaient le gène *qacH* alors que le gène *bcrABC* était présent dans seulement 16,7 % des isolats (Meier, Guldimann et al. 2017). Il est intéressant de noter que dans cette étude, une souche provenant de Finlande portait le gène *emrE* jusqu'alors décrit seulement au Canada (Meier, Guldimann et al. 2017).

II.6.3 Interaction entre différentes espèces microbiennes

Comme tous les êtres vivants, les bactéries interagissent avec d'autres espèces bactériennes ou de champignons, mais aussi avec de nombreux organismes végétaux et animaux (SELOSSE Marc-André 2019). Ces interactions peuvent être bénéfiques (mutualisme), néfastes (exclusion) ou neutres. Ces interactions dépendent de nombreuses conditions, mais la disponibilité des nutriments est considérée comme un facteur majeur qui peut déterminer le type d'interaction entre une espèce bactérienne et une autre, ou plusieurs autres espèces (Ghoul and Mitri 2016). La production de substances telles que les bactériocines et les antibiotiques par des bactéries est également un facteur qui intervient dans la formation d'une communauté bactérienne spécifique selon l'effet de ces substances sur les espèces présentes dans l'environnement de la bactérie en question (Riley 2011).

II.6.3.1 Les différents types d'interaction entre bactéries

a) Mutualisme

Depuis longtemps et en se basant sur les théories darwiniennes, il était accepté que des espèces peuvent coexister au sein d'un environnement donné. Si ces dernières recourent à des ressources différentes, il n'y a alors aucun effet de compétition entre celles-ci. Ainsi, l'idée que deux espèces très proches phylogénétiquement puissent coexister n'était pas acceptée (Gause 1932, Darwin 2004). Cependant, l'observation d'une cooccurrence entre espèces apporte une autre vision de l'interaction entre les espèces. La question du rôle de la cooccurrence dans la formation et construction d'une communauté a été posée (den Boer 1986). Plusieurs exemples de coopération entre espèces bactériennes ont depuis émergé (Lotem, Fishman et al. 1999, Kosaka, Uchiyama et al. 2006, Fuhrman 2009, Marx 2009, Hibbing, Fuqua et al. 2010). Par exemple l'espèce *Pelotomaculum thermopropionicum* interagit avec *Methanothermobacter thermotautrophicus* pour produire le méthane grâce à la stimulation de cette dernière par des protéines telle que FlipD de *P. thermopropionicum*, de même qu'une bactérie non mobile épibionte entoure "*Chlorochromatium aggregatum*, ou encore *Pseudomonas putida* va croître au-dessus des colonies d'*Acinetobacter sp* pour recevoir des métabolites tel qu'illustré dans la figure 14 (Marx 2009). Cependant, il est admis que plus des espèces se ressemblent phylogénétiquement plus le phénomène de compétition va se développer du fait de la similarité et la finitude des ressources en nutriments (Zelezniak, Andrejev et al. 2015).

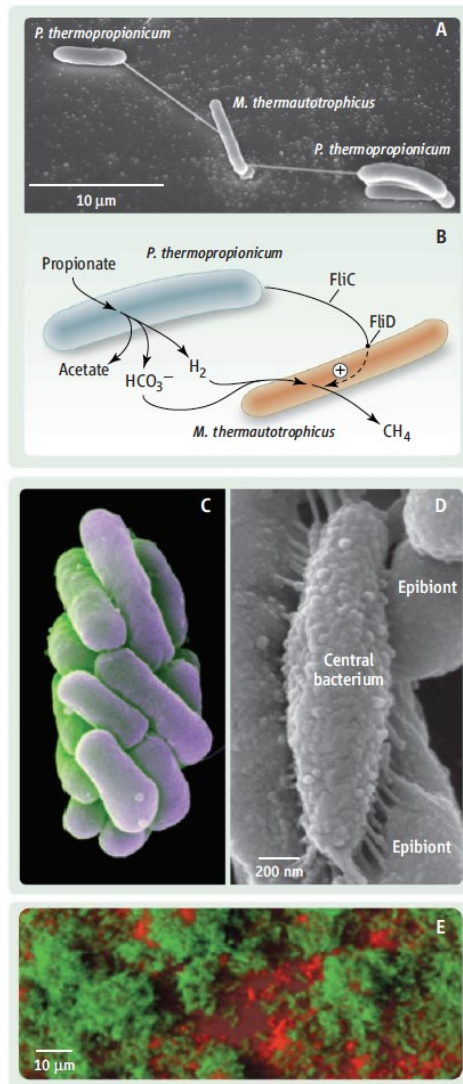


Figure 14 : Représentation des exemples de symbiose entre deux espèces bactériennes, le flagelle de *P. thermopropionicum* adhère à *M. thermautotrophicus* (A) pour faciliter les échanges de gaz H₂ entre les deux microorganismes. De plus, la protéine FliD se situant à la surface du flagelle de *P. thermopropionicum* stimule le processus de méthanogénèse par la bactérie *M. thermautotrophicus* (B). La bactérie motile *C. aggregatum* est entouré d'un épibionte non mobile (C). Une interaction entre *Pseudomonas putida* (en vert) qui croît au-dessus de la bactérie *Acinetobacter* sp souche C6 (en rouge) à partir de laquelle elle reçoit des métabolites (D). Figure et légende reprises et adaptées de Marx et al (Marx 2009).

b) Exclusion : compétition

La compétition est un type d'interaction qui mène à une exclusion, elle va prendre naissance dans un environnement où les nutriments sont limitants et en présence de populations bactériennes ayant les mêmes exigences nutritionnelles (Hibbing, Fuqua et al. 2010). Ghoul and Mitri (2016) a décrit des conditions où la compétition peut survenir (figure 15). Plusieurs facteurs environnementaux vont déterminer si ces conditions seront réunies pour conduire à une apparition d'une forte ou faible sélection par la compétition (Ghoul and Mitri 2016). Ainsi, un environnement avec des ressources nutritionnelles et des niches diversifiées et multiples peuvent réduire la pression de sélection par une compétition (Kinkel, Schlatter et al. 2013). Tel que décrit plus haut, plus des espèces sont proches phylogénétiquement plus elles vont tendre vers les mêmes ressources nutritionnelles ce qui va conduire à une forte sélection pour la compétition. Inversement, les espèces avec des phylogénies éloignées tendent vers des ressources nutritionnelles différentes et donc à coexister avec des interactions positives ou neutres (Hardin 1960, Mitri and Richard Foster 2013).

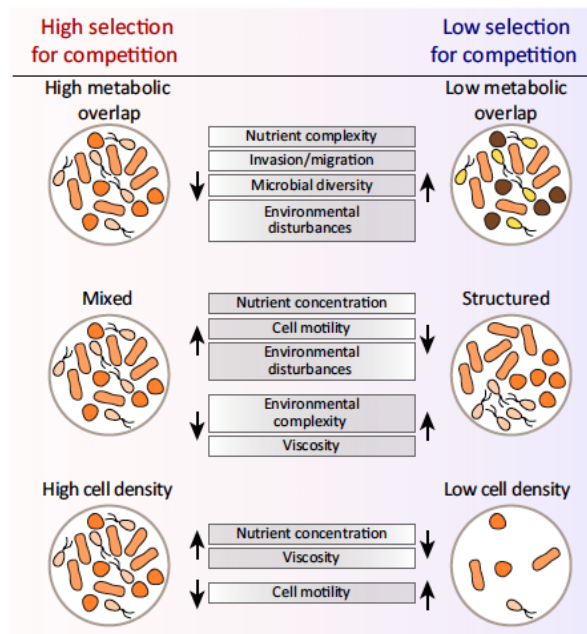


Figure 15 : Modélisation des conditions conduisant à l’acquisition ou l’expression d’une compétition entre des espèces bactériennes. Image reprise de Ghoul et al 2016 (Ghoul and Mitri 2016).

Les bactéries expriment le phénomène de compétition de deux façons principales : indirectement, en consommant les ressources nutritionnelles limitantes ou directement impliquant l’élimination de l’organisme (Ghoul and Mitri 2016).

Dans le premier cas (compétition indirecte), l’espèce compétitrice va consommer les nutriments qui sont limitants dans l’environnement au détriment d’autres espèces grâce à l’augmentation de la prise de nutriments ou à la sécrétion de produits qui permettent le stockage de ces nutriments (Ghoul and Mitri 2016). C’est le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* qui vont s’orienter vers un métabolisme respiratoire (en présence d’oxygène) générant un taux de croissance élevé, mais un faible rendement, ce qui va leur permettre d’absorber les nutriments plus rapidement que leur compétiteur (Pfeiffer, Schuster et al. 2001, Vulić and Kolter 2001, MacLean and Gudelj 2006). Dans le second type de compétition (directe), les bactéries compétitrices peuvent sécréter des substances qui leur permettent soit de digérer les nutriments ou d’exploiter des produits sécrétés par d’autres bactéries tels les sidérophores (Kümmerli, Griffin et al. 2009, Cordero, Ventouras et al. 2012, Morris, Lenski et al. 2012, Ghoul, West et al. 2014, Morris 2015) ou encore la sécrétion de molécules de quorum sensing qui vont coordonner l’expression des exo-facteurs (Diggle, Griffin et al. 2007, Schuster, Joseph Sexton et al. 2013). Le tableau 4 montre des exemples de facteurs impliqués dans la compétition des bactéries.

Tableau 4 : Exemples de phénotype exprimés par les bactéries lors des phénomènes de compétition. Tableau adapté de Ghoul and Mitri (2016).

Phénotype lié à la compétition	Exemple de molécule sécrétée	L’effet de la compétition	Références
Sécrétion d’enzymes digestives	Protéases	Améliore l’accès aux nutriments	A

Sécrétion de siderophores	Pyoverdin	Améliore l'accès aux nutriments	B
Altération de régulation du métabolisme	-	Améliore l'accès aux nutriments	C
Réduction de l'expression de gènes nécessitant une grande énergie	Réduction ou non-sécrétion de molécules dont toute la communauté peut bénéficier, ex enzymes digestives et sidérophores	Exploitation de l'énergie dépensée par les autres bactéries	D
Sécrétion de molécules structurales et de motilité	Surfactants, rhamnolipides, EPS, protéines, ADN, molécules d'adhésion et anti-adhésion	Améliore l'accès à l'espace	E
Production d'Antibiotiques	Bactériocines, toxines, peptides	Élimination des bactéries compétitrices	F
Système de sécrétion de type VI (T6SS)	Structures libérant des protéines effectrices qui sont létales.	Élimination des bactéries compétitrices	G
Production de molécules non-biocides	Surfactant, molécules d'anti-adhésion,	Perturbation d'autres phénotypes	H

	nucléases, protéases	liés à la compétition	
Inhibition du quorum sensing	Inhibiteurs du quorum sensing	Perturbation d'autres phénotypes liés à la compétition	I

A : (Diggle, Griffin et al. 2007, Rendueles and Ghigo 2012), **B** : (Griffin, West et al. 2004, Scholz and Greenberg 2015), **C** : (Pfeiffer, Schuster et al. 2001, Vulić and Kolter 2001, MacLean and Gudelj 2006, Kotte, Volkmer et al. 2014, Ackermann 2015), **D** : (Griffin, West et al. 2004, Gore, Youk et al. 2009, Cordero, Ventouras et al. 2012, Diard, Garcia et al. 2013), **E** : (Whitchurch, Tolker-Nielsen et al. 2002, An, Danhorn et al. 2006, Nadell and Bassler 2011, Romero, Traxler et al. 2011, Kim, Racimo et al. 2014, Schluter, Nadell et al. 2015), **F** : (Chao and Levin 1981, Riley and Gordon 1999, Kerr, Riley et al. 2002), **G** : (MacIntyre, Miyata et al. 2010, Basler, Ho et al. 2013, Russell, Peterson et al. 2014, Borgeaud, Metzger et al. 2015), **H** : (Valle, Da Re et al. 2006, Mowat, Rajendran et al. 2010, Jiang, Li et al. 2011, Rendueles, Travier et al. 2011), **I** : (Dong, Gusti et al. 2002, Thevenot, Delignette-Muller et al. 2005, Musthafa, Saroja et al. 2011).

II.6.3.2 Écosystème microbien des surfaces de découpe des viandes

Une grande diversité bactérienne, incluant des bactéries pathogènes et des bactéries d'altération, font partie de l'écosystème de l'environnement des industries agroalimentaires (Fagerlund, Møretro et al. 2017). Ce groupe de bactéries est défini selon une étude comme un consortium de micro-organismes (qui peut inclure occasionnellement des pathogènes) se développant à l'intérieur d'une période de temps défini et qui dépendent de la disponibilité de l'eau et des nutriments ainsi que des cycles de nettoyage et désinfection (Holah, Bird et al. 2004). Parmi les pathogènes, *L. monocytogenes* apparaît particulièrement adaptée à ces conditions et y est rencontrée très régulièrement.

Il n'y a cependant jusqu'à présent que très peu d'études décrivant la « flore » résiduelle (*i.e* des bactéries se retrouvant sur les surfaces des industries agroalimentaires après nettoyage et désinfection) dans les industries agroalimentaires et surtout sa possible interaction avec *L. monocytogenes*. Les études réalisées jusqu'alors se sont très majoritairement basées sur des cultures microbiologiques non sélectives (Bremer, Monk et al. 2001, Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017, Heir, Møretro et al. 2018). Seules certaines de ces études ont utilisé la technologie métagénomique 16S (séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S) afin d'identifier les genres et espèces bactériennes qui constituent cette communauté de bactéries (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017, Heir, Møretro et al. 2018).

Dans ce consortium microbien, la croissance de *L. monocytogenes* peut être favorisée ou au contraire inhibée. Il peut même ne pas y avoir d'interaction en fonction du type de micro-organisme présent et des conditions de l'environnement (Langsrud, Moen et al. 2016). En effet, des études ont démontré que certaines bactéries telles que *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fulorescens* (Fagerlund, Møretro et al. 2017), *Flavobacterium spp* (Bremer, Monk et al. 2001), peuvent favoriser la croissance de *L. monocytogenes* au sein d'un biofilm, ce qui favoriserait sa persistance, alors que d'autres ont démontré une compétition entre *L. monocytogenes* et la microflore issue du biofilm de claies d'affinage de fromage en bois (Guillier, Stahl et al. 2008, Mariani, Oulahal et al. 2011). Il est cependant difficile d'extrapoler les résultats de ces études, car elles sont conduites dans des conditions bien éloignées de celles des industries agroalimentaires et plus particulièrement de l'industrie de viande (Langsrud, Moen et al. 2016).

II.6.3.3 Description du microbiote de la surface des viandes par séquençage de nouvelle génération

L'analyse de la composition de la communauté bactérienne basée sur l'ARN 16S consiste à séquencer des régions variables du gène codant pour l'ARN 16S des bactéries présentes dans un échantillon donné. L'utilisation des séquences produites permet, par questionnement bio-informatique de bases de données, l'identification taxonomique et la comparaison de composition et/ou de structure de ces écosystèmes microbiens.

L'analyse phylogénétique basée sur la variabilité du gène codant l'ARN16S date de très longtemps (Fox, Magrum et al. 1977, Gupta, Lanter et al. 1983) mais à cette époque, c'était le gène de l'ARN 16 entier d'environ 1500pb qui était séquencé. Avec l'arrivée des technologies de séquençage à haut débit, seul un nombre limité de régions variables de ce gène sont séquencées (Chakravorty, Helb et al. 2007).

Le gène de l'ARN 16s est conservé chez tous les procaryotes et code l'ARN de la sous-unité ribosomale 30S. Ce gène est composé de sept régions conservées chez toutes les espèces et de neuf régions hypervariables (Chakravorty, Helb et al. 2007). Ces régions hypervariables sont utilisées pour l'identification des communautés microbiennes dans le cas du séquençage à haut débit et comme ce dernier ne permet de séquencer que des fragments courts allant de 450 à 550 pb, un maximum de trois régions hypervariables peut être séquencé (Kim, Morrison et al. 2011). D'une étude à une autre, le choix de ces régions hypervariables est différent. Selon Kim et al (2011) la région V1-V4 donnerait une meilleure précision de l'analyse phylogénétique alors que dans une autre étude ça serait les régions V4-V6 qui sont les plus précises (Yang, Wang et al. 2016).

L'avantage du séquençage à haut débit dans l'identification de la communauté bactérienne présente à la surface des salles de découpe des viandes est qu'elle permet d'identifier de manière plus précise et plus extensive les genres bactériens présents dans un échantillon (Caporaso, Lauber et al. 2011). Cette technique permettrait donc de mieux comprendre les différentes interactions entre les bactéries au sein d'une communauté.

II.6.4 Formation de niches écologiques

Les premiers auteurs à évoquer la formation de niches écologiques comme une cause de la persistance de certaines souches de *L. monocytogenes* ont été Carpentier et Cerf (2011). Ces auteurs ont conclu que devant l'absence de lien robuste et de caractéristiques particulières de *L. monocytogenes* à savoir la formation de biofilm et la résistance aux désinfectants avec sa persistance, cette dernière est liée à la formation de niches écologiques dans des sites et équipements des industries agroalimentaires. Une conclusion qui a aussi été avancée par

Ferreira, Wiedmann et al. (2014) qui indiquent que les caractéristiques de l'environnement lui-même peuvent être un déterminant critique pour la persistance de *L. monocytogenes*.

Les niches écologiques sont des sites dans l'environnement qui procurent des conditions pour la croissance et une protection des microorganismes contre les différentes conditions de stress (Carpentier and Cerf 2011). Dans un environnement agroalimentaire, ces niches permettent la réplication des microorganismes notamment *L. monocytogenes* bien que le nettoyage et la désinfection se fassent régulièrement (Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014).

Ces niches se forment dans des endroits qui peuvent être des appareils avec des structures complexes, équipements ou des endroits creux ou poreux et qui sont donc peu ou pas accessibles au nettoyage et la désinfection (Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014). D'après une étude, ces niches sont souvent spécifiques à une région ou un site particulier (Tompkin 2002). Une étude a démontré que *Listeria spp.* a une niche écologique orientée par l'environnement des industries agroalimentaires contrairement à certaines autres bactéries comme *E. coli*. Cela voudrait dire que c'est l'environnement qui est plus susceptible d'influencer la formation d'une niche pour *Listeria spp.* plutôt que le type des aliments produits dans une industrie selon une étude (Holah, Bird et al. 2004).

II.7 Réglementation sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments au Canada

Au Canada, le gouvernement et les industries sont tous les deux responsables, de façon complémentaire, du contrôle et de la prévention des pathogènes alimentaires dans les aliments consommés au pays (Farber, Kozak et al. 2011). Le gouvernement assume sa responsabilité par différentes actions qui sont de 1) promouvoir et protéger la santé des gens par l'innovation et l'action pour la santé publique, 2) s'assurer que les industries respectent leurs responsabilités en termes de salubrité alimentaire et ce 3) par l'inspection des aliments et par l'élaboration des normes, des règlements et des politiques reliés à la salubrité alimentaire ainsi qu'à la qualité

nutritionnelle de ces aliments (Farber, Kozak et al. 2011). C'est donc le gouvernement du Canada qui fixe les normes et les objectifs que les industries ont la responsabilité d'atteindre pour ce qui relève de la salubrité alimentaire selon les normes internationales du Codex (Farber, Kozak et al. 2011). Le gouvernement du Canada s'est donné une responsabilité particulière vis-à-vis du contrôle de *L. monocytogenes* dans les aliments.

Il est donc de la responsabilité des industriels de respecter les normes établies par le gouvernement quant à la présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement et les aliments en mettant en place un système de bonnes pratiques de fabrication (BPF) et en vérifiant qu'il est efficace dans le temps (Farber, Kozak et al. 2011) (<https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/legislation-lignes-directrices/politiques/politique-listeria-monocytogenes-aliments-prets-manger-2011.html>).

II.7.1 Contrôle de *Listeria spp.*

Le contrôle de *Listeria spp.* et/ou *L. monocytogenes* se fonde en partie sur l'analyse des résultats de tests réalisés sur des échantillons d'environnement (pour *Listeria spp.*) des industries et sur des produits (prêt-à-manger (PAM) catégorisés comme à risque) (pour *L. monocytogenes*). La réglementation mise en vigueur en 2011 a classé les différents aliments en catégories en fonction de leur capacité à permettre une croissance à *L. monocytogenes*. Ainsi les aliments PAM qui permettent la croissance de *L. monocytogenes*, même à des températures/durée de réfrigération ne garantissant pas une concentration finale inférieure à 2 Log UFC/g, sont dans la catégorie prioritaire pour le contrôle de *L. monocytogenes* (Farber, Kozak et al. 2011). Les aspects contraignants de la politique de Santé Canada ne concernent que ces derniers (catégorie 1). Dans la politique de Santé Canada les produits de catégorie 1 sont considérés comme de haute priorité car ils permettent la croissance de *L. monocytogenes* pendant la durée de conservation; donc ces produits peuvent présenter un risque sur la santé. Les produits de catégorie 2 sont de priorité moyenne à faible, car une croissance limitée de *L. monocytogenes* égale ou inférieure à 100 UFC/g peut arriver pendant la durée de conservation du produit. Dans cette dernière catégorie, il y a deux sous-catégories de PAM; catégorie 2A et 2B. La catégorie

2A est considérée comme moyenne à faible, les aliments sont connus pour contenir de faibles charges de *L. monocytogenes* et leur durée de conservation est inférieure ou égale à cinq jours. La catégorie 2B est de faible priorité, car la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas possible (i.e inférieur à 0.5 UFC/mg) pendant la durée de conservation tel que résumé dans le tableau 5 (Canada 2011).

Tableau 5 : Description des niveaux de priorités des aliments tels qu'établis par Santé Canada.

Catégories	Niveau de détection de <i>L. monocytogenes</i>	Niveau de priorité
1) La croissance de <i>L. monocytogenes</i> est possible durant la durée de conservation de l'aliment.	Détectée dans 125 g d'aliment	Haute priorité
2A) Une croissance limitée à 100 UFC/g ou moins est possible durant la durée de conservation.	100 CFU/g	Moyenne à faible priorité
2B) La croissance de <i>L. monocytogenes</i> n'est pas possible durant la durée de conservation de l'aliment		Faible priorité

II.7.2 Contrôle dans l'environnement des industries

L'importance de considérer la présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries, incluant les surfaces en contact ou non avec les aliments, a été soulignée dans de précédentes études (Tompkin 2002, D'AMICO and Donnelly 2008, Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014). De plus, l'écllosion de listériose la plus grave à survenir au Canada en 2008 était liée à une contamination des aliments PAM par l'environnement de l'industrie (Currie, Farber et al. 2015). Les directives de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) pour les industries de transformation de la viande vis-à-vis du contrôle de *L. monocytogenes* dans l'environnement des PAM de catégorie 1 consiste, depuis l'évolution de la politique suite à cette crise majeure, en l'obligation pour les industriels de procéder à des tests d'environnement pour vérifier l'absence de *Listeria spp.* sur les surfaces en contact ou non avec les aliments après nettoyage et désinfection, mais également en cours de production (ACIA 2018). Cette directive permet aux industriels de vérifier l'efficacité de leur système HACCP

(Farber, Kozak et al. 2011). Étant donné le caractère ubiquiste de *L. monocytogenes* et les analyses de risques déjà établies à l'effet que des surfaces non en contact avec les aliments peuvent contaminer les autres surfaces, notamment celles en contact avec les aliments PAM (D'AMICO and Donnelly 2008), des tests sur la présence de *Listeria spp.* sur ces surfaces sont également recommandées. Ceci souligne l'importance de la maîtrise de la contamination environnementale par les industries dans le contrôle de *L. monocytogenes* (Farber, Kozak et al. 2011). Selon le type de PAM produit, c'est-à-dire dans quelle catégorie appartient l'aliment, la fréquence des tests varie. Si ces tests s'avèrent positifs, une recherche de *L. monocytogenes* est entreprise sur les produits, des actions correctrices doivent être entreprises par les industriels (ACIA 2018).

II.7.3 Contrôle des aliments PAM

II.7.3.1 Facteurs de risque

Parmi les mesures de contrôle de *L. monocytogenes* que le gouvernement du Canada ainsi que la province du Québec ont mis en place, la croissance de *L. monocytogenes* dans un produit PAM dépend des caractéristiques physico-chimiques de ce dernier. Cette croissance est établie à travers des études de tests de provocation qui consistent à déterminer si *L. monocytogenes* est capable de se multiplier dans l'aliment testé (Canada 2012). Ces caractéristiques concernent la température de conservation de l'aliment PAM, l'activité de l'eau (a_w) et le pH. Toutefois, il n'est pas nécessaire de tester tous les aliments PAM si des études ont déjà démontré que *L. monocytogenes* ne peut pas croître dans les conditions que ces produits présentent (Canada 2011, Álvarez-Ordóñez, Leong et al. 2015). Le tableau VI regroupe les différents paramètres et combinaisons de paramètres qui favorisent ou non une croissance de *L. monocytogenes*.

Tableau 6 : Tableau regroupant les différentes caractéristiques des aliments PAM permettant ou pas la prolifération de *L. monocytogenes* pendant la durée de conservation de ces aliments. Adapté de (Canada 2011).

Caractéristiques	Aliment permettant la multiplication de <i>L. monocytogenes</i>	Aliment ne permettant pas la multiplication de <i>L. monocytogenes</i>
a_w	>0,92 peu importe le pH	<0,92 peu importe le pH
pH	>4,4 peu importe l'a _w	<4,4 peu importe l'a _w
a_w et pH	>0,94 et pH>5,0	<0,94 et pH<5,0
Mode de conservation	Réfrigéré	Congelé immédiatement après la préparation (pendant toute la période où l'aliment demeure dans cet état)
Démonstration par le fabricant que <i>L. monocytogenes</i> ne prolifèrera dans l'aliments pour sa durée de vie¹	Absente	Satisfaisante

1 : La confirmation de la non-vulnérabilité à la croissance doit tenir compte de l'erreur de mesure de la méthode de quantification. Un aliment dans lequel, par ensemencement direct sur milieu gélosé, le nombre de *L. monocytogenes* n'augmente pas de plus d'un demi-facteur 10 de bactéries/g pendant sa durée de conservation prévue dans des conditions raisonnables de distribution, d'entreposage et d'utilisation, est considéré comme non vulnérable à la prolifération de *L. monocytogenes*.

L'échantillonnage des produits PAM se fait en même temps que celui de l'environnement des surfaces en contact avec ceux-ci. L'ACIA retient tous les produits PAM testés positifs à *L. monocytogenes* (Farber, Kozak et al. 2011). Pour les produits importés, le but de l'ACIA est d'assurer le même niveau de protection de la santé du consommateur que pour les produits locaux. Cependant, il est difficile d'évaluer les BPF des produits fabriqués à l'extérieur du pays ; c'est pour cela que d'autres mesures sont mises en place comme le test des produits finis (Farber, Kozak et al. 2011).

Enfin, il est à noter que la réglementation sur la présence de *L. monocytogenes* dans les industries concerne seulement les industries du prêt-à-manger. Il n'y a donc actuellement que peu d'information sur le risque de contamination des produits PAM, directement ou indirectement par le biais des matières premières, particulièrement celles issues de l'industrie de viande où la prévalence de *L. monocytogenes* est la plus élevée selon les données récoltées des sites sentinelles dans le cadre de la surveillance de *L. monocytogenes* au Canada (FoodNet).

II.8 Résumé de la littérature, problématique et objectifs

Cette revue de littérature a permis d'approfondir notre compréhension de la virulence de *L. monocytogenes* et de la diversité des souches. De nouveaux facteurs de virulence pourraient expliquer en partie la surreprésentation de certaines souches de *L. monocytogenes* dans des cas de listériose invasive. Ainsi, les souches appartenant au sérotype 4b possèdent une hémolysine LLS qui leur permettraient d'avoir un certain avantage pour l'établissement de l'infection (Cotter, Draper et al. 2008). De plus, ces mêmes souches posséderaient également d'autres facteurs de virulence comme le système de transport et de phosphorylation des sucres qui leur permettraient de provoquer une neurolistériose (Maury, Tsai et al. 2016).

S'il y a bien des souches de *L. monocytogenes* dites hypervirulentes, d'autres souches de cette espèce bactérienne seraient vraisemblablement moins virulentes par une perte potentielle de la fonction de certains gènes de virulences essentiels pour établir une infection chez l'Homme tels que l'internaline A (Jacquet, Doumith et al. 2004, Nightingale, Windham et al. 2005, Nightingale, Milillo et al. 2007, Nightingale, Ivy et al. 2008, Kovacevic, Arguedas-Villa et al. 2013).

En plus d'être un pathogène intracellulaire facultatif, *L. monocytogenes* possède toutes caractéristiques nécessaires pour survivre et croître dans des conditions difficiles; cette bactérie peut donc se retrouver dans différents environnements, notamment dans ceux des industries agroalimentaires. La persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries agroalimentaires a été observée il y a très longtemps. Plusieurs études ont tenté d'expliquer le

phénomène de persistance de *L. monocytogenes* par certaines caractéristiques particulières, à savoir la capacité à former le biofilm, la résistance aux désinfectants et, plus récemment, à tirer parti des possibles interactions négatives et/ou positives avec le microbiote de l'environnement des industries.

Des études ont donc tenté de relier la persistance de certaines souches de *L. monocytogenes* à l'une des caractéristiques citées plus haut. Cependant, il est encore difficile d'identifier un déterminant précis relié à la persistance de ces souches. Par ailleurs, étant donné que *L. monocytogenes* est une bactérie d'environnement et considérant ses capacités remarquables à persister dans les industries agroalimentaires malgré le nettoyage et la désinfection, une nouvelle réglementation du Canada est entrée en vigueur en 2011 et vise le contrôle de ce pathogène dans de l'environnement. Elle est, depuis lors, obligatoire pour les industriels du PAM (Farber, Kozak et al. 2011).

Cependant, au Canada, il n'existe aucune surveillance ou contrôle de *L. monocytogenes* dans les abattoirs et les usines de découpe des viandes.

Encore aujourd'hui, il n'y a, à notre connaissance, pas d'information quant au risque de contamination des matières premières destinées à la transformation ou aux cuisines domestiques au Canada. Lors d'études réalisées notamment dans les pays européens, les auteurs ont souligné l'importance de considérer les matières premières comme une source importante de contamination de *L. monocytogenes* dans les industries de transformation.

Ce projet de thèse vise donc à apporter des connaissances nouvelles, au Canada, sur la contamination de l'environnement des abattoirs et des usines de découpe des viandes de porc. Ce projet a inclus quatre abattoirs et usines de découpe de porc localisés dans des régions différentes et qui représente 60% de la production de la province du Québec.

Les objectifs de ce projet sont de caractériser la diversité et la distribution des souches de *L. monocytogenes* isolées des abattoirs et usines de découpe de porc, d'étudier la persistance de ces souches par leur capacité à former le biofilm, leur résistance aux désinfectants et enfin

leurs interactions avec d'autres espèces bactériennes et, finalement, d'étudier l'association entre les profils génétiques des souches persistantes et leur détection dans les souches isolées d'aliments et des cas de listériose humaine.

III. Matériel et méthode

III.1 Article I

Distribution, diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* isolates in pork slaughterhouses and association between persistence attribute of strains and detection in clinical isolates

Tamazight Cherifi, Julie Arsenault, Franco Pagotto, Sylvain Quessy, Jean-Charles Côté
Kersti Neira, Sylvain Fournaise, Sadjia Bekal and Philippe Fravallo

Article en préparation pour soumission dans le journal Food microbiology

Contribution du candidat à la conception de l'article : J'ai participé activement au design expérimental de ce travail, à la réalisation des expérimentations et à l'interprétation des résultats. J'ai également rédigé cet article.

Abstract

Listeria monocytogenes is the etiological agent of listeriosis, a major foodborne disease. Meat contamination occurs frequently at the slaughterhouse. Our aims were; 1) to investigate the risk of contamination, distribution, and diversity (by serotyping, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis) of *L. monocytogenes* isolates in four swine slaughterhouses in Quebec; 2) to identify potential persistence of pulsotypes *L. monocytogenes* and estimate the association between these persistent pulsotypes and their detection in food and human clinical isolates in Quebec; and 3) to determine whether benzalkonium chloride (BAC) *bcrABC* resistance cassette and *emrE* multidrug transporter gene were more likely to be present in persistent *L. monocytogenes* isolates. Various operating areas within four slaughterhouses were sampled on four separate occasions over a 16-month period. A total of 2496 samples were tested, and *L. monocytogenes* was successfully isolated from 243 samples. The proportion of positive samples varied according to slaughterhouses and operation areas. A total of 476 *L. monocytogenes* isolates (from the 243 positive samples) were characterized by serotyping and ribotyping and 321 isolates by pulse-field gel electrophoresis. The majority of positive samples (222/243 or 91.4%) harbored isolates belonging to serotypes 1/2a, 1/2b and 1/2c. Fifty-eight different pulsotypes were identified, including 19 newly discovered, and not previously described. The pulsotype diversity varied according to season and between slaughterhouses. Eight, from the total of fifty-eight different pulsotypes, were present in samples collected during three or more sampling visits to the same slaughterhouse and were considered persistent. Isolates from six of these eight profiles harbored at least either the BAC *bcrABC* resistance cassette or the *emrE* multidrug transporter gene. From the ten and five PFGE profiles identified in food and human listeriosis cases respectively, five profiles (50%) and three profiles (60%) respectively were persistent, this was significantly higher than the 6.8% (n=29) and 11.8% (n=34) of the persistent profiles among those who have not been observed in food and human clinical cases, respectively. This study suggests that the risk of *L. monocytogenes* detection in processing surfaces is mainly slaughterhouse dependent in Quebec. Some strains, presenting persistence characteristics that could be associated

with BAC resistance mechanism, were identified in the food and clinical surveillance systems in Quebec.

Key words: benzalkonium chloride resistance, diversity, *Listeria monocytogenes*, swine slaughterhouse, persistence

Introduction

Listeria monocytogenes is a ubiquitous Gram-positive, rod-shaped, food-borne bacterial pathogen. It is the etiologic agent of listeriosis, an infection characterized by fever, muscle aches, nausea and diarrhea (Drevets and Bronze 2008). More severe cases can lead to sepsis, meningitis, encephalitis and even death (Charlier, Perrodeau et al. 2017). *Listeria monocytogenes* can contaminate raw fruits and vegetables, animal meat, unpasteurized dairy products and processed foods. It is a major concern for both food industry and public health (Kathariou 2002).

Swine slaughterhouses can become contaminated with *L. monocytogenes* and the bacteria can spread throughout the slaughterhouse, to pig carcasses, and eventually carry over to the pork meat processing plant (Nesbakken, Kapperud et al. 1996, Autio, Säteri et al. 2000, Thévenot, Dernburg et al. 2006, Lopez, Villatoro et al. 2008, Hellström, Laukkanen et al. 2010). A slaughterhouse can be generally divided into eight operation areas: lairage, stunning, slaughtering and bleeding, dehairing, evisceration, chilling and hanging, cutting and deboning, and freezing and delivery (Skaarup 1985), and each can become contaminated. Despite the cleaning and sanitary treatment, some *L. monocytogenes* strains can persist in the slaughterhouse and persistent strains have been shown to be responsible for repeated food contaminations (Lunden, Autio et al. 2003, Orsi, Borowsky et al. 2008, Fagerlund, Langsrud et al. 2016, Luo, Zhang et al. 2017). In USA, a year 2000 multi-state listeriosis outbreak was linked to a persistent *L. monocytogenes* strain first identified in a 1988 listeriosis case (Orsi, Borowsky et al. 2008).

Benzalkonium chlorides (BAC) are quaternary ammonium compounds (QAC). They are broad-spectrum hard surface disinfectants widely used in slaughterhouses (Kim, Weigand et al. 2018). *Listeria monocytogenes* persistent strains often harbor adaptation and resistance genes to BAC, including the *bcrABC* resistance cassette (Minarovičová 2018), and *emrE*, a multidrug transporter gene (Kovacevic 2016).

To the best of our knowledge, in Canada, no study has been carried on the distribution, diversity and persistence of *L. monocytogenes* isolates in swine slaughterhouses. Consequently, no information is available on the potential association between the presence of putative *L. monocytogenes* persistent isolates in swine slaughterhouses and human listeriosis cases in Canada.

Our objectives were three-fold: -1) to investigate the risk of contamination, the distribution and the diversity of *L. monocytogenes* isolates (by serotyping, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis) across the slaughtering process in four swine slaughterhouses; -2) to identify persistent *L. monocytogenes* isolates, study their prevalence, and to compare the PFGE profiles of persistent *L. monocytogenes* isolates with those isolated from food and human listeriosis cases; and -3) to determine whether persistent pulsotypes harbor benzalkonium chloride resistance and multidrug transporter genes.

Materials and Methods

Sampling procedures

Four swine slaughterhouses, labeled A, B, C and D, which cover 60 % (from 20000 to 37500 swine per week) of pork meat production in Quebec, Canada, were sampled four times with a four- to five-month interval between visits, over a 16-month period, from October 2013 to February 2015. All samples were collected at least 12h after in-site cleaning and sanitation, from six different operation areas within the slaughterhouses: lairage, slaughtering and bleeding, dehairing, evisceration, chilling and hanging and cutting and deboning. For each operation area, different surfaces, sites, machines and materials, whether in regular contact with animal carcasses and meat or not, were sampled and are listed in Supplementary file, Table S1. Samples from two operation areas, dehairing and evisceration, were grouped together for later analyses purposes under the label “dressing_evisc”. Depending on the sites, machines and materials, the sampling surface varied from 5 cm² for knives to 1 m² for conveyor belts, doors, walls and floors. Before swabbing, each sampling surface was brushed vigorously using a sterile toothbrush to resuspend any possible residues. Fisherbrand lab wipes (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), pre-soaked in a D/E (Dey-Engley) neutralizing broth (Innovation Diagnostic, Saint-Eustache, QC, Canada) to neutralize a broad spectrum of disinfectants and antiseptics, were used to swab all sampling surfaces. Following swabbing, each toothbrush and lab wipe pair was transferred into a Nasco Whirl-Pak bag (Fisher Scientific), put on ice, and brought to the lab.

Isolation of *L. monocytogenes*

First, 100 ml of a *Listeria* enrichment broth (LEB; University of Vermont Medium I; UVM-1; Innovation Diagnostics) was added into each Nasco Whirl-Pak bag containing a toothbrush and lab wipe, mixed using a Seward Stomacher 400C Lab Blender (Cole-Parmer, Montreal, QC, Canada) for 1 min, and incubated for 48 hr at 30°C. *Listeria monocytogenes* were isolated according to Pagotto (2001). Briefly, after 48 hr, positive LEB cultures were streaked on COMPASS *Listeria* agar (Innovation Diagnostics), and 10

mL of a second enrichment broth (modified Fraser broth; MFB; Innovation Diagnostics) were inoculated with 100 µL of negative cultures of LEB, UVM-1 primary broth at 35°C for 24 hr. Positive MFB cultures were streaked on selective COMPASS *Listeria* agar (Innovation Diagnostics) and incubated at 37°C for 24h.

Identification of *L. monocytogenes* isolates was done using by beta-hemolysis on sheep blood agar (Oxoid, Nepean, ON, Canada) and carbohydrate metabolism testing using xylose, rhamnose and mannitol. Two colonies per sample were randomly picked from sheep blood agar plates and their *L. monocytogenes* identity further confirmed by polymerase chain reaction, according to Kérouanton, Marault et al. (2010).

Characterisation of *L. monocytogenes*

Serotyping

Serotyping was done using the *L. monocytogenes* antisera for both O- and H-antigens (Denken Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions.

Ribotyping

Ribotyping was performed with restriction enzyme EcoRI using the RiboPrinter microbial characterization system (DuPont Qualicon, Wilmington, DE, USA), according to the manufacturer's instructions and as previously described (Bruce, Hubner et al. 1995).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing

One isolate per sample was selected for PFGE typing. This was performed according to the Center for Disease Control and Prevention (CDC) PulseNet standardized protocol for *L. monocytogenes* typing (Graves and Swaminathan 2001) using the clamped homogeneous electric fields (CHEF-DR III, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). DNA was cleaved with ApaI and AscI, (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada).

Salmonella Braenderup was used as a reference bacterial strain and size marker. The PFGE pulsotypes were compared against the PulseNet Canada database, housed at the National Microbiology Laboratory (NML, Winnipeg, MB, Canada).

Distribution of *L. monocytogenes*-positive samples

The proportion of *L. monocytogenes*-positive samples was described according to the seasons, slaughterhouses (A, B, C, D), operation areas, surfaces whether in contact with animal carcasses or not, and type of surface. A multi-level logistic regression was used to model the probability of detecting *L. monocytogenes* according to these five variables. The visit was included as a random effect. Laplace method was used for estimation and adjusted post-hoc test was performed for multiples comparisons using Tukey-Cramer tests. From the full model, a backward manual procedure was used to select the final model, using a $p > 0.05$ as a criterion for rejection. Analyses were performed using the GLIMMIX procedure of SAS v 9.4 (SAS Canada, Toronto, ON, Canada)

***Listeria monocytogenes* pulsotype diversity**

A PFGE dendrogram was created using a combination of the PFGE fingerprints of both enzymes with BioNumerics version 6.06 (Applied Maths, Inc, Austin, TX, USA) based on the Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis of the Dice similarity coefficient at 1%. The diversity of pulsotypes according to the seasons, slaughterhouses and operation areas was described using rarefaction curves using iNEXT package (Hsieh, Ma et al. 2016) available on R v 3.5.2. To avoid bias due to the method of selection, only one pulsotype per positive sample was randomly selected.

Persistent *L. monocytogenes* isolate, frequency and distribution

A persistent *L. monocytogenes* strain was defined as a strain isolated at least three times in the same slaughterhouse over the 16-month sampling period, with a four- to five-month interval between each sampling visit, in accordance with Keto-Timonen, Tolvanen et al.

(2007) and Ortiz, López et al. (2010). A multilevel logistic regression was used to model the persistence of *L. monocytogenes* pulsotypes according to the slaughterhouses and operation areas, with the visit included as a random effect. The GLIMMIX procedure of SAS v 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used with Laplace estimation. This analysis was limited to *L. monocytogenes* positive samples, with one randomly selected isolate per sample.

Association between *L. monocytogenes* persistent strains in the swine slaughterhouses and food and human clinical isolates of *L. monocytogenes*.

Each *L. monocytogenes* pulsotype was classified either as persistent or not persistent based on criteria described above. They were compared with pulsotypes of *L. monocytogenes* isolates from food and human listeriosis cases in Quebec between the years 2000 and 2016 according to the database at the *Laboratoire de santé publique du Québec* (LSPQ; Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). The association between persistence (persistent vs. non-persistent) of the pulsotype and detection in food or human clinical cases, respectively, was evaluated using exact Chi-square. The PFGE pulsotype was used at the unit of analysis.

PCR amplification of benzalkonium chloride (BAC) *bcrABC* resistance cassette and *emrE* multidrug transporter gene from *L. monocytogenes* isolates

The presence of the benzalkonium chloride (BAC) *bcrABC* resistance cassette and the *emrE* multidrug transporter gene were screened by PCR on one randomly selected isolate per pulsotype. Briefly, colonies from selected isolates were transferred into a 1.5 ml microcentrifuge tube (FisherScientific), containing 50 µl of Chelex 100 resin (Bio-Rad) at 6% (w/v) and heated, first at 55°C for 30 min, second at 98 °C for 15 min, put on ice for 3 min and centrifuged for 5 min. The supernatant was transferred to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. The *bcrABC* and the *emrE* amplifications were done with primer pairs described by Elhanafi, Dutta et al. (2010) and Kovacevic, Ziegler et al. (2016), respectively, both using Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs)

according to the manufacturer's instructions. Amplification products were analyzed on a 1.5% agarose gel.

Benzalkonium chloride minimum inhibitory concentrations

Listeria monocytogenes resistance to BAC was confirmed phenotypically using a broth dilution assay to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) with minor modifications. Briefly, tryptic soy broth with yeast extract (TSBYE) supplemented with BAC (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at final concentrations ranging from 0 to 200 ppm (0, 0.78, 0.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200) was inoculated with 10^5 CFU of an overnight culture of *L. monocytogenes* using 96-well plates (Microtest Plate 96 well, Sarstedt, Montreal, QC, Canada). They were incubated at 30 °C for 48 h. The MIC was defined as the lowest concentration at which growth inhibition was visually observed. The assay was done in triplicate.

The association between resistance to BAC following amplification of either *bcrABC* or *emrE* and confirmed by MIC, and the following variables 1) persistence of the pulsotype and 2) exposure of the site to disinfectants (low vs. high), were tested at the pulsotype level using an Exact chi-squared test.

Results

Distribution of *L. monocytogenes*-positive samples

A total of 2496 samples were collected from different operation areas, including surfaces, sites, machines and materials, over a 16-month period within four swine slaughterhouses (Table 1 and Supplementary file, Table S1) and assayed for the presence of *L. monocytogenes*. The bacterium was successfully isolated from 243 samples (9.7 %). The proportion of *L. monocytogenes*-positive samples did not vary significantly according to seasons (Table 1). This proportion, however, varied according to slaughterhouses. Compared to slaughterhouse D, slaughterhouses A and C had significantly higher odds of *L. monocytogenes* positivity (odds ratios (OR) = 1.9 and 3.6; $p=0.05$ and $p<0.001$, respectively; Table 1). No other statistically significant difference was observed between slaughterhouses, at this level. The proportion of *L. monocytogenes*-positive samples varied according to the operation areas. Compared to the slaughtering and bleeding area, the odds of positivity were significantly higher in the dressing-evisc, a combination of the dehairing and evisceration areas (OR=5.7, $p<0.001$), in the chilling and hanging area (OR=5.5, $p<0.01$), and in the cutting and deboning area (OR=3.5; $p<0.001$; Table 1). No statistically significant association between the occurrence of *L. monocytogenes*-positive samples and surfaces in contact or not with animal carcasses and meat was revealed (Table 1). The proportion of *L. monocytogenes*-positive samples varied according to the sites, machines and materials. Compared to the materials, the conveyor belt top side, the conveyor belt bottom side, the environment, the machines, and the pens had higher odds of *L. monocytogenes* positivity (OR=2.7, 3.0, 3.0, 2.6 and 4.0, respectively; all $p\leq 0.05$; Table 1; Supplementary file, Table S1).

Characterisation of *L. monocytogenes* isolates

From each of the 243 *L. monocytogenes*-positive samples described above, two isolates were obtained, with exceptions, for a total of 476 *L. monocytogenes* isolates. They were characterized by serotyping and ribotyping. A sub-total of 212 samples (87.2%) contained

L. monocytogenes isolates from serotypes, 1/2a, 1/2b and/or 1/2c (Table 2). A total of 22 ribotypes was identified and the ribotypes DUP-19165 (103 isolates), DUP-16619 (85 isolates), DUP-18627 (49 isolates) and DUP-1052 (45 isolates) were the most common ribotypes (data not shown).

A sub-total of 321 isolates from 241 *L. monocytogenes*-positive samples were characterized by PFGE. Their PFGE profiles encompassed 58 pulsotypes. Interestingly, 19 of these 58 pulsotypes, were novel additions in the PulseNet Canada database (Figure 16). Seven pulsotypes included at least ten different *L. monocytogenes* isolates (Figure 16). Pulsotypes 4 and 24 included the highest number of *L. monocytogenes* isolates, 20 and 15, respectively.

A dendrogram of the PFGE profiles based on *ApaI* and *AscI* restriction enzymes from the 58 pulsotypes is shown in Figure 17. Three lineages, I, II and III, are revealed. Lineages I and II include 24 and 33 pulsotypes, respectively. Lineage III includes a single pulsotype. Serotypes 1/2a and 1/2b are predominantly present and comprise 18 and 17 pulsotypes, distributed mainly in lineages II and I, respectively. Serotype 1/2c comprises 13 pulsotypes, all in lineage II. Serotypes 3a, 3b, 4a and 4b comprise 2, 3, 1 and 4 pulsotypes, respectively. The single pulsotype in lineage III is the sole member of serotype 4a.

Distribution of *L. monocytogenes* pulsotypes according to the slaughterhouse

The distribution of the 58 pulsotypes varied according to the slaughterhouse. A total of 33 pulsotypes were isolated from slaughterhouse C. Eleven, 13, 33 and 13 pulsotypes were isolated from slaughterhouses A, B, C and D, respectively (Figure 18). Ten pulsotypes were present in more than one slaughterhouse. A single pulsotype, LS4 (serotype 1/2a) was present in all four slaughterhouses. Pulsotypes LS12 (1/2c) and LS24 (1/2c), were only present in slaughterhouses A and B; LS2 (1/2a) only in A and C, LS45 (1/2b) in A and D, LS37 (1/2b) in B and C and LS50 (1/2b), LS51(1/2a), LS47(3c) and LS58 (1/2c) in C and D (Figure 18).

Distribution of *L. monocytogenes* pulsotypes according to seasons, slaughterhouses and operation areas

According to the rarefaction curves, the *L. monocytogenes* pulsotype diversity was the lowest in fall (Figure 19A) and was significantly lower in fall than in summer or winter (Figure 19B, Supplementary file, Figure S1A). The *L. monocytogenes* pulsotype diversity was significantly higher in slaughterhouse C compared to A and B (Figure 19C and 19D). No significant differences were observed in the diversity between operation areas.

Distribution of *L. monocytogenes* persistent pulsotypes

Eight pulsotypes, (LS1, LS2, LS4, LS5, LS7, LS25, LS35 and LS45) were identified as persistent, *i.e.* isolated at least three times over four visits in the same slaughterhouse, as described in Materials and Methods.

The proportion of persistent pulsotypes was similar in all slaughterhouses except for C (Table 3) where the proportion of persistent pulsotypes was significantly lower than in slaughterhouses A, B and D (OR=15.8 and 6.5 and 11.1 respectively; all $p<0.01$). In the disinfected operation areas of the slaughterhouse, *i.e.* dressing, chilling and cutting rooms, the proportion of persistent pulsotypes was significantly higher compared to the lairage operation area (OR=6.7, 9 and 36.5 with $p=0.02$, $p=0.04$ and $p<0.001$ respectively; Table 3). Surprisingly, a higher proportion of positive samples was observed in the cutting facility compared to the dressing room (OR=4.9; $p<0.01$; Table 3).

Association between *L. monocytogenes* persistent pulsotypes and isolates from food and clinical human listeriosis cases.

Of the 58 different *L. monocytogenes* pulsotypes isolated in our study, 11 were detected at least once in food and/or human listeriosis cases. A sub-total of five pulsotypes (LS7, LS14, LS19, LS24 and LS28) were isolated only from food, and four (LS1, LS2, LS4 and LS57)

from both food and human listeriosis cases. The 19 newly identified pulsotypes, and novel additions to the NML database, were not included in this analysis as they were not identified in the LSPQ database.

Significant association between *L. monocytogenes* persistent pulsotypes and their detections in food or human listeriosis cases was revealed. From the ten pulsotypes observed in food, five (50%) were persistent while only two (6.9%) and four (11.8%) from the pulsotypes not observed in food were persistent (Figure 20). Similarly, From the five pulsotypes observed human listeriosis cases, three (60%) were persistent while only four (11.8%) from the pulsotypes not observed human clinical cases were persistent (Figure 20).

Association between *L. monocytogenes* persistent pulsotypes and BAC resistance genes

The presence of BAC resistance genes was strongly associated to *L. monocytogenes* persistent pulsotypes ($p < 0.01$, Exact Chi-square). Among the fourteenth pulsotypes harboring the QAC genes six (42.8%) were persistent. Comparatively, only two (4.5%) from the 44 pulsotypes without QAC genes were persistent (Figure 21). Interestingly, the *emrE* gene was found only in *L. monocytogenes* pulsotype LS1 belonging to the clonal complex 8 (CC8).

The MICs of *L. monocytogenes* isolates harboring *bcrABC* (n=12) or *emrE* (n=1) were 6.2 ppm and 3.2 ppm, respectively. Conversely, the MICs of *L. monocytogenes* isolates lacking both *bcrABC* and *emrE* were two- to eight-fold lower.

The presence of BAC resistance genes in *L. monocytogenes* isolates was tested for its association to the site exposure to disinfectants. No significant association was revealed ($p = 0.8$ Exact Chi-square; Figure 22).

Discussion

Although strains diversity of environmental contamination of *L. monocytogenes* in primary meat production was investigated previously in a European country (Giovannacci, Ragimbeau et al. 1999, Chasseignaux, Toquin et al. 2001, Peccio, Autio et al. 2003, Hellström, Kiviniemi et al. 2008, Hellström, Laukkanen et al. 2010, Ortiz, López et al. 2010, Meloni, Piras et al. 2013, Morales-Partera, Cardoso-Toset et al. 2018), it is the first time, to the best of our knowledge where a deep investigation in environmental meat production was conducted. The genetic diversity and persistence of *L. monocytogenes* strains along with the slaughtering process until primary transformation (i.e cutting operation area) over a 16-month period were studied. The overall proportion of samples positive for *L. monocytogenes* in slaughterhouse environment was similar as reported previously (Autio, Säteri et al. 2000, Ortiz, López et al. 2010) when the sampling was done after cleaning and sanitation. In fact, the detection frequency of *L. monocytogenes* before cleaning and sanitation seems to be higher and was reported to reach up to 33% (Chasseignaux, Toquin et al. 2001, Meloni, Piras et al. 2013), suggesting that the contamination level could be reduced up to three times after cleaning and disinfection assuming that the contamination level before cleaning and disinfection was similar between these studies. In contrast, the environmental contamination level is relatively low as compared with the 24% reported for raw pork products (Ortiz, López et al. 2010) which could be explained by re-contamination during the post-slaughtering process (Van den Elzen and Snijders 1993, Nesbakken, Kapperud et al. 1996, Wulff, Gram et al. 2006).

In our study there was overall no significant differences in the detection of *L. monocytogenes* depending on the slaughterhouse except for plant C. The higher volume of production of this slaughterhouse (37500 swine/week) could be the reason why the contamination by *L. monocytogenes* was higher. Such factors could explain differences in detection frequency in these two slaughterhouses. The detection of *L. monocytogenes* at operation area level showed that dressing_evisc, chilling and hanging and cutting and deboning areas were the most contaminated by *L. monocytogenes* compared to the lairage

and slaughtering areas. Such result could be explained by the contribution of meat product as a source of environmental contamination where the high level of meat raw products contamination was reported in previously (Autio, Säteri et al. 2000, Lopez, Villatoro et al. 2008, Ortiz, López et al. 2010). In a dressing area, the carcasses are eviscerated and given the evidence of the presence of *L. monocytogenes* in many parts of a pig like tongue, tonsils the contamination risks on this area by these products could be higher. More importantly, the prevalence of this pathogen in the evisceration step can be as high as 60 % (Thevenot, Delignette-Muller et al. 2005, Ortiz, López et al. 2010). Thereby, it is very likely that the environmental contaminations in the dressing area occurred. Otherwise, a competition factor should be taken into consideration in the chilling and hanging and the cutting and deboning areas, the level of other bacterial contamination could be in the lowest level which is in favor of *L. monocytogenes* growth (Gnanou Besse, Dubois Brissonnet et al. 2000, Ye, Wang et al. 2017) especially in the chilling and cutting sectors where only psychrophile bacteria can grow. Also, previous studies reported that chilling and cutting rooms could be the most likely cause of raw product contamination due to the high level of *L. monocytogenes* contamination in these areas (Nesbakken, Kapperud et al. 1996).

The high level of contamination of *L. monocytogenes* observed in the environment (comprising floors, walls, ceiling, the bottom side of conveyors and machines like saws could be due to the type of surfaces and to the less efficient cleaning and sanitation. In fact, among environment sampling sites, some surfaces could promote ecological niches and biofilm formation due to the presence of rough or fissured surfaces like floor which was precisely frequently positive to *L. monocytogenes*. In the other hand, it is known that the presence of complex structures of some equipment and machines can lead to a less efficient cleaning and sanitation because of hardly accessible surfaces (Carpentier and Cerf 2011). Serotypes 1/2a and 1/2b were the most frequent *L. monocytogenes* serotypes observed. This is in agreement with previous studies (Lopez, Villatoro et al. 2008, Nucera, Lomonaco et al. 2010, Ortiz, López et al. 2010, Maury, Tsai et al. 2016, De Cesare, Parisi et al. 2017). However, in a recent study, the serotype 1/2c was always the most frequently observed (Meloni, Piras et al. 2013). Since the sampling was done before cleaning and sanitation in the Meloni et al study (Meloni, Piras et al. 2013), one can suppose that cleaning and

disinfection procedure affect the diversity of the serotypes. If it is the case, our results suggest that the serotype 1/2a would adapt more efficiently in this environment. However, there is still lack of consensus on the adherence ability of this serotype compared to others, particularly serotypes from lineage I. On the other hand, many studies reported a significantly higher ability to adhere to surfaces and form biofilm (Norwood and Gilmour 2001, Borucki, Peppin et al. 2003, Harvey, Keenan et al. 2007, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013). These results could explain why strains from this serotype are frequently recovered from cleaned food plants environment and even in food.

The higher strain diversity in slaughterhouse C was obvious compared to the slaughterhouses A and B. It could be due to the combination of many factors like the higher production capacity of this plant and the numerous sources of pigs, notably from outside of Quebec. Indeed, 65% of the animal supply to the plant C was from outside of the province of Quebec whereas the rest of plants were supplied only from local farms (personal communication, industrials). Interestingly, the high prevalence of *L. monocytogenes* in the slaughterhouse C seems to be correlated to the diversity of pulsotypes found in this plant and inversely, in the rest of slaughterhouses the strain diversity prevalence was low (Supplementary figure S2).

In this study, the diversity seemed to be affected by the season as this latter was higher in summer than in fall. It is difficult to explain this difference in these two seasons specifically. On the other hand, the non-significant differences in the detection level of *L. monocytogenes* between season suggests that strains diversity would not be dependent on prevalence.

It is important to note that *L. monocytogenes* strain diversity could have been underestimated by the PFGE typing of mostly only one strain by sample in the presence of identical ribotypes, as 16 % of samples with identical ribotype had different pulsotypes and around 31 % of isolates were not characterized (data not shown).

Here, a persistent *L. monocytogenes* isolate was defined as a strain isolated at least three times from at least one plant with a period of three to four months between visits, in accordance with (Keto-Timonen, Tolvanen et al. 2007, Ortiz, López et al. 2010). Eight *L. monocytogenes* isolates were identified as persistent. Surprisingly, slaughterhouse C, seemed to be the less contaminated by persistent strains. One explanation could be related to a less efficient cleaning and disinfection in this specific slaughterhouse that would make more difficult the recovery of persistent strains.

At the processing sector level, the increasing number of isolates belonging to the persistent strains over the slaughtering process was noticeable and this is the first time, in the best of our knowledge, that such a finding is reported. The lairage and slaughter areas were similar in term of environmental conditions in particular their hygienic status and their proximity, thus, *L. monocytogenes* strains were subjected to the same environmental conditions. Similarly, the fact that the dressing_evisc, chilling and hanging and cutting and deboning areas exhibited the highest proportion of persistent isolates could be due to the conditions generated by cleaning and disinfection procedures which could favorize the appearance of resistance or tolerance when the disinfectant is present at the inadequate concentration on surfaces as reported in many studies (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016, Ortiz, López-Alonso et al. 2016, Moretro, Schirmer et al. 2017, Cherifi, Carrillo et al. 2018). Furthermore, the presence of complex equipment and machines in the dressing_evisc and cutting and deboning areas could promote harborage sites which are known to be present in food premises (Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014).

Because of the importance of *L. monocytogenes* persistent strains in food contamination and, as a consequence to the risk for human health, we aimed to study if the persistent profiles were significantly associated with food and human listeriosis strains. The significant association between the persistence of *L. monocytogenes* profiles of our study with human listeriosis and food strains may indicate a high presence of these profiles throughout the province of Quebec leading to repeated contamination of food and, more importantly, that these profiles are present in food and/or food processing environments since a long period of time. Interestingly, the profile S2 and S4 are frequently isolated from

sporadic cases of listeriosis according to the LSPQ (personal communication, LSPQ) and the persistent pulsotype S1 belonging to the CC8 which is the predominant clone that has been causing listeriosis in Canada for more than two decades (Knabel, Reimer et al. 2012). Previous results showed the association of one 12 years persistent strain isolated from food processing environment with repeated listeriosis outbreaks (Orsi, Borowsky et al. 2008). Nonetheless, our study did not allow to reveal a direct link between the source of strains isolated from human listeriosis to the ones recovered in our study.

The significant association between the presence of *bcrABC* resistance cassette associated to the resistance to the BAC, as confirmed by MIC with persistent strains, provides important insights about how these persistent strains can survive in this environment a long period of time. In the present study, we showed that at least two resistant genes, *bcrABC* resistance cassette and *emrE*, to sub-lethal concentrations of BAC were significantly associated with the persistence of six *L. monocytogenes* strains. The presence of resistance genes to BAC in strains from food processing environment was shown in previous studies at different prevalence in different region in the world (Aase, Sundheim et al. 2000, Tamburro, Ripabelli et al. 2015, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016, Ortiz, López-Alonso et al. 2016, Meier, Guldimann et al. 2017). However, only few studies showed association between one persistence strain of *L. monocytogenes* and the presence of resistant genes to BAC (Ortiz, López-Alonso et al. 2016, Cherifi, Carrillo et al. 2018). In this study, we demonstrated that the prevalence of resistant genes to BAC was significantly higher in persistent strains than in non-persistent ones. such result can suggest that the resistance to BAC is an important factor related to the persistence of *L. monocytogenes* strains in the studied slaughterhouses. Although there were no significant differences between the most exposed sites to cleaning and disinfection and the non-exposed sites, in this environment, industrial disinfectants are often misused and may lead to the apparition of resistance in bacteria (Tezel and Pavlostathis 2015, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016).

Conclusion

Overall, this study brings for the first time in Canada information on the presence, distribution and persistence of *L. monocytogenes* strains in the meat primary processing plants. We observed similar contamination with other countries, especially in European Union. This study showed a wide diversity of *L. monocytogenes* isolates in slaughterhouses and cutting_deboning operation areas and this diversity seems not be affected by the processing areas indicating the ability of a large variety of strains to survive and grow within different environment conditions. Furthermore, the high prevalence of persistent strains at the final step (cutting and deboning area) should be taken into consideration especially by industrials. In fact, the contamination risks of other meat processing facilities by the meat contaminated with these persistent strains is highly probable especially since the PFGE profile of most of these persistent strains are observed at least once or more (frequently) in human listeriosis strains.

Author contribution

TC designed experiment, did experiment, interpreted results and write article; JA did statistical analyses and interpreted results; FP did experiment, designed the study and interpreted results; SQ: designed study and interpreted results; KN designed study and did experiments; JCC reviewed the manuscript and interpreted results; SB did the data analysis and interpreted results; SF: helped to plan the sampling and interpreted results; PF is the leader of this project, designed experiment and interpreted results. All authors reviewed the manuscript.

Acknowledgements

We thank Kevin Tyler and Karine Hébert from Health Canada for strain characterization

Funding

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant number RDCPJ 520873-17 and by industrial partners of the Chaire de recherche en salubrité des viandes.

Conflict of interest

Olymel funded partly this project, helped to plan the sampling and to interpret results by giving information about the operation of slaughterhouses, but has not influenced results and conclusions presented in this work.

References

- Aase, B., G. Sundheim, S. Langsrud and L. M. Rorvik (2000). "Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* 62 (1-2): 57-63.
- Autio, T., T. Säteri, M. Fredriksson-Ahomaa, M. Rahkio, J. Lundén and H. Korkeala (2000). "*Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses." *J Food Prot* 63 (10): 1438-1442.
- Borucki, M. K., J. D. Peppin, D. White, F. Loge and D. R. Call (2003). "Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* 69 (12): 7336-7342.
- Bruce, J. L., R. J. Hubner, E. M. Cole, C. I. McDowell and J. A. Webster (1995). "Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 5229-5233.
- Carpentier, B. and O. Cerf (2011). "Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises." *Int J Food Microbiol* 145(1): 1-8.
- Charlier, C., E. Perrodeau, A. Leclercq, B. Cazenave, B. Pilmis, B. Henry, A. Lopes, M. M. Maury, A. Moura, F. Goffinet, H. B. Dieye, P. Thouvenot, M. N. Ungeheuer, M. Tourdjman, V. Goulet, H. de Valk, O. Lortholary, P. Ravaut and M. Lecuit (2017). "Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study." *Lancet Infect Dis* 17(5): 510-519.
- Chasseignaux, E., M. T. Toquin, C. Ragimbeau, G. Salvat, P. Colin and G. Ermel (2001). "Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry-and pork-processing plants." *J Appl Microbiol* 91 (5): 888-899.
- Cherifi, T., C. Carrillo, D. Lambert, I. Miniaï, S. Quessy, G. Larivière-Gauthier, B. Blais and P. Fravallo (2018). "Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates reveals that their persistence in a pig slaughterhouse is linked to the presence of benzalkonium chloride resistance genes." *BMC Microbiol* 18(1): 220.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M07. Wayne, PA, USA.

Combrouse, T., I. Sadovskaya, C. Faille, O. Kol, Y. Guerardel and G. Midelet-Bourdin (2013). "Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions." J Appl Microbiol 114(4): 1120-1131.

De Cesare, A., A. Parisi, R. Mioni, D. Comin, A. Lucchi and G. Manfreda (2017). "*Listeria monocytogenes* circulating in rabbit meat products and slaughterhouses in Italy: prevalence data and comparison among typing results." Foodborne Pathog Dis 14 (3): 167-176.

Drevets, D. A. and M. S. Bronze (2008). "*Listeria monocytogenes* : epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion." Pathog Dis 53 (2): 151-165.

Elhanafi, D., V. Dutta and 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 (24): 8231-8238.

Fagerlund, A., S. Langsrud, B. C. Schirmer, T. Møretro and E. Heir (2016). "Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains." PLoS One 11 (3): e0151117.

Ferreira, V., M. Wiedmann, P. Teixeira and M. J. Stasiewicz (2014). "*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health." J Food Prot 77 (1): 150-170.

Giovannacci, I., C. Ragimbeau, S. Queguiner, G. Salvat, J.-L. Vendeuvre, V. Carlier and G. Ermel (1999). "*Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology." Int J Food Microbiol 53 (2-3): 127-140.

Gnanou Besse, N., F. Dubois Brissonnet, V. Lafarge and V. Leclerc (2000). "Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*." J Appl Microbiol 89 (6): 944-950.

Graves, L. M. and B. Swaminathan (2001). "PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis." *Int J Food Microbiol* 65.

Harvey, J., K. P. Keenan and A. Gilmour (2007). "Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains." *Food Microbiol* 24 (4): 380-392.

Hellström, S., K. Kiviniemi, T. Autio and H. Korkeala (2008). "*Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain." *J Appl Microbiol* 104 (3): 883-888.

Hellström, S., R. Laukkanen, K.-M. Siekkinen, J. Ranta, R. Majjala and H. Korkeala (2010). "*Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms." *J Food Prot* 73 (4): 641-648.

Hsieh, T., K. Ma and A. Chao (2016). "iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers)." *Methods in Ecology and Evolution* 7 (12): 1451-1456.

Kathariou, S. (2002). "*Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective." *J Food Prot* 65(11): 1811-1829.

Kérouanton, A., M. Marault, L. Petit, J. Grout, T. T. Dao and A. Brisabois (2010). "Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping." *J Microbiol Methods* 80 (2): 134-137.

Keto-Timonen, R., R. Tolvanen, J. Lunden and H. Korkeala (2007). "An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism." *J Food Prot* 70 (8): 1866-1873.

Kim, M., M. R. Weigand, S. Oh, J. K. Hatt, R. Krishnan, U. Tezel, S. G. Pavlostathis and K. T. Konstantinidis (2018). "Widely Used Benzalkonium Chloride Disinfectants Can Promote Antibiotic Resistance." *Appl Environ Microbiol* 84 (17): e01201-01218.

Knabel, S. J., A. Reimer, B. Verghese, M. Lok, J. Ziegler, J. Farber, F. Pagotto, M. Graham, C. A. Nadon and M. W. Gilmour (2012). "Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988–2010." *J Clin Microbiol* 06185-06111.

Kovacevic, J., J. Ziegler, E. Walecka-Zacharska, A. Reimer, D. D. Kitts and M. W. Gilmour (2016). "Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*." *Appl Environ Microbiol* 82 (3): 939-953.

Kovacevic, J., Ziegler, J., Walecka-Zacharska, E., Reimer, A., Kitts, DD., Gilmour, MW. (2016). "Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*." *Appl Environ Microbiol* 82: 939–953.

Lopez, V., D. Villatoro, S. Ortiz, P. Lopez, J. Navas, J. C. Dávila and J. V. Martínez-Suárez (2008). "Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant." *Meat Sci* 78 (1-2): 130-134.

Lunden, J. M., T. J. Autio, A.-M. Sjöberg and H. J. Korkeala (2003). "Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants." *J Food Prot* 66 (11): 2062-2069.

Luo, L., Z. Zhang, H. Wang, P. Wang, R. Lan, J. Deng, Y. Miao, Y. Wang, Y. Wang and J. Xu (2017). "A 12-month longitudinal study of *Listeria monocytogenes* contamination and persistence in pork retail markets in China." *Food Control* 76: 66-73.

Martínez-Suárez, J. V., S. Ortiz and V. López-Alonso (2016). "Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments." *Front Microbiol* 7.

Maury, M. M., Y. H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. C. Rocha, S. Brisse and M. Lecuit (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." *Nat Genet* 48 (3): 308-313.

Meier, A. B., C. Guldimann, A. Markkula, A. Pöntinen, H. Korkeala and T. Tasara (2017). "Comparative phenotypic and genotypic analysis of Swiss and Finnish *Listeria monocytogenes* isolates with respect to benzalkonium chloride resistance." *Front Microbiol* 8: 397.

Meloni, D., F. Piras, A. Mureddu, F. Fois, S. G. Consolati, S. Lamon and R. Mazzette (2013). "*Listeria monocytogenes* in five Sardinian swine slaughterhouses: prevalence, serotype, and genotype characterization." *J Food Prot* 76 (11): 1863-1867.

Minarovičová, J., Véghová, A., Mikulášová, M., Chovanová, R., Šoltýs, K., Drahovská, H., Kaclíková, E. (2018). "Benzalkonium chloride tolerance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a meat processing facility is related to presence of plasmid-borne bcrABC cassette." *Antonie van Leeuwenhoek* 111(10): 1913-1923.

Morales-Partera, A., F. Cardoso-Toset, I. Luque, R. Astorga, A. Maldonado, S. Herrera-León, M. Hernández, J. Gómez-Laguna and C. Tarradas (2018). "Prevalence and diversity of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Listeria monocytogenes* in two free-range pig slaughterhouses." *Food Control* 92: 208-215.

Moretro, T., B. C. T. Schirmer, E. Heir, A. Fagerlund, P. Hjemli and S. Langsrud (2017). "Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry." *Int J Food Microbiol* 241: 215-224.

Nesbakken, T., G. Kapperud and D. A. Caugant (1996). "Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry." *Int J Food Microbiol* 31 (1-3): 161-171.

Norwood, D. and A. Gilmour (2001). "The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature." *J Appl Microbiol* 33 (4): 320-324.

Nucera, D., S. Lomonaco, D. M. Bianchi, L. Decastelli, M. A. Grassi, M. T. Bottero and 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 (2-3): 271-276.

Orsi, R. H., M. L. Borowsky, P. Lauer, S. K. Young, C. Nusbaum, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. A. Ivy, Q. Sun, L. M. Graves, B. Swaminathan and M. Wiedmann (2008). "Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment." *BMC Genomics* 9: 539.

Ortiz, S., V. López, D. Villatoro, P. López, J. C. Dávila and J. V. Martínez-Suárez (2010). "A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant." *Foodborne Pathog Dis* 7 (10): 1177-1184.

Ortiz, S., V. López-Alonso, P. Rodríguez and J. V. Martínez-Suárez (2016). "The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from

two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis." *Appl Environ Microbiol* 82 (1): 308-317.

Pagotto, F., Daley, E., Farber, J., Warburton, D. (2001). "Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples in Compendium of Analytical Methods, Vol 2. HPB method-MFHPB-30."

Peccio, A., T. Autio, H. Korkeala, R. Rosmini and M. Trevisani (2003). "*Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants." *J Appl Microbiol* 37 (3): 234-238.

Skaarup, T. (1985). Slaughterhouse cleaning and sanitation. FAO Animal Production and Health Paper 53, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Tamburro, M., G. Ripabelli, M. Vitullo, T. J. Dallman, M. Pontello, C. F. L. Amar and M. L. Sammarco (2015). "Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 40: 31-39.

Tezel, U. and S. G. Pavlostathis (2015). "Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology." *Curr Opin Biotechnol* 33: 296-304.

Thevenot, D., M. Delignette-Muller, S. Christieans and C. Vernozy-Rozand (2005). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products." *Int J Food Microbiol* 102 (1): 85-94.

Thévenot, D., A. Dernburg and C. Vernozy-Rozand (2006). "An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products." *J Appl Microbiol* 101 (1): 7-17.

Van den Elzen, A. and J. Snijders (1993). "Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*." *Vet Q* 15 (4): 143-145.

Wulff, G., L. Gram, P. Ahrens and B. F. Vogel (2006). "One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses." *Appl Environ Microbiol* 72 (6): 4313-4322.

Ye, K., K. Wang, M. Liu, J. Liu, L. Zhu and G. Zhou (2017). "Mathematical modelling of growth of *Listeria monocytogenes* in raw chilled pork." *Lett appl Microbiol* 64 (4): 309-316.

List of tables

Table 1: Distribution of *Listeria monocytogenes*-positive samples in four slaughterhouses in Québec, between October 2013 and February 2015.

Sampling characteristics	Number of samples assayed	Number (%) of <i>L. monocytogenes</i> -positive samples	Odds ratios ¹	Adjusted <i>p</i> -value
Seasons				
Fall	624	44 (7.1)	NS ²	
Winter	936	90 (9.6)		
Spring	468	52 (11.1)		
Summer	468	57 (12.2)		
Slaughterhouses				
A	624	58 (9.3)	1.9	0.05
B	624	55 (8.8)	1.8	0.08
C	624	98 (15.7)	3.6	<0.001
D	624	32 (5.1)	Ref ³	
Operation areas				
Lairage	848	68 (8.0)	1.5	0.55
Slaughtering ⁴	288	10 (3.5)	Ref	
Dressing_evisc ⁵	368	51 (13.9)	5.7	<0.001
Chilling ⁶	128	24 (18.8)	5.5	<0.01
Cutting ⁷	864	90 (10.4)	3.5	<0.001
Surfaces in contact with animal carcasses and meat				
Yes	912	86 (9.4)	NS	
No	1584	157 (9.9)		
Sites, machines and materials ⁸				
Conveyor belt top side	160	19 (11.9)	2.7	<0.01
Conveyor belt bottom side	160	21 (13.1)	3.0	<0.01
Environment	656	86 (13.0)	3.0	<0.001
Machines	256	27 (10.6)	2.6	<0.01
Pens	800	65 (8.1)	4.0	0.04

Sampling characteristics	Number of samples assayed	Number (%) of <i>L. monocytogenes</i> -positive samples	Odds ratios ¹	Adjusted <i>p</i> -value
Materials	464	25 (5.4)	Ref	

¹ Odds ratios from multi-level multivariable logistic regression model were used to present significant associations between isolation of *L. monocytogenes* and the seasons, slaughterhouses, operation areas, surfaces in contact with animal carcasses and meat or not, and sites, machines and materials.

² NS: Not Significant

³ Ref: Reference

⁴ the slaughtering and bleeding area,

⁵ the combination of the skinning and dehairing, and evisceration areas,

⁶ the chilling and hanging area,

⁷ the cutting and deboning area.

⁸ Sites, machines and materials are described in Supplementary file, Table S1.

Table 2: Distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes in the four slaughterhouses under study.

Serotypes	Slaughterhouses								Total	
	A		B		C		D		n	%
	n ¹	% ²	n	%	n	%	n	%		
1/2a	29	50.0	37	67.3	11	11.2	14	43.8	91	37.4
1/2b	4	6.9	8	14.6	56	57.1	12	37.5	80	32.9
1/2c	19	32.8	8	14.6	22	22.5	2	6.3	51	21.0
3a	-	-	-	-	-	-	5	15.6	5	2.1
3b	-	-	-	-	7	7.1	-	-	7	2.9
3c	-	-	-	-	1	1.0	1	3.1	2	0.8
4a	10	17.2	-	-	-	-	-	-	10	4.1
4b	-	-	3	5.5	4	4.1	-	-	7	2.9
Total ³	58		55		98		32		243	100

¹n: number of *L. monocytogenes*-positive samples. Two *L. monocytogenes* isolates were obtained per sample and submitted to serotyping.

²%: relative to the Total³ number of *L. monocytogenes*-positive samples.

³Total: the total number of *L. monocytogenes*-positive samples. These numbers are identical to those shown in Table 1. In some cases, Total³ can be smaller than the sum because the latter may include two different serotypes from a same sample.

One *L. monocytogenes* isolate per sample was selected and regression analysis with adjusted variance for the visit was performed on the three most frequent serotypes (1/2a,

1/2b and 1/2c) to determine whether the detection of isolates belonging to these serotypes were dependent on slaughterhouses and/or seasons.

Table 3: Number of *Listeria monocytogenes*-positive samples and distribution of persistent pulsotypes among slaughterhouses and operation areas. Odds ratios from multi-level multivariable logistic regression analysis are used to present the associations.

Characteristics	Number of positive samples ¹	Number of samples (% per slaughterhouse) with persistent pulsotype	Odds ratios	
			Estimate	Adj. <i>p</i> -value
Slaughterhouses				
A	58	33 (56.9%)	14.4	<0.001
B	54	32 (59.3%)	5.4	<0.01
C	97	12 (12.4%)	Ref. ²	
D	32	13 (40.6%)	9.6	<0.01
Operation areas				
Lairage	68	5 (7.4%)	Ref.	
Slaughtering and bleeding	10	3 (30.0%)	9	0.15
Dressing_evisc ³	51	13 (25.5%)	6.7	0.02
Chilling and hanging	23	8 (34.8%)	7.5	0.05
Cutting and deboning	89	61 (68.5%)	36.5	<0.001

¹ Only *L. monocytogenes*-positive samples with at least one isolate characterized by PFGE were included here. Two samples from the total 243 positive ones are missed.

² Ref.: Reference used for odds ratios.

³ Dressing_evisc is a combination of two operation areas: dehairing and evisceration.

Legends and figures

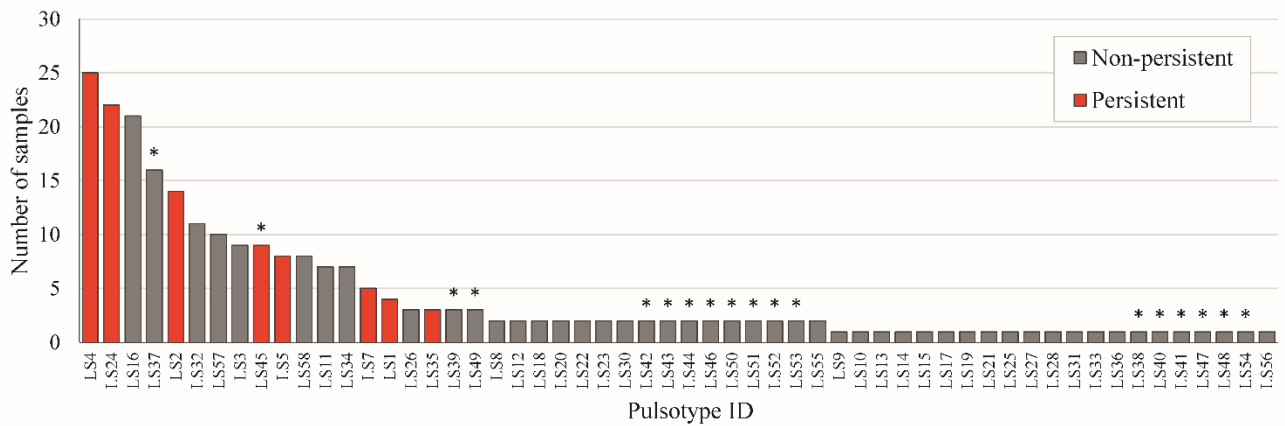
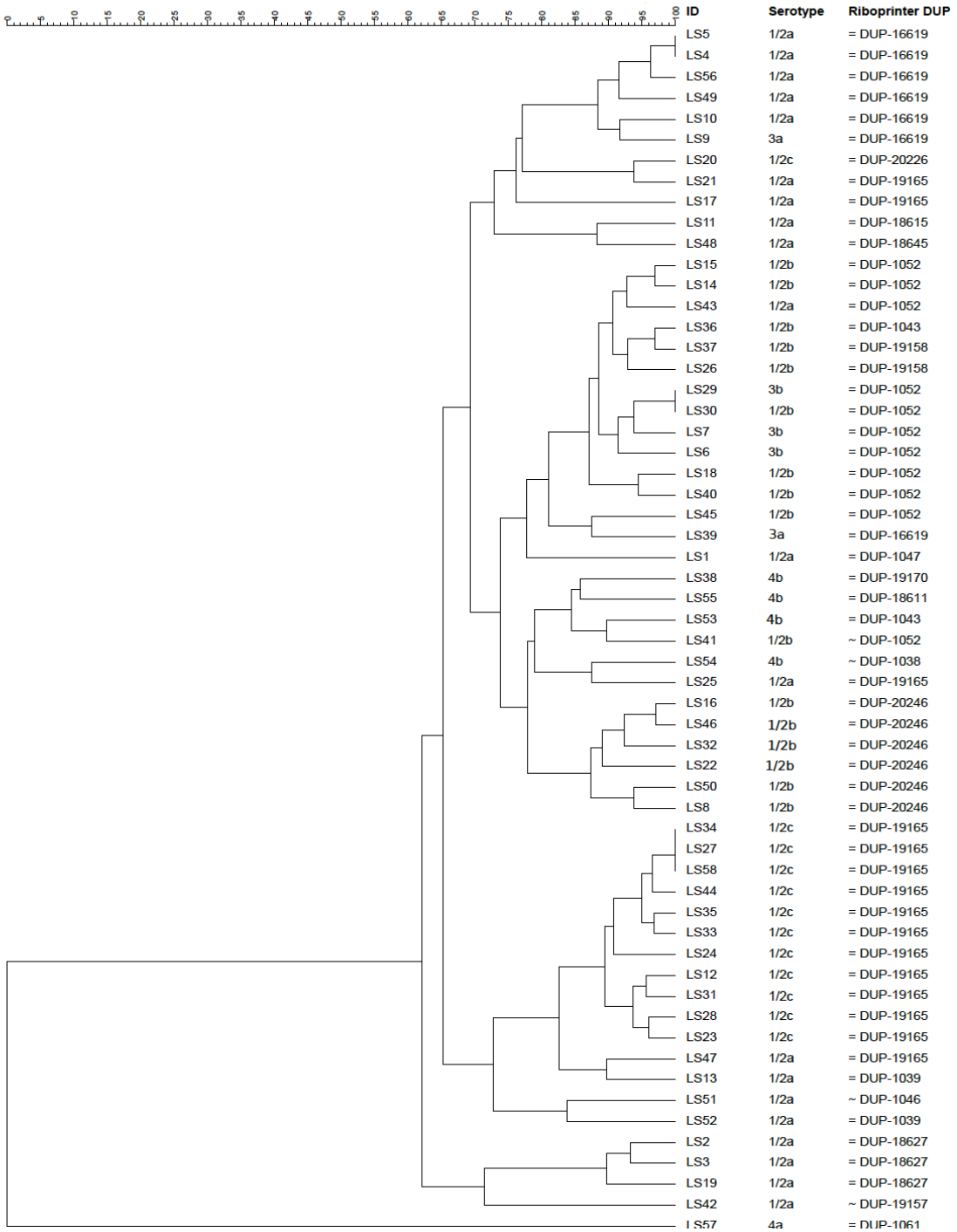


Figure 16: Representation of number of isolates per pulsotype. The persistent pulsotypes are colored in red. The new pulsotypes (not observed in the PulseNet Canada database prior to discontinuation in favor of whole genome sequencing) are labeled with an asterix.

A

PFGE-ApaI



B

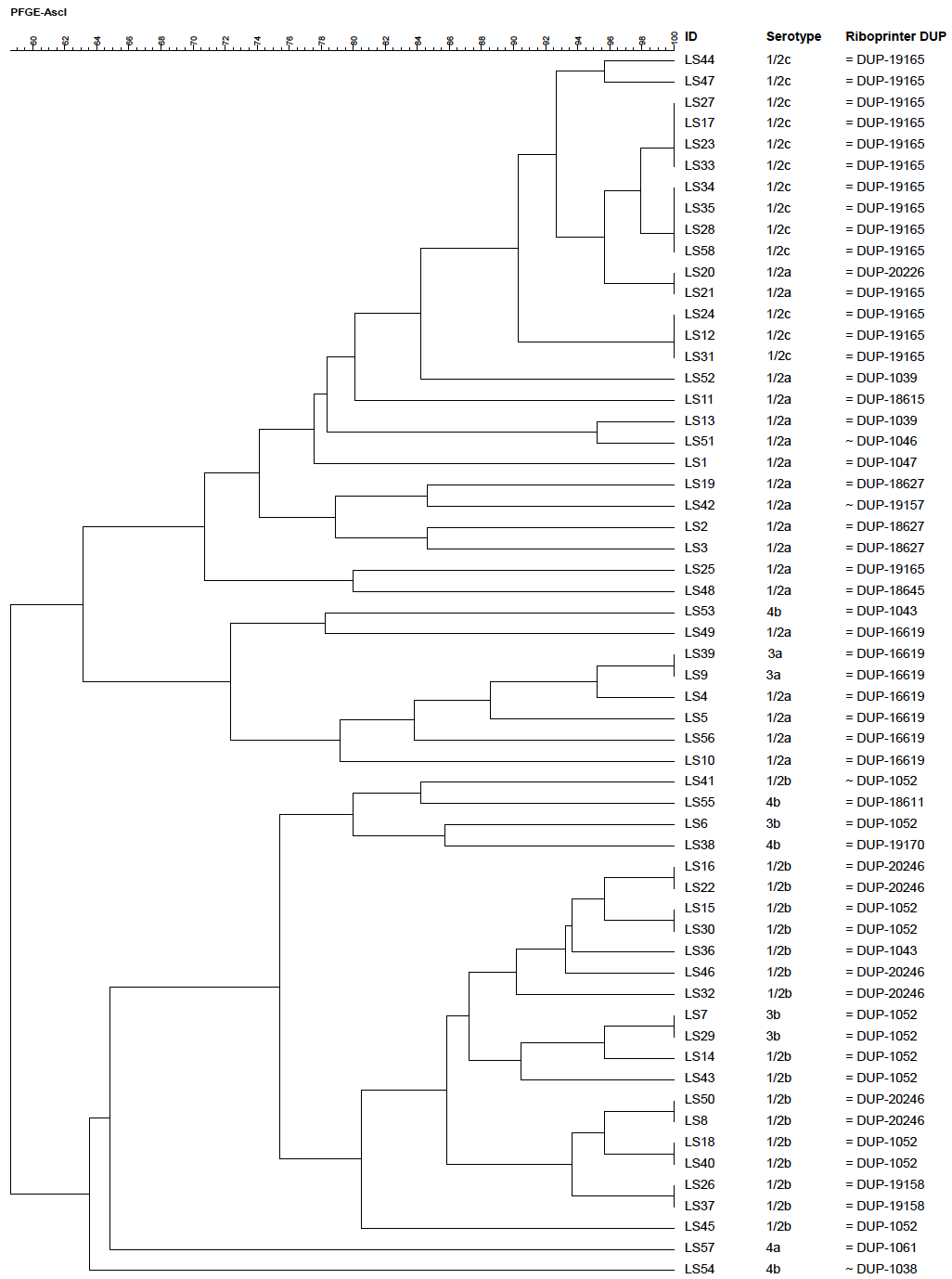


Figure 17 : Dendrogram of PFGE-ApaI (A) and Ascl (B) profiles from 58 *L. monocytogenes* pulstypes.

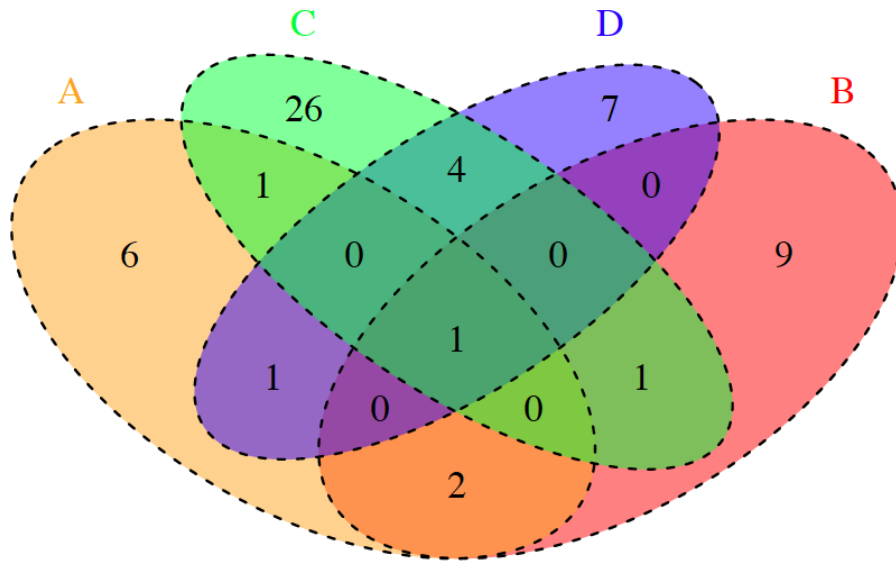


Figure 18 : Venn diagram with the numbers of shared pulsotypes among the four slaughterhouses A, B, C and D.

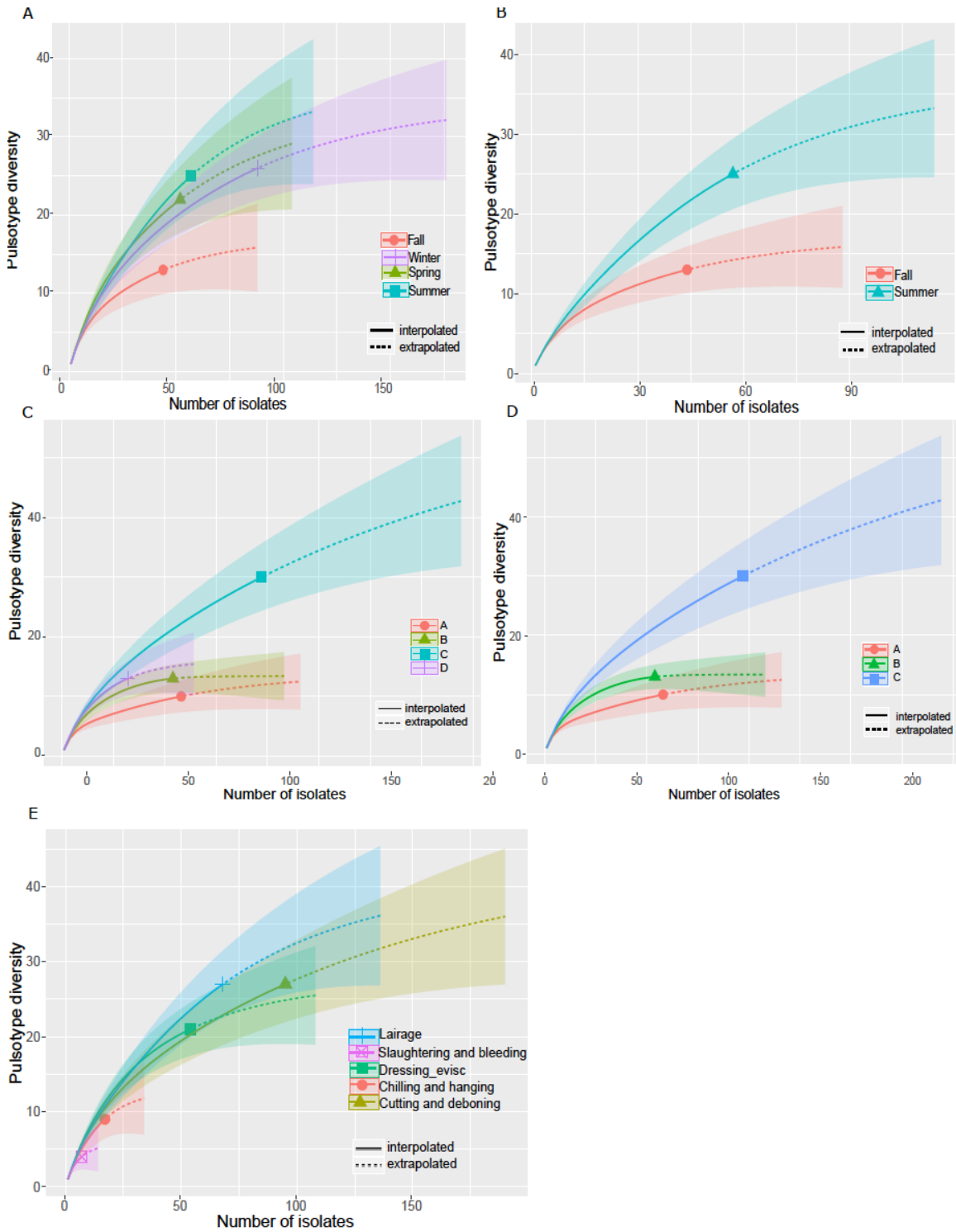


Figure 19 : Pulsotype Diversity of *L. monocytogenes* isolates collected from swine slaughterhouses. A) Pulsotype diversity according to the four seasons. B) Pulsotype diversity according to two seasons, Fall and Summer. C) Pulsotype diversity according to the slaughterhouses, A, B, C and D. D) Pulsotype diversity according to

the slaughterhouses, A, B, C. E) Pulsotype diversity according to the operating area. One characterized isolate per sample was selected randomly, rarefaction curves were produced by the iNEXT package, R v 3.4.1.

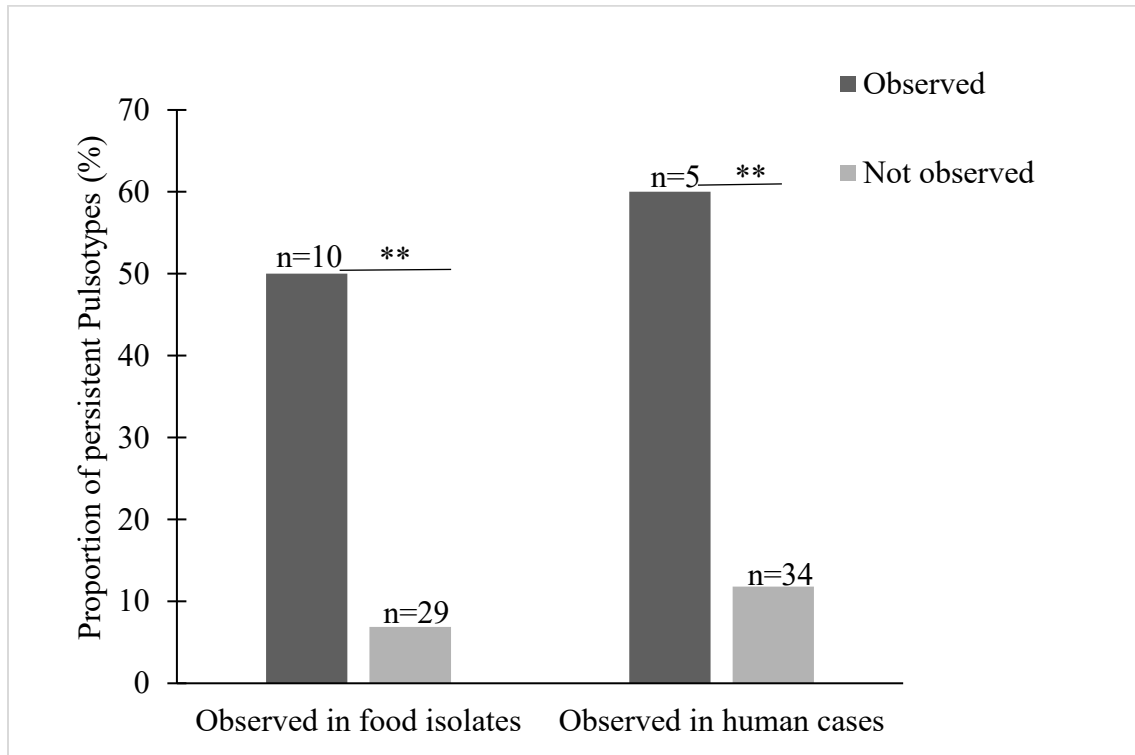


Figure 20 : Proportion of persistent *Listeria monocytogenes* pulsotypes observed in food and human listeriosis cases from 2000 to 2016 in Quebec according to the database of the Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ). **: $p < 0.01$.

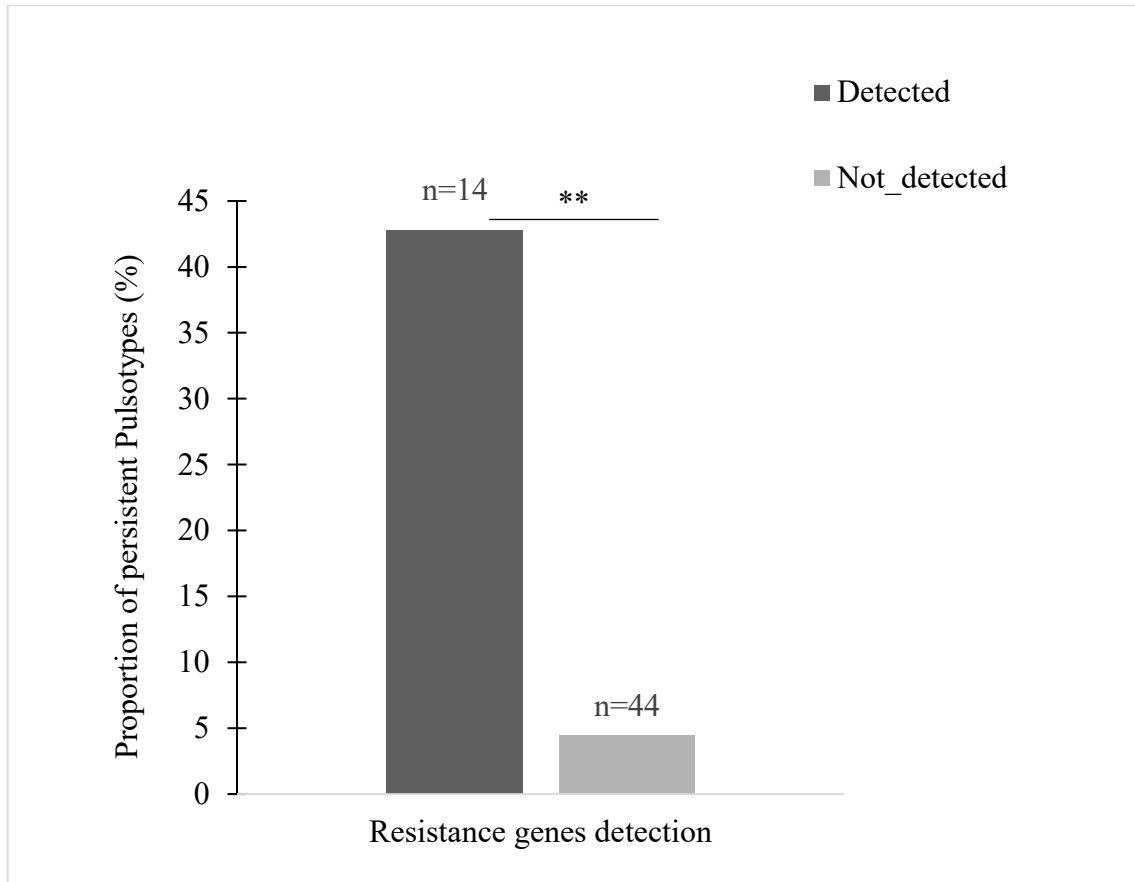


Figure 21 : Proportion of persistent *Listeria monocytogenes* pulsotypes harboring both the benzalkonium chloride *bcrABC* resistance cassette and the *emrE* multidrug transporter gene. **: $p < 0.01$

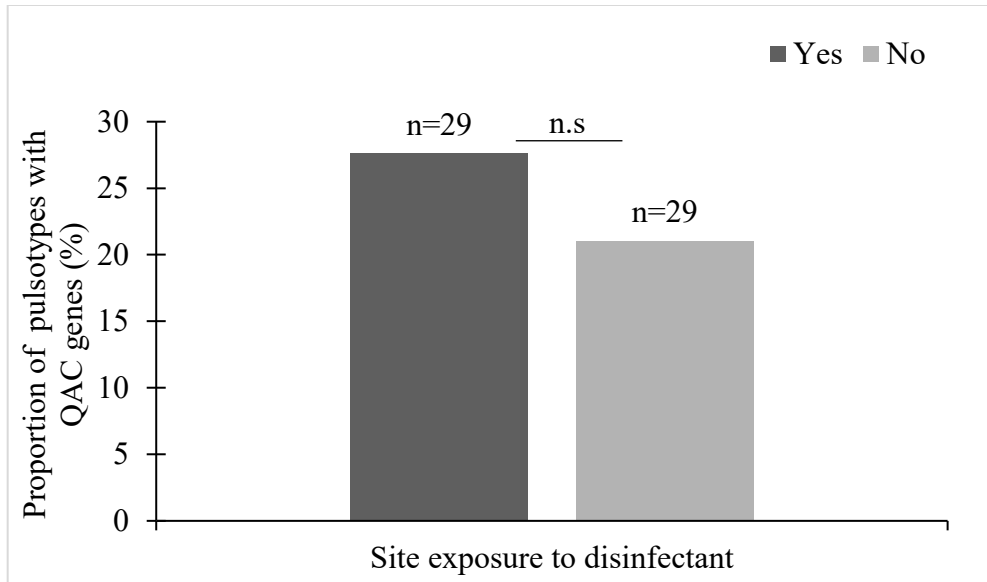


Figure 22 : Proportion of *Listeria monocytogenes* pulsotypes harboring both the benzalkonium chloride *bcrABC* resistance cassette and the *emrE* multidrug transporter gene relative to their origin, the most (yes) vs. the less exposed (No) sites to disinfectants. Significance: N.S: $p>0.05$.

III.2 Article II

Impact of nutrient restriction on the structure of *Listeria monocytogenes* biofilm grown in a microfluidic system

Tamazight Cherifi, Mario Jacques, Sylvain Quessy, Philippe Fravalo

Article publié dans Front Microbiol 2017; 8: 864. doi: [10.3389/fmicb.2017.00864](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00864)

Contribution de la candidate à la réalisation de ce travail : J'ai participé activement au design expérimental de ce travail, à la réalisation des expérimentations et à l'interprétation des résultats. J'ai également rédigé l'article.

Abstract

Biofilm formation by the pathogen *Listeria monocytogenes* is a major concern in food industries. The aim of this work was to elucidate the effect of nutrient limitation on both biofilm architecture and on the viability of the bacteria in microfluidic growth conditions. Biofilm formation by two *Listeria monocytogenes* strains was performed in a rich medium (BHI) and in a tenfold diluted BHI (BHI/10) at 30°C for 24h by using both static conditions and the microfluidic system Bioflux. In dynamic conditions, biofilms grown in rich and poor medium showed significant differences as well in structure and in the resulting biovolume. In BHI/10, biofilm was organized in a knitted network where cells formed long chains, whereas in the rich medium, the observed structure was homogeneous cellular multilayers. Biofilm biovolume production in BHI/10 was significantly higher than in BHI in these dynamic conditions. Interestingly, biovolume of dead cells in biofilms formed under limited nutrient conditions (BHI/10) was significantly higher than in biofilms formed in the BHI medium. In the other hand, in static conditions, biofilm is organised in a multilayer cells and dispersed cells in a rich medium BHI and poor medium BHI/10 respectively. There was significantly more biomass in the rich medium compared to BHI/10 but no difference was noted in the dead/damaged subpopulation showing how *Listeria monocytogenes* biofilm could be affected by the growth conditions. This work demonstrated that nutrient concentration affects biofilm structure and the proportion of dead cells in biofilms under microfluidic condition. Our study also showed that limited nutrients play an important role in the structural stability of *Listeria monocytogenes* biofilm by enhancing cell death and liberating extracellular DNA.

Introduction

Listeria monocytogenes is a pathogenic foodborne bacterium that causes listeriosis. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* is a major concern in the food industry because it generates recurring risks of ready-to-eat food contamination notably by enhancing resistance to disinfection treatments during sanitation procedures (Di Bonaventura et al., 2008). Therefore, a better understanding of the mechanisms and factors influencing biofilm formation would help in its prevention. *Listeria monocytogenes* biofilm formation is affected by many conditions like surface type, temperature, and growth medium (Di Bonaventura et al., 2008; Combrouse et al., 2013). In previous studies, biofilm production in rich and poor media were compared to assess the effects of nutrient concentration. Results have been ambiguous, with some authors concluding that biofilm production is enhanced in nutrient-poor medium (Zhou et al., 2012; Combrouse et al., 2013; Kadam et al., 2013) and others finding that in such conditions *L. monocytogenes* produces less biofilm (Stepanovic et al., 2004; Harvey et al., 2007; Guilbaud et al., 2015). All of these studies describe the effect of nutrient concentration on biomass production. However, there is no information, to the best of our knowledge, about how limited nutrients affect the structure of the biofilm produced by *L. monocytogenes*.

Most authors who have described the structure of *L. monocytogenes* biofilm have observed a honeycomb structure (Marsh et al., 2003; Guilbaud et al., 2015), however Rieu et al. (Rieu et al., 2008), using diluted media tryptic soy broth (TSB), described ball-shaped structures with elongated chain cells when grown in dynamic conditions (flow cell) and multilayer cell structures when grown in static conditions. These authors proposed this was due to the differences between these two growth conditions and argued that in flowing conditions bacteria are submitted to shear forces and flow. Previous studies on other biofilm forming bacteria underlined that different flow conditions can change biofilm structure. *Pseudomonas aeruginosa*, forms biofilm in streamlined patches and ripple-like wave structures in turbulent flow and monolayers interspersed with small colonies in laminar flow (Purevdorj et al., 2002). For this bacterium, along with an increase in nutrient concentration (Carbon and Nitrogen), the biomass and thickness of biofilm increased as well and the morphology changed with flow conditions (Stoodley et al., 1998).

Most of the available information on the establishment of *L. monocytogenes* biofilm structure and biomass was generated mainly by two different methods: microtiter plates (Sela et al., 2006) or culture chambers (Pilchová et al., 2014) for static conditions. A few other authors used flow cells for dynamic conditions (Rieu et al., 2008; Harmsen et al., 2010). Recently, a new method for assessing biofilm formation was developed that provides microfluidic growth conditions (Meyer et al., 2011). Based on microfluidic conditions and microscale flow, this system enables the accurate control of the microenvironment, like temperature and stable fluid flow around the biofilm (Janakiraman et al., 2009; Kim et al., 2012), while other macroscopic dynamic systems (drip flow, flow-cell) involve the use of large flow cells that make it difficult to control the microenvironment around the biofilm (Janakiraman et al., 2009). This microfluidic system has been used to study the biofilm of some species like *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (De Rienzo et al., 2016) but it has not been used to study *L. monocytogenes* biofilm yet. In this work, the microfluidic system was used along with static methods to study the effect of nutrient concentration on *L. monocytogenes* biofilm structure and assess how limited nutrients affect the stability of a knitted network-like structure in microfluidic conditions. This study showed that limited nutrient conditions enhanced a knitted-like structure formation composed of cell chains in *L. monocytogenes* biofilm and that this structure depends directly on extracellular DNA (e-DNA), which seems to be involved in the stabilization of *L. monocytogenes* biofilm structure in microfluidic conditions.

Materials and methods

Bacteria and strains

Strains; Lm76 and Lm132, which belong to serotype 1/2a and serotype 1/2b respectively, were isolated from pork slaughterhouses and cutting facilities after sanitation procedures. Strains were conserved in a Brucella broth and 15% glycerol at -80°C. Before all experimentations, strains were streaked on blood agar and incubated overnight at 37°C.

Biofilm formation in a static microtiter plate assay

An overnight culture of *L. monocytogenes* strains was used for biofilm production in 96-well plates (Costar® 3370; Corning, NY, USA). 100µl of an overnight culture in TSBYE, to an optical density (OD₆₀₀) of 1, at 37°C was added to 10 ml of fresh BHI (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and 100µl of the inoculated BHI was distributed into each well. Microplates were covered, and the sides were surrounded by parafilm to avoid evaporation and incubated at 30°C for 24h.

Biofilm formation using the microfluidic system

The BioFlux 200 system with 48-well plates (Fluxion biosciences, South San Francisco, California, USA) was used for biofilm formation. The protocol developed by Benoit et al. (Benoit et al., 2010) and Tremblay et al. (Tremblay et al., 2015) for other species was adapted for *L. monocytogenes* biofilm formation. Important parameters such as shear stress of 1 or 0.5 dyn/cm², which represents the pressure applied to the medium (1Pascal (Pa)= 10 dyn/cm²), adhesion time (2 or 4h), and concentration of the inoculum correspond to an optical density of 0.25, 0.5 or 1 were tested for biofilm production in the microfluidic system. Finally, two concentrations of the medium – a full strength BHI and a ten-fold BHI (BHI/10) – were retained for a comparison in the following conditions: 1.5 ml of an overnight culture (OD₆₀₀=1) of the Lm132 and Lm76 strains was centrifuged and resuspended in a fresh pre-warmed medium and 100µl of these cultures was added to the output well of the BioFlux instrument then injected at 0.05 Pa of shear stress for 30 seconds into the microfluidic channels, which had been wetted with a fresh pre-warmed BHI medium. Plates were incubated at 30°C for 4h without flow to allow bacteria attachment to the surface of the chambers, and the wells were equilibrated by adding 100µl of pre-warmed sterile medium in the input wells.

After 4h, the input wells were filled with 1.25 ml of pre-warmed BHI or BHI diluted with demineralized water at 1/10 (v/v) and the 48-well plates were incubated at 30°C. The shear stress was then applied at 0.05 Pa for 24h and the flow was run at 50µl/h. Biofilm growth was monitored by taking pictures every 10 min for 24h using an inverted fluorescence microscope (Olympus CKX41) equipped with a 10X objective and a digital camera (Retiga EX; Q Imaging) and a time lapse video was created from these pictures.

Image processing

Biofilms were stained with crystal violet 0.1 % (w/v) and live/dead dye: Syto 9, a green cell permeant dye of acid nucleic (to stain live cells) and Propidium iodide, a red impermeant nucleic acid dye to stain damaged or dead cells (Molecular probes, Eugene, OR, USA). The staining with the two markers was performed as follows: After 24h of biofilm growth, the flow was stopped and the residual medium and the effluent were removed completely from the inlet and outlet wells, 100 μ l of CV or live/dead was added in the inlet well, and the flow was activated for 10 min for CV and 20 min for live/dead. Finally, the biofilm was washed by adding 100 μ l of fresh BHI medium for 10 min under the flow. For biofilm stained with crystal violet, images were taken with an inverted fluorescent microscope equipped with a 40X objective (CKX41; Olympus, Markham, ON, Canada); image acquisition of the biofilm stained with live/dead dye was performed with a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM; Olympus FV1000 IX81) equipped with a 40X objective and 488 nm of argon and 543 of helium/Neon lasers. The green fluorescence of Syto9 was excited at 488 nm and the emission fluorescence was collected between 500-555 nm, the red fluorescence of PI was excited at 543 nm and the fluorescence emitted was collected between 555-625 nm. Three dimensional images (3D) were constructed for each strain and each condition by taking 13 to 25 image layers from the surface to the bottom of the biofilm; the Z-distance was kept within the same range between each sample. The biovolume of live and dead or damaged populations was calculated separately to estimate the respective biomass. Briefly, from the reconstructed 3D images of each dead and live biomass, an isoimage, which is an image that computes and draws a surface within a volumetric data field, on a 3D image, was created and the volume was calculated considering the height and the surface of the 3D image. The sum of both populations corresponds to the total biofilm. Biovolume calculation was repeated independently on different days.

All image analyses and biovolume calculations were performed with Image-Pro software (version 9.0; Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA).

DNase treatment in microfluidic conditions

Biofilm grown in microfluidic conditions was submitted to DNase treatment; growth conditions were the same as described above. At 24h, biofilms formed in full strength and diluted BHI were subjected to DNase I treatment (Promega), prepared in 150 mM of NaCl and 1mM CaCl₂ solution and added into the fresh mediums for a final concentration of 100µg/ml (w/v). The flow was activated under the same conditions the biofilm was grown (0.05 Pa at 30°C for 18h). After 18h, the biofilm was stained with live/dead dyes and image analysis was performed with CLSM.

Statistical analysis

Data were compared with a Student t-test after log transformation of the dead, live and total biomasses, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Concentration of nutrients affect biofilm structure

Biofilm formed by both Lm76 and Lm132 strains, as shown by crystal violet staining after 24h of flow at 30°C, revealed different morphologies depending on the concentration of the medium. In the rich medium (BHI), the biofilm structure appeared uniformly organized, showing stacked cellular layers and some dispersed filaments with both the Lm76 and Lm132 strains (Figure 23 A). On the contrary, when subjected to the tenfold diluted medium (BHI/10), both the Lm76 and Lm132 biofilms showed structures that were completely different from those seen in biofilm grown in a rich medium; organized cells in a condensed network formed by entangled filaments that produced clear holes and ball-shaped structures called microcolonies were observed (Figure 23 A). Three dimensional images revealed multilayered cellular structures for both strains (Figure 23 B). In the rich medium there was a regular distribution of live (green) and dead cells (red) over the chambers (left images, Figure 23 B) whereas in a tenfold diluted medium (BHI/10), biofilms were formed by microcolonies which were composed of live cells (green fluorescent) and dead cells (red fluorescent) between and underneath these so-called

microcolonies as shown in the live/dead image edge (right images, Figure 23 B). In biofilms of both strains formed in rich media rather than poor, this interaction between live and dead cells that produced the knitted network-like structure does not seem to occur (Figure 23 B). It is interesting to note that when grown in a rich medium, the two strains (but particularly Lm76) were able to form filaments as shown during an overnight incubation but, in the case of later phase biofilm development, the observed filaments detached from the surface and were carried off by the flow as demonstrated in the overnight video of Lm 76 biofilm in the supplemental materials S1 (figure_S1_suppinfo). On the contrary, in the poor medium, the filaments were involved in the structure and for the same duration did not show any sign of apparent disturbance as observed in the Lm76 strain biofilm growth in the supplemental materials S2 (figure_S2_supinfo). Interestingly, microcolonies were represented mostly by live cells (Figure 24 A) and PI stained mostly the filaments which formed a knitted network, as demonstrated in images taken with a 100X objective of Lm76 biofilm (Figure 24 B).

To determine if this phenomenon also occurs in other growth conditions, biofilm formation of these two strains was tested in static conditions, which is still the most common method used to study biofilm formation (Djordjevic et al., 2002a; Cole et al., 2004; Stepanovic et al., 2004). Surprisingly, biofilms stained with crystal violet were formed of multilayered cells regardless of the nutrient concentration (rich or poor medium) for both Lm76 and Lm132 (Figure 25 A).

The live/dead dye used to stain the biofilm in static conditions and 3D images confirmed the presence of multilayered cells for the two strains in both tested media (BHI and BHI/10) even if in BHI/10 medium it appeared there was limited growth and low biomass present and cells were dispersed over the surface (Figure 25 B). The biofilm was formed mainly by live cells in the rich medium BHI whereas in BHI/10, dead or stressed biomass was the largest population present (Figure 25 B).

Low nutrient concentration enhances biofilm formation by cell death

To evaluate the biomass in the biofilm, the biovolume of live and dead biomasses extracted from the 3D images obtained from the CLSM was calculated. In microfluidic condition, differences

in biovolume depending on the concentration of the medium was noted; the biofilm volume in a poor medium (BHI/10) was larger than in a rich medium for both Lm76 and Lm 132 strains (Figure 26 A) and (Figure 26 B) respectively. The biomass of dead cells depending on nutrient concentration conditions, was significantly higher in a poor medium (BHI/10) than in a rich medium (BHI) (Figure 26 C) for Lm76. Likewise, results showed that with the Lm132 strain there were more dead cell amounts in the BHI/10 medium than in BHI; however, differences did not reach statistical significance (Figure 26 D).

In static conditions, the total biovolume was higher in rich medium than in poor medium in both strains (Figure 27 A) and (Figure 27 B) and the value of live cell biomass in rich medium was significantly higher than in poor medium (Figure 27 C) and (Figure 27D), whereas there were no significant differences in dead biomass between rich and poor medium for the Lm76 strains (Figure 27 C) and Lm132 (Figure 27D) although in rich medium there was more dead biomass.

No e-DNA, no knitted network structure

As described above, the presence of a greater dead cell biomass in poor medium, under microfluidic conditions, suggests that e-DNA could be involved in the knitted network-like structure stabilization of *L. monocytogenes* biofilm. This prompted us to test the effect of DNase I on biofilm structure. After 18h of treatment with DNase I, biofilm structure grown in diluted BHI medium changed drastically, completely losing its filamentous structure (Figure 28). The effect of DNase on *L. monocytogenes* biofilm was spectacular; upon turning the flow on, all the biofilm detached (Figure 28), which can be seen in the 18h video provided supplemental materials S3 (Figure_S3_suppinfo) and S4 (Fugure_S4_suppinfo). At 400X magnification, small live cellular sticks could be observed but no more filaments were observed any time after DNase treatment. More interestingly, the dead/damaged biomass almost totally disappeared from the biofilm, unlike with the untreated biofilm (Figure 28). It is interesting to note that after a few seconds of DNase treatment, almost all biofilm detached in the poor and rich mediums but after 18h live biomass could be observed under DNase treatment (Figure 28).

Discussion

This study demonstrated that limited nutrients and e-DNA are essential for the establishment of a knitted-like structure in *L. monocytogenes* biofilm in microfluidic conditions. It was clearly evident that a BHI medium and a tenfold diluted BHI provided completely different results, particularly regarding the structure of *L. monocytogenes* biofilms produced.

As described above, depending on the concentration of nutrients, the structure of *L. monocytogenes* biofilm changed from multilayered cells in a rich medium BHI to a knitted structure formed by filaments and microcolonies in a poor medium BHI/10. Such different structures have been previously described in the literature (Rieu et al., 2008), although some studies described them as honeycomb (Borucki et al., 2003; Chavant et al., 2004; Guilbaud et al., 2015), which has similarities with a knitted network given the presence of holes and microcolonies but is different regarding the presence of filaments.

In another study, structural differences were also reported in some *L. monocytogenes* strains. Authors observed honeycomb and multilayered cell structures and suggested flagella as having a role in its formation since in the absence of the latter, they observed a homogenous multilayered cell structure instead of a honeycomb structure in static conditions (Guilbaud et al., 2015). This work has demonstrated, using a microfluidic system, that the concentration of nutrients alone affects the structure of *L. monocytogenes* biofilm.

In static conditions, homogeneous multilayered structures were observed, and the biofilm architecture was completely different from the one observed in the microfluidic growth chamber. There were no structural differences between the rich and poor medium although the biofilm grown under poor medium was so low the biomass could be hardly seen in the 3D image analyses after size reduction. It is known that growth conditions affect biofilm morphology via differential gene expression systems like the quorum sensing *agr* system (Rieu et al., 2008). Indeed, it has been shown that in static conditions, *agr* system expression is barely detectable and the biofilm is organized in a multilayered cellular structure, while when grown in flow cells, biofilm is structured by a knitted network-like structures and an increased expression of the *agr* system over time could be noticed (Rieu et al., 2008). This could be the reason why the structure

in static and microfluidic conditions was different. Furthermore, in a previous study, the *agr* system was shown to have an important role in biofilm structure in *S. aureus* (Periasamy et al., 2012). The filaments observed in our study are in accordance with the ones described in the work of Rieu et al. (2008). This difference seen in the structures could be due to the method used for biofilm formation; a knitted structure has been observed only in flowing conditions (Monk et al., 2004;Rieu et al., 2008;Renier et al., 2014) while the honeycomb structure has been described only in static conditions (Djordjevic et al., 2002b;Marsh et al., 2003;Guilbaud et al., 2015). Long chains of *L. monocytogenes* cells were reported in previous studies (Bereksi et al., 2002;Monk et al., 2004;Giotis et al., 2007). According to these authors, these filamentous structures are produced when the bacterium is exposed to a range of stress conditions (Giotis et al., 2007) like high concentration of NaCl, presence or absence of acid (Bereksi et al., 2002), or limited nutrients (Monk et al., 2004). In our study, these filaments were clearly observed in rich medium and they were carried off by the flow. Shear stress could be involved in this morphology as it was not observed in our static study and anyone else's, to the best of our knowledge. It is still not understood which mechanism is involved in the formation of this cellular morphology, though a recent study showed that filament formation in *L. monocytogenes* is associated with a reduced secretion of two cell wall hydrolases (Renier et al., 2014). It is known that some bacteria, like *Myxococcus xanthus*, adopt a multicellular morphology in response to starvation (O'Connor and Zusman, 1991;McBRIDE and Zusman, 1993;Shimkets, 1999) and during antibiotic exposure (Justice et al., 2008). This morphology change is achieved through suppression of cell division in response to exogenous stresses. It has been suggested that filamentation is an adaptive response used by bacteria to increase survival under these hard growth condition (Justice et al., 2008).

Biovolume, as calculated after the DNA staining with Propidium Iodide and Syto9, showed that there is more biofilm in poor medium than in rich medium in microfluidic conditions, while in static condition there was more biofilm in rich medium than in poor medium. These contradictory results could be due to the fact that in static condition there is no renewal nutrients, an important limited factor, especially in poor medium, which could lead to the high decrease of the growth rate since in the poor medium, the overall biomass was dead or stressed. Moreover, inconsistent results were observed between biofilm formation in rich and poor medium under

static condition in previous work, indeed while some studies showed that the poor medium enhance biofilm formation (Zhou et al., 2012; Combrouse et al., 2013; Kadam et al., 2013), others showed the contrary (Stepanovic et al., 2004), the nature of the medium and supplements used in these different studies could be the reason of the discrepancies observed.

Interestingly, the amount of dead biomass (and live biomass) is significantly higher in diluted medium than in rich medium under microfluidic condition but not in static condition which could be due to the high stress effect that bacteria faced in the absence of renewal nutrients as cited above. Our results in dynamic conditions confirm those of a previous study where it was observed that in poor medium the amount of dead biomass is higher than in rich medium (Kadam et al., 2013). In *P. aeruginosa*, it has been proposed that cell death plays an important role in biofilm development and in the dispersal of a subpopulation of surviving biofilm cells (Mai-Prochnow et al., 2004; Bayles, 2007; Allocati et al., 2015). Cell death and more specifically, cell lysis involves prophage induction in this species (Webb et al., 2003; Barraud et al., 2006). It is interesting to note that releasing genomic DNA is necessary for early attachment to glass and for biofilm formation in *L. monocytogenes* (Harmsen et al., 2010). Interestingly, in this bacterium, the extracellular matrix is composed essentially of e-DNA and proteins (Combrouse et al., 2013); this could be the reason why after treatment with DNase the biofilm grown in a poor medium detached within seconds (Fig. 6A). In other studies, it was reported that e-DNA also has a structural role, acting as an interconnector compound and stabilizing biofilm structure in *P. aeruginosa* (Allesen-Holm et al., 2006; Flemming et al., 2007; Yang et al., 2007; Das et al., 2010) and in *S. aureus* (Qin et al., 2007; Rice et al., 2007; Izano et al., 2008). These conclusions are consistent with our findings with *L. monocytogenes* biofilm. As this study confirmed here, e-DNA, present under limited nutrient conditions, plays an important role in the knitted network-like structure since the filaments completely disappeared after treatment with DNase I and the biomass grown under this condition showed biofilm made up of single cells (Fig. 6). In a recent study, Zetzmann, et al., 2015 explained that the presence of more e-DNA in a limited-nutrient medium could be due to the hypotonic condition that leads to cell lysis and thus the release of genomic DNA (Zetzmann et al., 2015). The hypotonic effect may contribute to the presence of e-DNA via cell lysis, but, since in our study there was not an increase in dead

biomass in a limited nutrient compared to a rich medium under static conditions, it is difficult to explain the presence of more dead cells through the hypotonic effect only.

In static conditions, there was more biofilm and more dead biomass in the rich medium than in the poor medium. Our results are not consistent with previous observations where in the poor medium there were more dead cells than in a rich medium under the same conditions for biofilm formation (Kadam et al., 2013). In our study, the amount of dead biomass was evaluated by calculating biovolume; in the previous study, researchers used nutrient broth (NB) as a poor medium whereas in our study a tenfold diluted BHI medium was used. Maybe the different composition of the two media, especially the presence of glucose in NB which enhances biofilm formation as observed in *Burkholderia pseudomallei* (Ramli et al., 2012), and nutrient limitation can affect biomass production.

In the present study, biofilm was studied with two strains – Lm76 and Lm132 from 1/2a and 1/2b serotypes respectively. Serotype 1/2a belongs to lineage II and is commonly isolated from foods, but also isolated in human listeriosis, whereas 1/2b belongs to lineage I and is commonly isolated in human listeriosis cases (Gray et al., 2004; Van Stelten and Nightingale, 2008; Van Stelten et al., 2011; Cruz et al., 2013). Statistical analysis showed no significant differences between biovolume of Lm76 and Lm132 in both static and microfluidic conditions. In our preliminary results these two strains were classified as strains with high biofilm formation capacity (data not shown). In previous studies, there have been discrepancies regarding biofilm formation results between lineage I and II (Djordjevic et al., 2002b; Borucki et al., 2003; Combrouse et al., 2013). Some of these studies showed that strains from lineage I formed better biofilm than lineage II (Djordjevic et al., 2002b; Takahashi et al., 2009) whereas other studies reported that strains from lineage I form less biofilm than lineage II (Norwood and Gilmour, 2001; Borucki et al., 2003; Combrouse et al., 2013). The culture conditions (temperature, medium) used in these different studies might be the underlying cause for the divergent results, as suggested previously (Combrouse et al., 2013). Since *L. monocytogenes* biofilm gives a great cause of concern, it is important to study this biofilm in the same environmental conditions of food industries as possible. The growth temperature used in this work and in many other studies (Djordjevic et al., 2002b; Rieu et al., 2008; Combrouse et al.,

2013) did not reflect that of the food industries, therefore, it is important to consider the low temperature growth in *L. monocytogenes* biofilm studies to provide a better interpretation in the context of food industries.

Conclusion

This study showed that limited nutrients are associated with an increase of *L. monocytogenes* biofilm production when measured in dynamic conditions with controlled shear forces. Moreover, this study showed that limited nutrients promote *L. monocytogenes* biofilm structuration and that under low concentration of nutrients, *L. monocytogenes* population organizes a combination of filaments and microcolonies to form a stable knitted network-like structure in microfluidic condition. This study highlights the link between volume of biofilm formation and the proportion of dead and damaged cells in the communities. Thus, this study showed in limited nutrient conditions, the presence of e-DNA associated with cell death enhances biofilm development and stabilizes the structure in microfluidic conditions but not in static conditions. These results highlight the need to identify processes that specifically target e-DNA during sanitation procedures to prevent biofilm formation and thus preventing food contamination by *L. monocytogenes* in food processing facilities.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We would like to thank Frédéric Berthiaume from the Faculty of Veterinary Medicine at Université de Montréal for technical support with the confocal microscope and image analysis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov and T. Tolker-Nielsen (2006). "A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms." *Mol Microbiol* 59(4): 1114-1128.

Allocati, N., M. Masulli, C. Di Ilio and V. De Laurenzi (2015). "Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria." *Cell Death Dis* 6: e1609.

Barraud, N., D. J. Hassett, S.-H. Hwang, S. A. Rice, S. Kjelleberg and J. S. Webb (2006). "Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* 188 (21): 7344-7353.

Bayles, K. W. (2007). "The biological role of death and lysis in biofilm development." *Nat Rev Microbiol* 5 (9): 721-726.

Benoit, M. R., C. G. Conant, C. Ionescu-Zanetti, M. Schwartz and A. Matin (2010). "New device for high-throughput viability screening of flow biofilms." *Appl Environ Microbiol* 76 (13): 4136-4142.

Bereksi, N., F. Gavini, T. Benezech and C. Faille (2002). "Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments." *J Appl Microbiol* 92 (3): 556-565.

Borucki, M. K., J. D. Peppin, D. White, F. Loge and D. R. Call (2003). "Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* 69 (12): 7336-7342.

Chavant, P., B. Gaillard-Martinie and M. Hébraud (2004). "Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase." *FEMS Microbiol Lett* 236 (2): 241-248.

Cole, S. P., J. Harwood, R. Lee, R. She and D. G. Guiney (2004). "Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*." *J Bacteriol* 186 (10): 3124-3132.

Combrouse, T., I. Sadovskaia, C. Faille, O. Kol, Y. Guerardel and G. Midelet-Bourdin (2013). "Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions." *J Appl Microbiol* 114 (4): 1120-1131.

Cruz, C. D., A. R. Pitman, S. A. Harrow and G. C. Fletcher (2013). "*Listeria monocytogenes* associated with New Zealand seafood production and clinical cases: unique sequence types, truncated InlA and attenuated invasiveness." *Appl Environ Microbiol* 03305-03313.

Das, T., P. K. Sharma, H. J. Busscher, H. C. van der Mei and B. P. Krom (2010). "Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation." *Appl Environ Microbiol* 76 (10): 3405-3408.

De Rienzo, M. D., P. Stevenson, R. Marchant and I. Banat (2016). "Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel." *Appl Microbiol Biotechnol* 1-7.

Di Bonaventura, G., R. Piccolomini, D. Paludi, V. D'Orio, A. Vergara, M. Conter and A. Ianieri (2008). "Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity." *J Appl Microbiol* 104 (6): 1552-1561.

Djordjevic, D., M. Wiedmann and L. McLandsborough (2002). "Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation." *Appl Environ Microbiol* 68 (6): 2950-2958.

Djordjevic, D., M. Wiedmann and L. A. McLandsborough (2002). "Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation." *Appl Environ Microbiol* 68 (6): 2950-2958.

Flemming, H.-C., T. R. Neu and D. J. Wozniak (2007). "The EPS matrix: the "house of biofilm cells"." *J Bacteriol* 189 (22): 7945-7947.

Giotis, E. S., I. S. Blair and D. A. McDowell (2007). "Morphological changes in *Listeria monocytogenes* subjected to sublethal alkaline stress." *Int J Food Microbiol* 120 (3): 250-258.

Gray, M. J., R. N. Zadoks, E. D. Fortes, B. Dogan, S. Cai, Y. Chen, V. N. Scott, D. E. Gombas, K. J. Boor and M. Wiedmann (2004). "*Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations." *Appl Environ Microbiol* 70 (10): 5833-5841.

Guilbaud, M., P. Piveteau, M. Desvaux, S. Brisse and R. Briandet (2015). "Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype." *Appl Environ Microbiol* 81 (5): 1813-1819.

Harmsen, M., M. Lappann, S. Knochel and S. Molin (2010). "Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* 76 (7): 2271-2279.

Harvey, J., K. P. Keenan and A. Gilmour (2007). "Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains." *Food Microbiol* 24 (4): 380-392.

Izano, E. A., M. A. Amarante, W. B. Kher and J. B. Kaplan (2008). "Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Appl Environ Microbiol* 74 (2): 470-476.

Janakiraman, V., D. Englert, A. Jayaraman and H. Baskaran (2009). "Modeling growth and quorum sensing in biofilms grown in microfluidic chambers." *Ann Biomed Eng* 37 (6): 1206-1216.

Justice, S. S., D. A. Hunstad, L. Cegelski and S. J. Hultgren (2008). "Morphological plasticity as a bacterial survival strategy." *Nat Rev Microbiol* 6 (2): 162-168.

Kadam, S. R., H. M. den Besten, S. van der Veen, M. H. Zwietering, R. Moezelaar and T. Abee (2013). "Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin." *Int J Food Microbiol* 165 (3): 259-264.

Kim, J., H. D. Park and S. Chung (2012). "Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation." *Molecules* 17 (8): 9818-9834.

Mai-Prochnow, A., F. Evans, D. Dalisay-Saludes, S. Stelzer, S. Egan, S. James, J. S. Webb and S. Kjelleberg (2004). "Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*." *Appl Environ Microbiol* 70 (6): 3232-3238.

Marsh, E. J., H. Luo and H. Wang (2003). "A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities." *FEMS Microbiol Lett* 228 (2): 203-210.

McBRIDE, M. J. and D. R. Zusman (1993). "FrzCD, a methyl-accepting taxis protein from *Myxococcus xanthus*, shows modulated methylation during fruiting body formation." *J Bacteriol* 175 (15): 4936-4940.

Meyer, M. T., V. Roy, W. E. Bentley and R. Ghodssi (2011). "Development and validation of a microfluidic reactor for biofilm monitoring via optical methods." *J Micromech Microeng* 21 (5): 054023.

Monk, I. R., G. M. Cook, B. C. Monk and P. J. Bremer (2004). "Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: biological significance of rough colony isolates." *Appl Environ Microbiol* 70(11): 6686-6694.

Norwood, D. and A. Gilmour (2001). "The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature." *J Appl Microbiol* 33 (4): 320-324.

O'Connor, K. A. and D. R. Zusman (1991). "Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*." *J Bacteriol* 173 (11): 3342-3355.

Periasamy, S., H.-S. Joo, A. C. Duong, T.-H. L. Bach, V. Y. Tan, S. S. Chatterjee, G. Y. Cheung and M. Otto (2012). "How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (4): 1281-1286.

Pilchová, T., M. Hernould, H. Prévost, K. Demnerová, J. Pazlarová and O. Tresse (2014). "Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*." *Food Control* 35 (1): 366-372.

Purevdorj, B., J. W. Costerton and P. Stoodley (2002). "Influence of Hydrodynamics and Cell Signaling on the Structure and Behavior of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms." *Appl Environ Microbiol* 68 (9): 4457-4464.

Qin, Z., Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin and D. Qu (2007). "Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* 153 (7): 2083-2092.

Ramli, N. S. K., C. E. Guan, S. Nathan and J. Vadivelu (2012). "The effect of environmental conditions on biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates." *PLoS One* 7 (9): e44104.

Renier, S., C. Chagnot, J. Deschamps, N. Caccia, J. Szlavik, S. A. Joyce, M. Popowska, C. Hill, S. Knöchel and R. Briandet (2014). "Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition." *Environ Microbiol* 16(4): 1176-1192.

Rice, K. C., E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S. Smeltzer and K. W. Bayles (2007). "The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (19): 8113-8118.

Rieu, A., R. Briandet, O. Habimana, D. Garmyn, J. Guzzo and P. Piveteau (2008). "*Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains." *Appl Environ Microbiol* 74 (14): 4491-4497.

Sela, S., S. Frank, E. Belausov and R. Pinto (2006). "A Mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation." *Appl Environ Microbiol* 72 (8): 5653-5658.

Shimkets, L. J. (1999). "Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*." *Annu Rev Microbiol* 53 (1): 525-549.

Stepanovic, S., I. Cirkovic, L. Ranin and M. Svabic-Vlahovic (2004). "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface." *Lett Appl Microbiol* 38(5): 428-432.

Stoodley, P., I. Dodds, J. Boyle and H. Lappin-Scott (1998). "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure." *J Appl Microbiol* 85(S1).

Takahashi, H., S. Miya, K. Igarashi, T. Suda, S. Kuramoto and B. Kimura (2009). "Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood." *J Food Prot* 72 (7): 1476-1480.

Tremblay, Y. D., P. Vogeleer, M. Jacques and J. Harel (2015). "High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 81 (8): 2827-2840.

Van Stelten, A. and K. Nightingale (2008). "Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene *inlA*." *Appl Environ Microbiol* 74 (23): 7365-7375.

Van Stelten, A., J. Simpson, Y. Chen, V. Scott, R. Whiting, W. Ross and K. Nightingale (2011). "Significant shift in median guinea pig infectious dose shown by an outbreak-associated *Listeria monocytogenes* epidemic clone strain and a strain carrying a premature stop codon mutation in *inlA*." *Appl Environ Microbiol* 77 (7): 2479-2487.

Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov and S. Kjelleberg (2003). "Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *J Bacteriol* 185 (15): 4585-4592.

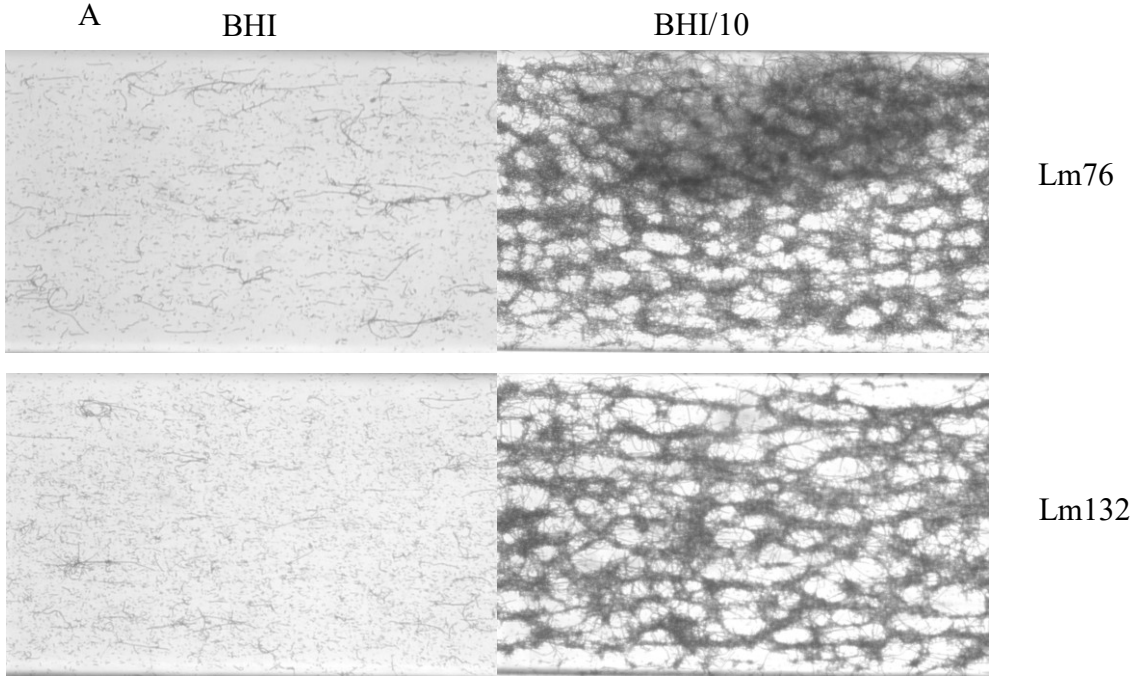
Yang, L., K. B. Barken, M. E. Skindersoe, A. B. Christensen, M. Givskov and T. Tolker-Nielsen (2007). "Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* 153 (5): 1318-1328.

Zetzmann, M., M. Okshevsky, J. Endres, A. Sedlag, N. Caccia, M. Auchter, M. S. Waidmann, M. Desvaux, R. L. Meyer and C. U. Riedel (2015). "DNase-sensitive and-resistant modes of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." *Front Microbiol* 6.

Zhou, Q., X. Feng, Q. Zhang, F. Feng, X. Yin, J. Shang, H. Qu and Q. Luo (2012). "Carbon catabolite control is important for *Listeria monocytogenes* biofilm formation in response to nutrient availability." *Curr Microbiol* 65 (1): 35-43.

Zhou, Y., Y. Wang, L. Deng, C. Zheng, F. Yuan, H. Chen, W. Bei and J. Li (2015). "Evaluation of the protective efficacy of four novel identified membrane associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2." *Vaccine* 33 (19): 2254-2260.

List of figures



B

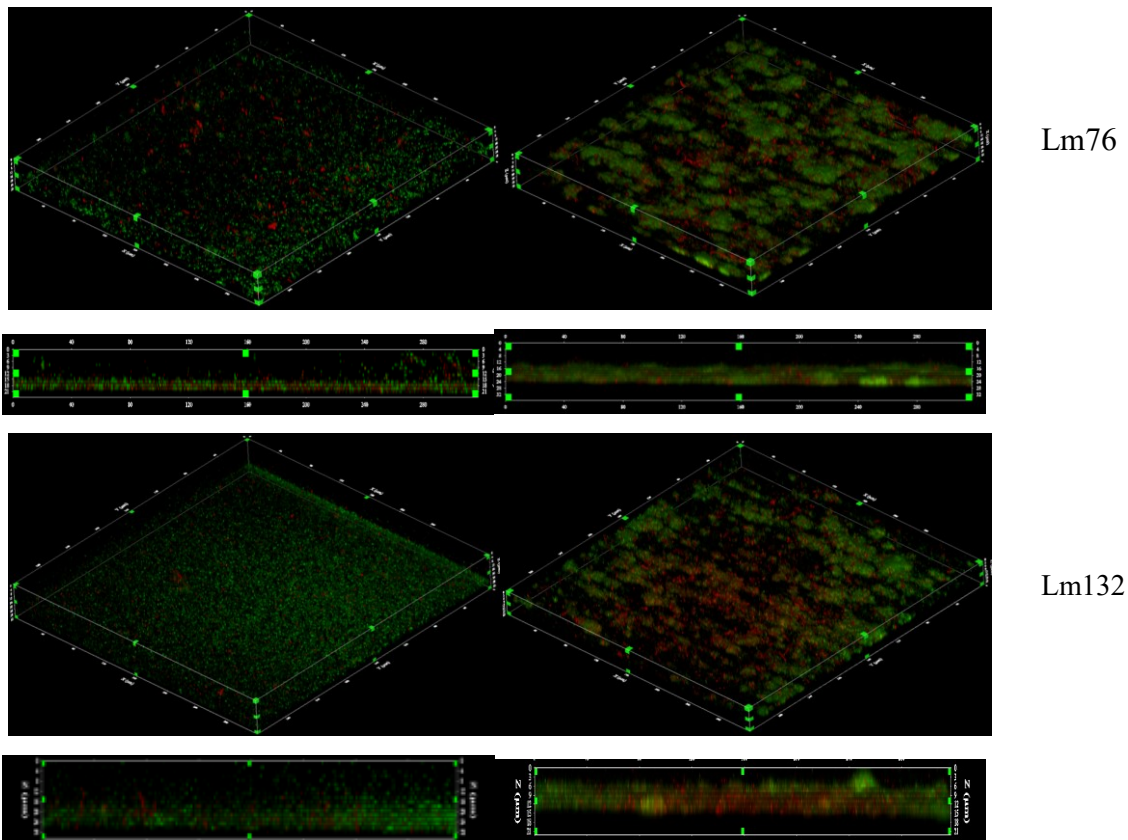
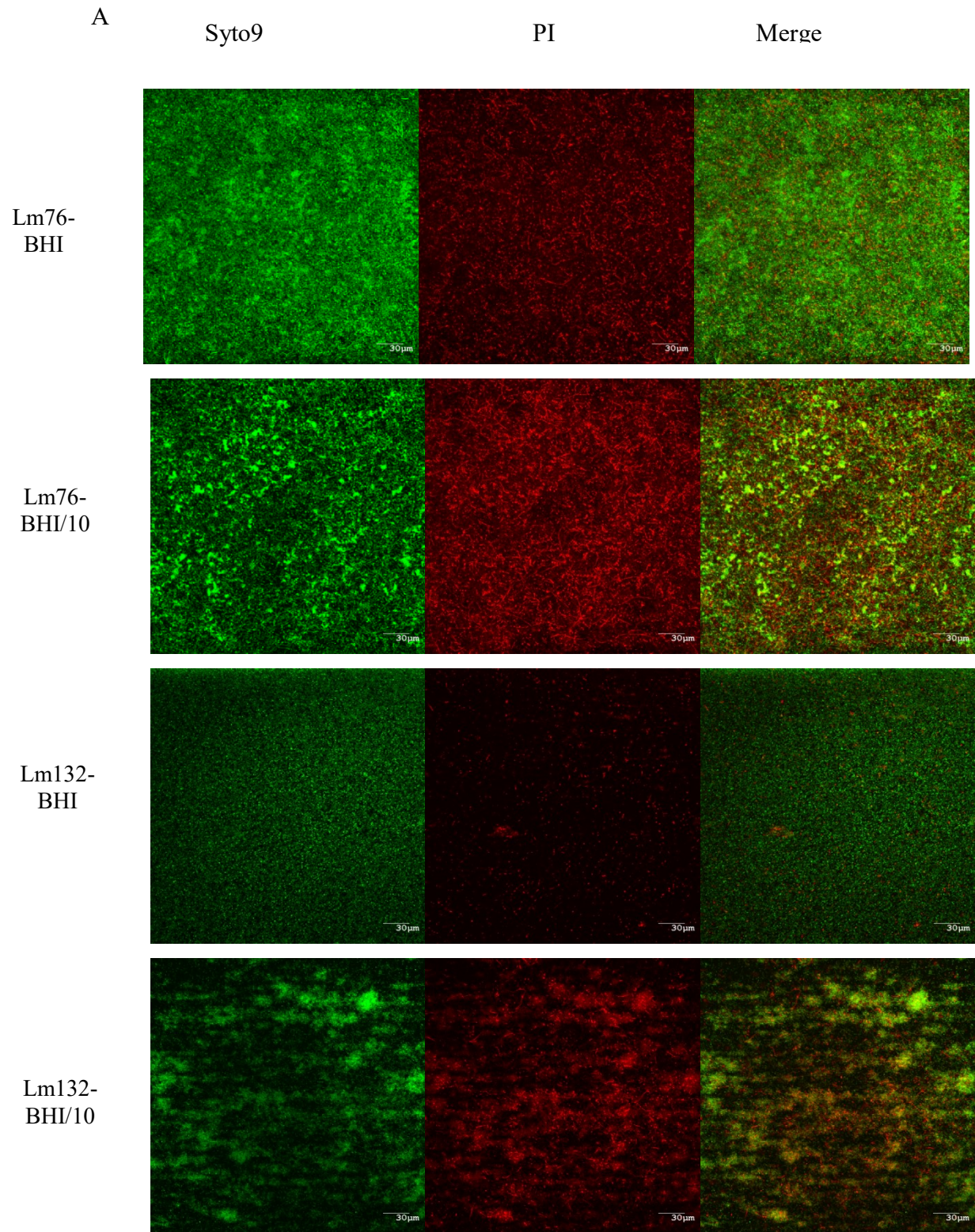


Figure 23 : biofilm visualization of two strains of *Listeria monocytogenes* – Lm76 and Lm132 – after 24h of incubation at 30°C in microfluidic conditions. Biofilm was grown in BHI medium (left images) and BHI/10 (right images); A) Biofilm stained with Crystal violet 0.1% B) 3D reconstruction of *L. monocytogenes* biofilm stained with live/dead; Syto9 showing live cells in green and Propidium iodide showing dead/damaged cells and e-DNA in red (B).



B

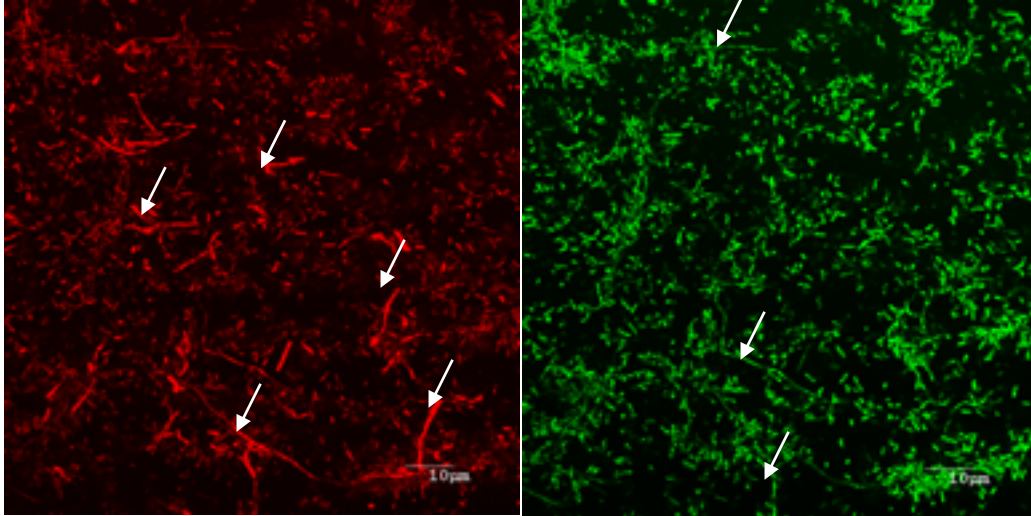
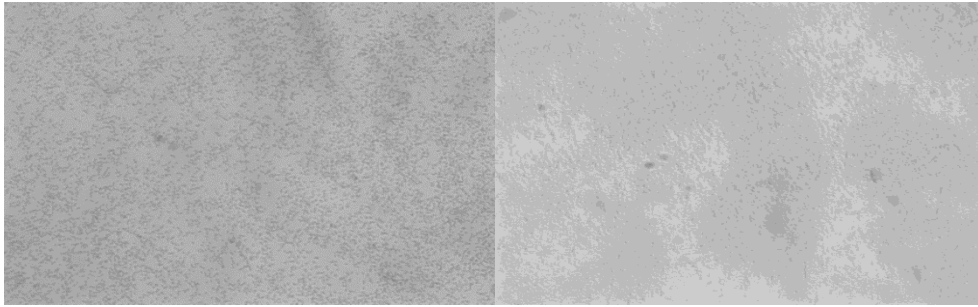


Figure 24 : Composition of dead and live cells in the biofilm of Lm76 and Lm132 strains of *L. monocytogenes* formed in rich medium BHI and diluted medium BHI/10 for 24h; A) individual visualization of live population of the biofilm (left images), dead population (middle image) and the merge of the two images which represents the compilation of all images taken from the top of the biofilm to the bottom and corresponds to the total biomass formed in the biofilm (right image). B) higher magnification (taken with a 100X objective) of Lm76 biofilm grown in the diluted medium BHI/10 showing dead (right image) and live (left image) biomass organization; arrows show filaments mostly present in dead biomass in the biofilm.

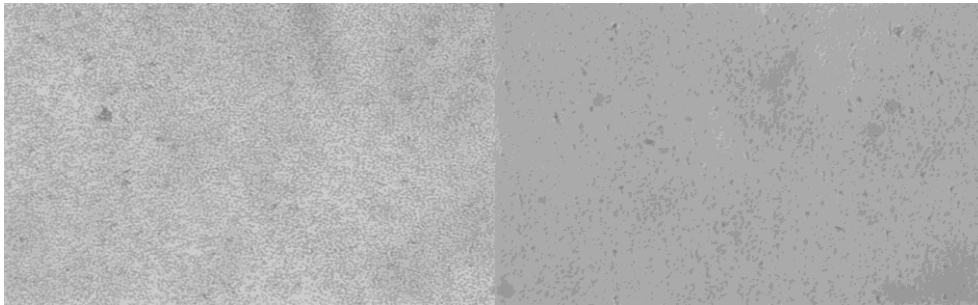
A

BHI

BHI/10



Lm76

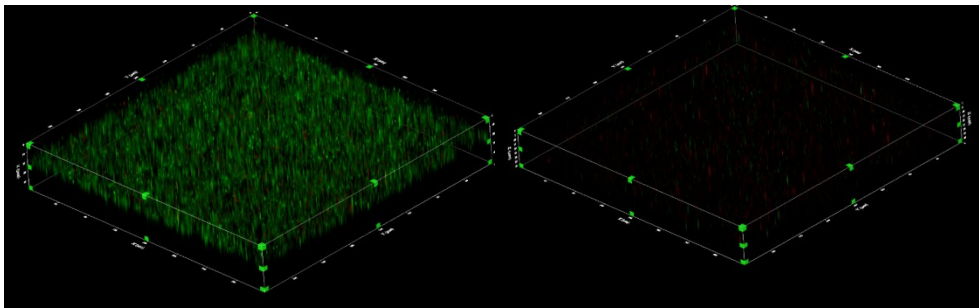


Lm132

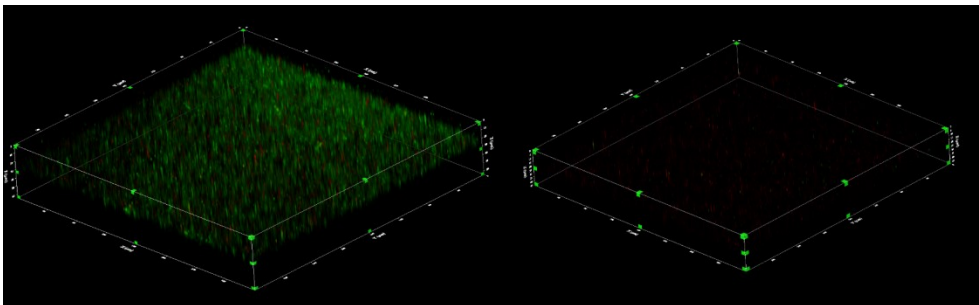
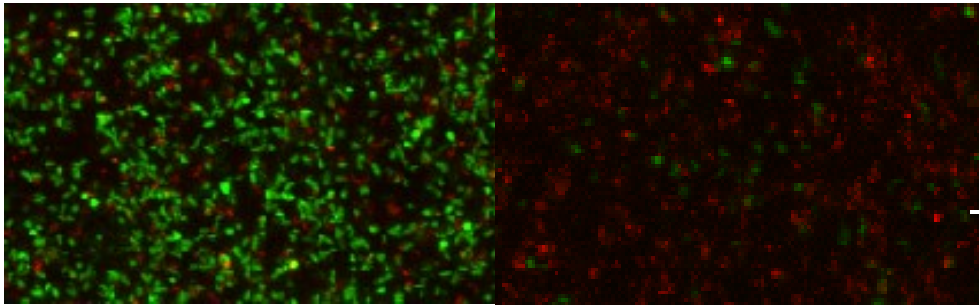
B

BHI

BHI/10



Lm76



Lm132

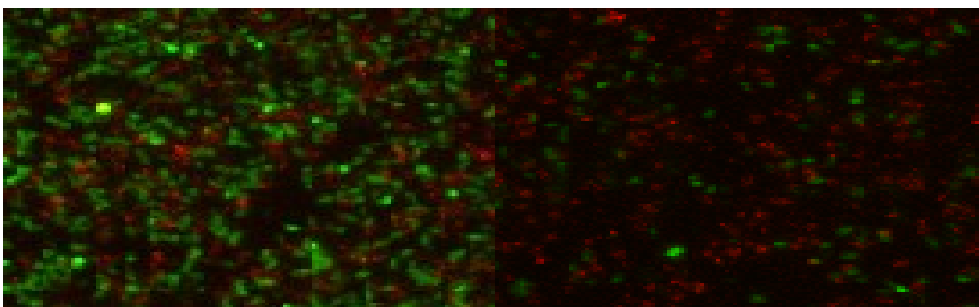


Figure 25 : biofilm visualization of two strains of *Listeria monocytogenes*: Lm76 and Lm132 after 24h of incubation at 30°C static conditions. Biofilm was grown in BHI medium (right images) and BHI/10 (left images); A) Biofilm stained with Crystal violet 0.1%. B) 3D reconstruction, zoomed images of a view from above of *L. monocytogenes*

biofilm stained with live/dead; Syto9 showing live cells in green and Propidium Iodide showing dead/damaged cells and e-DNA in red

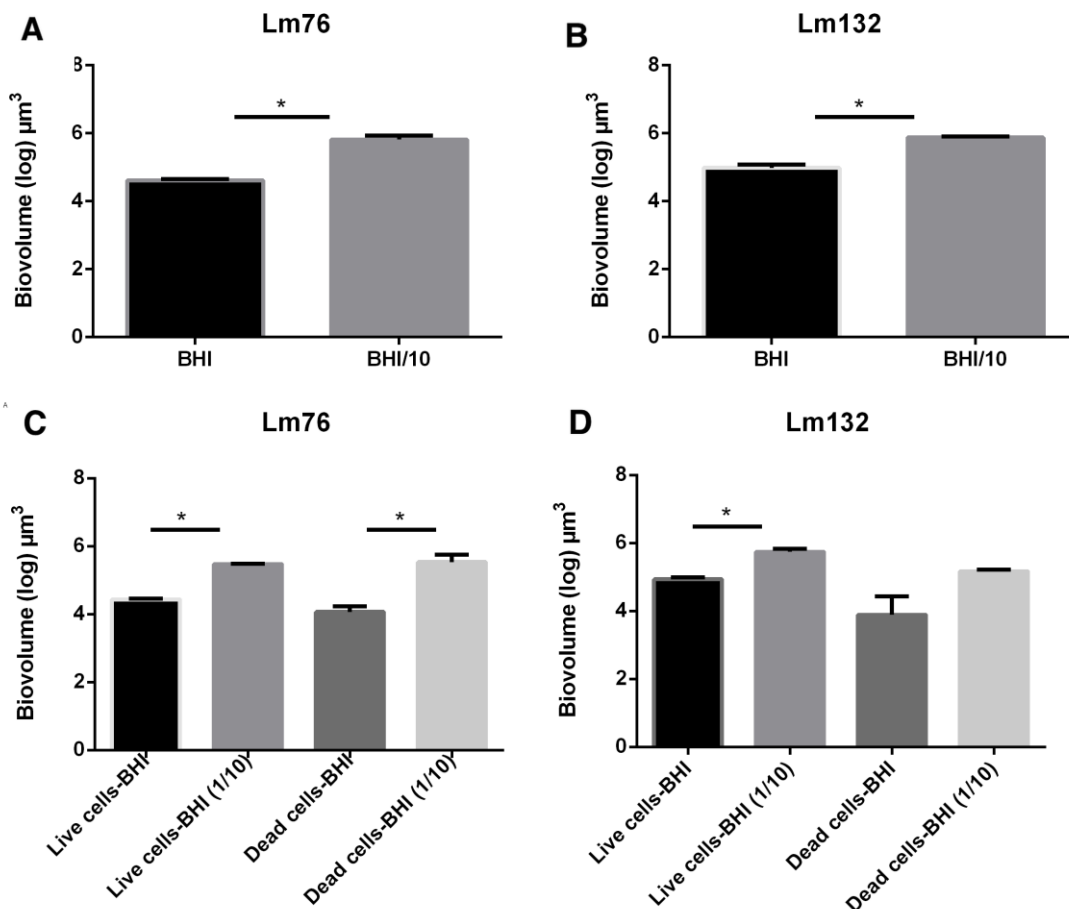


Figure 26 : Biovolume calculation of biofilm formed in microfluidic conditions by *Listeria monocytogenes* Lm76 and Lm132 strains grown in a rich medium BHI and poor medium BHI/10 for 24h at 30°C; A) and B) Total biovolume of biofilm formation by Lm76 and Lm132 strains respectively which corresponds to the some of the live and dead biomass in each biofilm; C) and D) Biovolume of live (green cells) and dead (red cells) biomasses in Lm76 and Lm132 biofilm respectively. * P<0.05

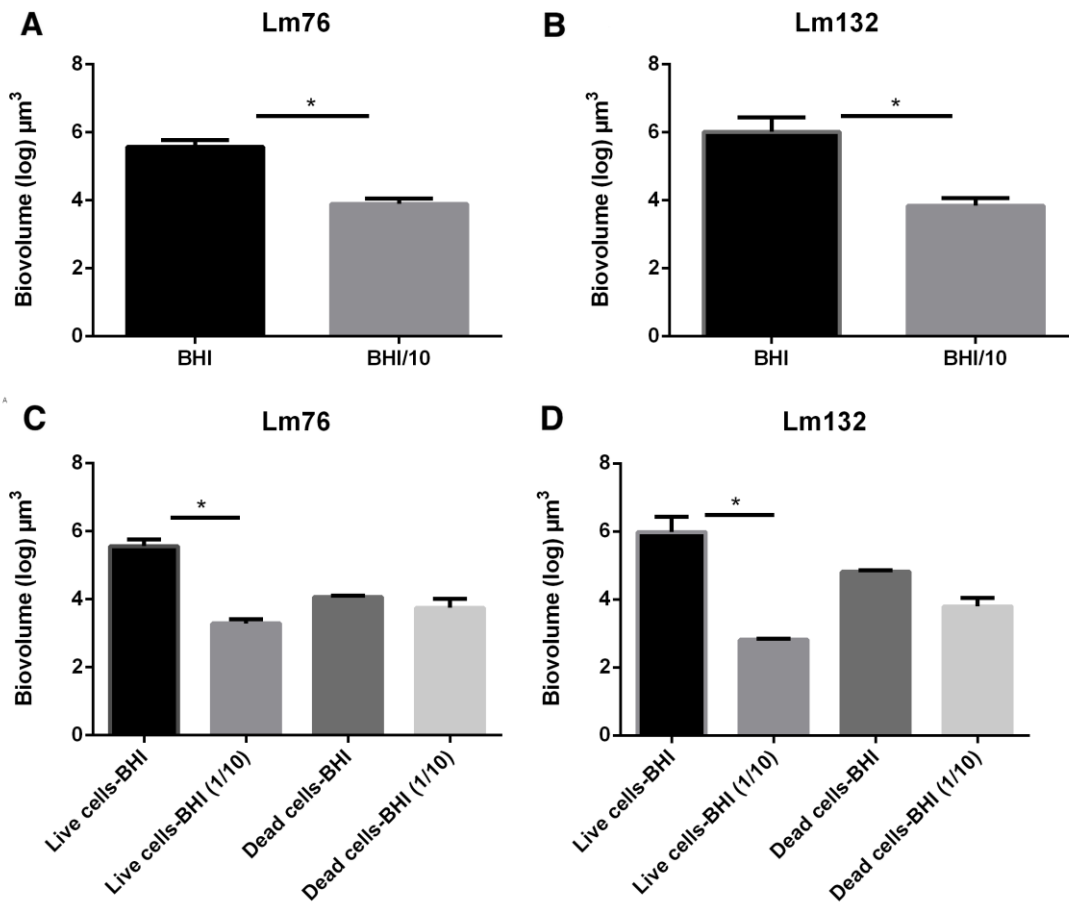


Figure 27 : Biovolume calculation of biofilm formed in static conditions by *Listeria monocytogenes* Lm76 and Lm132 strains grown in a rich medium BHI and poor medium BHI/10 for 24h at 30° C; A) and B) Total biovolume of biofilm formation by Lm76 and Lm132 strains Total biovolume of biofilm formation by Lm76 and Lm132 strains respectively which corresponds to some of the live and dead biomass in each biofilm; C) and D) Biovolume of live (green cells) and dead (red cells) biomasses in Lm76 and Lm132 biofilm respectively. * P<0.05

+18h without treatment

+ 18h of DNase I treatment

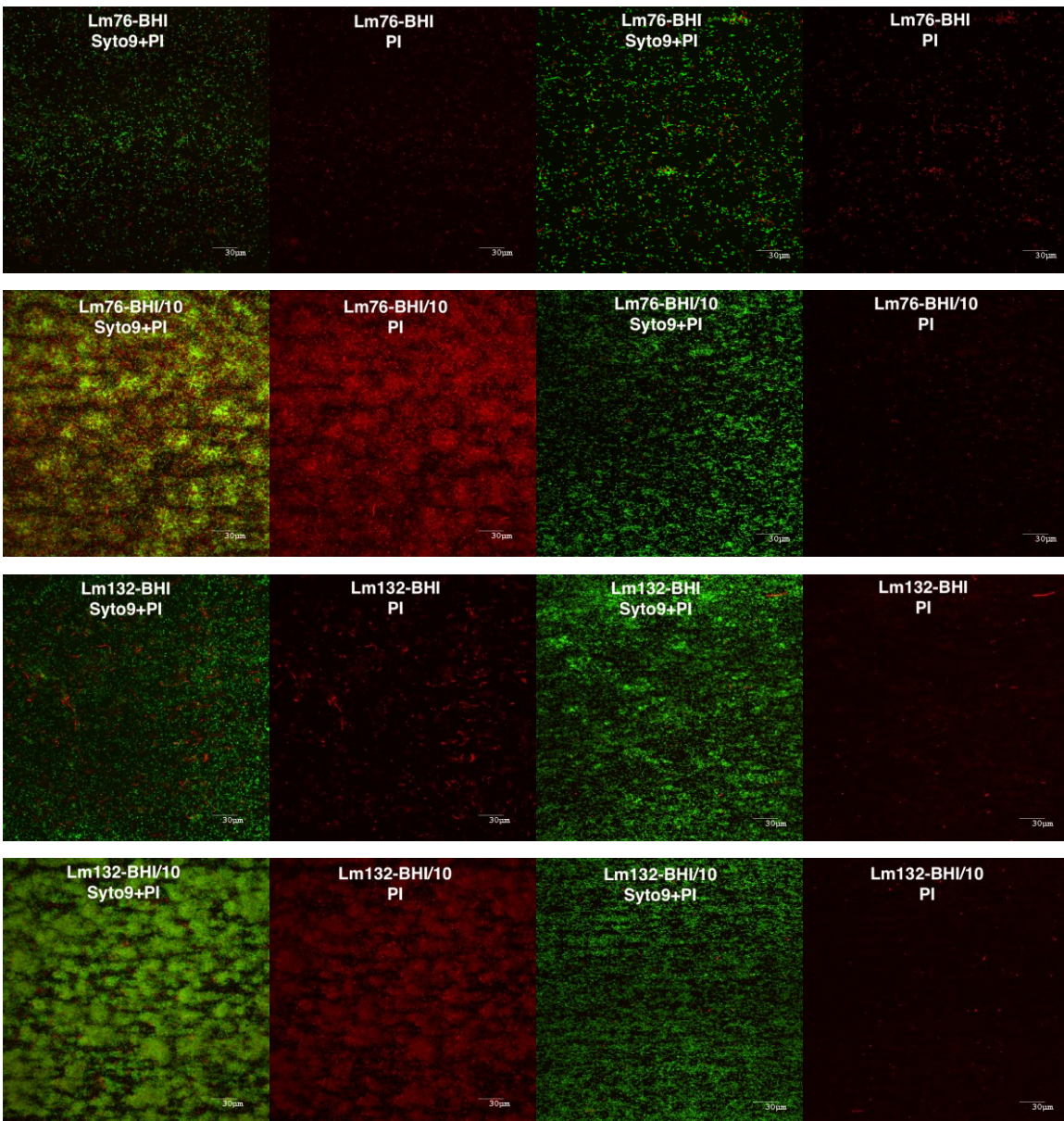


Figure 28 : Biofilm of Lm76 and Lm132 grown under BHI or BHI/10 medium as a control (right images) and BHI or BHI/10 containing 100µg/ml of DNase I (left images). All biofilms were stained with Syto9 and PI dyes after 18h with DNase treatment or without treatment. The images show, from the left to the right, biofilm stained with Syto9 and PI without treatment (the two left images) and biofilm stained with Syto9 and PI after DNase treatment to show the decrease of e-DNA and dead/damaged biomass

III.3 Article III

Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates reveals that their persistence in a pig slaughterhouse is linked to the presence of benzalkonium chloride resistance genes

Tamazight Cherifi, Catherine Carrillo, Dominic Lambert, Ilhem Miniaï, Sylvain Quessy, Guillaume Larivière-Gauthier, Burton Blais and Philippe Fravalo

[Article publié dans BMC Microbiol.](#) 2018; 18: 220. doi: [10.1186/s12866-018-1363-9](https://doi.org/10.1186/s12866-018-1363-9)

Contribution de la candidate à la réalisation de ce travail : J'ai participé activement au design expérimental de ce travail, à la réalisation des expérimentations, à l'analyse des données bio-informatiques et à l'interprétation des résultats. J'ai également rédigé l'article.

Abstract

Background: The aim of this study was to characterize the genomes of 30 *Listeria monocytogenes* isolates collected at a pig slaughterhouse to determine the molecular basis for their persistence.

Results: Comparison of the 30 *L. monocytogenes* genomes showed that successive isolates (i.e., persistent types) recovered from the same sampling site could be linked on the basis of single nucleotide variants confined to prophage regions. In addition, our study revealed the presence among these strains of the *bcrABC* cassette which is known to produce efflux pump-mediated benzalkonium chloride resistance, and which may account for the persistence of these isolates in the slaughterhouse environment. The presence of the *bcrABC* cassette was confirmed by WGS and PCR and the resistance phenotype was determined by measuring minimum inhibitory concentrations. Furthermore, the BC-resistant strains were found to produce lower amounts of biofilm in the presence of sublethal concentrations of BC.

Conclusions: High resolution SNP-based typing and determination of the *bcrABC* cassette may provide a means of distinguishing between resident and sporadic *L. monocytogenes* isolates, and this in turn will support better management of this pathogen in the food industry

Keywords: *bcrABC* cassette, benzalkonium chloride resistance genes, *Listeria monocytogenes*, pig slaughterhouse, whole genome sequences

Background

Listeria monocytogenes is a bacterial pathogen that causes listeriosis, the foodborne illness with the highest fatality rate (de Noordhout, Devleeschauwer et al. 2014, Charlier, Perrodeau et al. 2017). The ability of this organism to colonize and persist in food processing plants increases the risk of food contamination (Orsi, Borowsky et al. 2008). Persistent strains have been involved in some listeriosis outbreaks (Ericsson, Eklow et al. 1997, Independent Investigator into the Listeriosis and Weatherill 2009, Nakari, Rantala et al. 2014), making persistent contamination of *L. monocytogenes* an important consideration for public health. The importance of the persistence of *L. monocytogenes* in food processing plants has been previously discussed (Orsi, Borowsky et al. 2008, Ferreira, Wiedmann et al. 2014, Stasiewicz, Oliver et al. 2015). Whereas some *L. monocytogenes* strains can persist within the food processing environment for years (Orsi, Borowsky et al. 2008), some strains are merely transitory in these environments, and the approaches for their mitigation will be very different (i.e., different sanitation regimens). Many genetically distinct *L. monocytogenes* strains can be isolated sporadically during different sampling periods while other persistent strains can be isolated over the same periods (Ortiz, Lopez et al. 2010, Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014, Simmons, Stasiewicz et al. 2014). Although several explanations have been proposed for the persistence of specific *L. monocytogenes* strains (Carpentier and Cerf 2011), the reasons are not fully understood. It has been postulated that *L. monocytogenes* strains persist due to opportunistic colonization of harborage sites in food processing facility premises and on equipment (Carpentier and Cerf 2011). Alternatively, it has been suggested that the persistence of *L. monocytogenes* is linked to its ability to produce biofilms (Wang, Ray et al. 2015, Nowak, Cruz et al. 2017). Other studies using phenotypic methods have observed resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) in persistent strains (Aase, Sundheim et al. 2000, Lundén 2004, Fox, Leonard et al. 2011, Ortiz, López-Alonso et al. 2016). Recently, genetic factors associated with the QAC-resistance phenotype and resistance to benzalkonium chloride (BC), a QAC largely used in the food industry, were identified (Elhanafi, Dutta et al. 2010, Fox, Leonard et al. 2011, Dutta, Elhanafi et al. 2013, Müller, Rychli et al. 2013, Rosa Ebner, Stephan et al. 2015). These include the benzalkonium chloride resistance cassette *bcrABC* (Elhanafi, Dutta et al. 2010), in which *bcrAB* code for the small multidrug resistance protein family (SMR)

transporters and *berC* codes for a transcriptional factor (Rosa Ebner, Stephan et al. 2015). In addition, the *qacH* gene which codes for a SMR transporter associated with the export of benzalkonium chloride and acquired by the Tn6188 transposon (Müller, Rychli et al. 2013) (Ortiz, López et al. 2014, Ortiz, López-Alonso et al. 2016), and other QAC determinants originally observed in *Staphylococci* (Xu, Li et al. 2014).

Although there is no consensus on the definition of a persistent strain, a persistent status should be considered when the same molecular type is isolated many times at different visits within the same processing plant for a defined period of time (Carpentier and Cerf 2011). Therefore, identification of recurring highly genetically related isolates is the first step necessary in studying the association between resistance to BC and persistence. The persistence designation used in previous studies was based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing (Ortiz, López et al. 2014, Ortiz, López-Alonso et al. 2016), an international standardized method for *L. monocytogenes* characterization. However, recent studies using whole-genome sequencing (WGS) enabling the core genome/whole genome MLST (cgMLST/wgMLST) analyses and single nucleotide variant (SNV) analyses have demonstrated that a better discriminatory power can be achieved (Moura, Criscuolo et al. 2016, Hingston, Chen et al. 2017). WGS-based typing methods may allow for better clustering of highly-related persistent isolates.

In this study, we set to characterize three groups of *L. monocytogenes* strains – two persistent and one sporadic – isolated from a pig slaughterhouse, with a particular emphasis on the BC resistance genotype/phenotype of these strains. We also performed complementary analyses to identify high quality single nucleotide variants (hqSNVs) and predict affected functions on the basis of these SNVs.

Materials and methods

Sampling, bacterial isolation, and pulsed field gel electrophoresis characterization

Sampling procedures, bacterial isolation and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing were performed according to Lariviere-Gauthier *et al.*, (Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014). Briefly, bacterial strains were isolated from repeated environmental sampling at a pork slaughterhouse and cutting facility. The samples used in this study were collected during three separate visits over a one-month period, with an interval of two weeks between visits 1 and 2 and one week between visits 2 and 3. Samples were collected using pre-moistened swabs, after cleaning and sanitation procedures, on environmental surfaces in contact or not with the products, a list of surface types is detailed in Table 4. The disinfectant concentration used in this slaughterhouse, and specifically in cutting facility, was from 150-200ppm.

Another strain, Lis8316 belonging to the group B was isolated three years after in the same slaughterhouse.

Detection of *Listeria monocytogenes* was performed using Health Canada's MFHPB-30 based-method as described previously (Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014), briefly, two enrichment broths were used. The first enrichment was conducted in University of Vermont medium 1 broth (UVM-1; Lab M, Heywood, United Kingdom) for 24 h at 30 C°, and the second in Fraser broth (Lab M, United Kingdom) for 48h at 37 C°. Selective *Listeria* Ottavani and Agosti (ALOA; AES Chemunex, Bruz, France) agar was used to isolate *L. monocytogenes* strains from the two broths and the identification of isolates were based on the use of carbohydrates, Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP test), hemolysis and motility.

The pulsed field gel electrophoresis characterization of isolates was based on the Center disease and control center (CDC) PulseNet protocol (Graves and Swaminathan 2001). Pattern analysis was performed using Bionumerics software (version 6.5, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) and strains were clustered with the unweighted pair group method with arithmetic means.

For whole genome sequencing, strains were selected according to their recurrence during the sampling period (transient vs persistent). PFGE type 1 and 16 belonging to the sequence type (ST) 5 and 9 respectively, were considered persistent since they were isolated at each visit and after cleaning and sanitation procedures (respectively named persistent B and A). PFGE types 6, 10, 9, 18, 8 respectively with a ST of 6, 5, 5, 9 and 1 were considered to be transient or sporadic strains since they were isolated only at one visit. The persistent group A and B and sporadic strains are phylogenetically unrelated, even if the sporadic strain p961 (pulsotype 18) showed a polymorphism of three different bands with the group A considering *Apal* and *AscI* restriction profiles. A PFGE profiles of a representative strains from the group A and B and p961 strain (pulsotype 18) were given in a supplementary figure S1. The numbers and characteristic selection of isolates are detailed in Table 1.

DNA extraction and sequencing

One mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was inoculated with a single colony of *L. monocytogenes* and incubated for 4 to 6 h at 37°C. Bacterial cells were collected from 400 µL of culture by centrifuging at 15,000 x g for 2 min. Bacterial pellets were resuspended in 200 µL of lysis buffer containing 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ON, Canada) and 10 mg/mL lysozyme (Fisher scientific, ON, Canada) and incubated for 20 min at 37°C. Genomic DNA (gDNA) was extracted using the Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification kit (Promega, Madison, WI) as recommended by the manufacturer. DNA was then quantified using the Quant-iT™ High-Sensitivity DNA Assay Kit (Life Technologies Inc., Burlington, ON). Sequencing libraries were constructed from 1 ng of gDNA using Nextera XT DNA Sample Preparation and Index Kits (Illumina, Inc., San Diego, CA) according to manufacturers' instructions. Genomic sequencing was performed on the Illumina MiSeq Platform (Illumina, Inc.) using a 600-cycle MiSeq Reagent kit v3 (Illumina, Inc.).

Genome and plasmid assembly and annotation

Reads were quality checked and *de novo* assembled using SPAdes 3.12.0 (Bankevich, Nurk et al. 2012) with default settings. The resulting draft genomes were analyzed for assembly quality

using Quast 4.1 (Gurevich, Saveliev et al. 2013). For plasmid assembly, plasmidSPAdes (Bankevich, Nurk et al. 2012) pipeline was used to assemble only the plasmid from the WGS data using the default settings. To identify the presence of large plasmid pLM80 harboring the bcrABC cassette, the resulting plasmid assemblies were blasted online using the basic local alignment search tool (Blastn) from the National Center for Biotechnology Information's (NCBI) website (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with default settings using the nucleotide collection (nr/nt) database.

Core genome MLST (cgMLST) characterization

cgMLST was conducted using a genome-based characterization method developed by Moura et al. (2016). The assembled 30 genomes were submitted to the Institut Pasteur's website (<http://bigsd.bpasteur.fr/listeria/listeria.html>) for cgMLST typing using 1,748 loci and a cgMLST type (CT) was defined as a group of cgMLST profiles that differ by up to seven allelic mismatches out of 1,748 loci.

High quality core genome single nucleotide variant (hqSNV) analysis

The paired end reads of closely related isolates were quality trimmed and analyzed for hqSNV detection by using the SNVPhyl core genome hqSNV pipeline (<https://github.com/apetkau/core-phylogenomics>) (Petkau 2017), available as a tool shed in Galaxy (<https://toolshed.g2.bx.psu.edu/>). Briefly, the reference genomes were analyzed with PHASTER (Zhou, Liang et al. 2011, Arndt, Grant et al. 2016) for identifying phage regions. The paired end reads were mapped against the reference genomes using SMALT v0.7.5 (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/smalt-0>). The FreeBayes 0.9.20 was used to call the high-quality variants with a minimum depth coverage of 15 and a minimum mapping quality of 30. The minimum SNV abundance ratio was adjusted at 0.75. The uncalled positions were analyzed for sufficient coverage with the BCFTools that came in the SAMtools package. Reference genomes EGD-e (NCBI reference number NC003210.1) and 1/2b str 10-0810 (NCBI

reference number NZ_CP007168.1) were used for groups A and B respectively, according to their phylogenetically relatedness throughout all analyses.

SNV analysis

The resulting variants (hqSNVs) were annotated and filtered to the reference genome *Listeria monocytogenes* EGD-e (NC003210.1) with snpEff and snpSift program respectively (Cingolani, Platts et al. 2012) for the prediction of affected functions based on the identification of genes in which the mutations were found. In this study, only the high impact hqSNVs were taken into consideration (i.e. SNVs leading to a stop gained, start loss, or a frameshift).

Screening of benzalkonium chloride resistance genes in *L. monocytogenes* strains

Identification of genetic determinants for resistance was conducted at the Institut Pasteur, according to their established protocol (Moura, Criscuolo et al. 2016). Briefly, a set of resistance genes was identified based on previous studies (Kuenne, Billion et al. 2013, Gahan and Hill 2014, Maury, Tsai et al. 2016) and PATRIC, a public resistance gene database (Wattam, Davis et al. 2017). A BLASTn algorithm was used to identify the resistant genes with a minimum nucleotide identity of 70% and alignment length coverage of 70%. The results were represented in a presence-absence heatmap using the phandango visualization tool (Hadfield, Croucher et al. 2017).

Minimal inhibitory concentration of BC and PCR screening for *bcrABC*

To determine if the persistent groups were resistant to BC, Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined according to the clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines with minor modifications. Briefly, tryptic soy broth with yeast extract (TSBYE)

supplied with BC (Sigma-Aldrich, ON, Canada) at a final concentration covering a range from 0 to 200 ppm was inoculated with 10^{-5} CFU from an overnight culture. The plates were incubated at 30°C for 48h. The MIC was defined as the lowest concentration at which a growth inhibition was observed. The assay was conducted in triplicate.

PCR was used to confirm the presence of *bcrABC* genes. DNA was extracted from sporadic and persistent strains using Chelex (Biorad, Mississauga, ON, CA) as follows: isolates were plated on blood sheep agar and colonies were picked and resuspended in 50 µL of Chelex at 0.6% (w/v). The suspensions were heated first at 55°C for 30 min and then at 98°C for 15 min and were vortexed between steps. The solutions were centrifuged at 12000 rpm and the upper phase containing DNA was transferred to a clean tube and stored at 4°C for quick use. The PCR parameters consisted of an initial denaturation of 98°C for 30 s followed by 30 cycles of denaturation at 98°C for 30 s, annealing at 60°C for 40 s, elongation at 72°C for 1.30 min, and final elongation at 72°C for 5 min. The primers used here were designed in a previous study (Sidhu, Heir et al. 2002, Elhanafi, Dutta et al. 2010).

Biofilm formation ability

Isolates from all groups were tested for biofilm formation ability using the microtiter plate assay in the presence and absence of BC (Sigma-Aldrich, ON, Canada), briefly, an overnight culture in tryptic soy broth supplemented with 0.6 per cent (w/v) of yeast extract was inoculated to BHI (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented or not with 3.125 and 0,78 ppm of BC (at final concentration) at 1/1000. 100 µL of the inoculated BHI was distributed into each well of 96 well microplates (Costar® 3370; Corning, NY, USA) and incubated at 30°C for 48 h. The supernatant was discarded from the mature biofilm and this latter washed to eliminate planktonic cells before stained with Cristal Violet (CV) 0.1 % (w/v) for 20 min and washed two times. Ethanol 95% was used to solubilize CV within biofilm and Optical density (Od) was taken at 595 nm. Experiment was repeated in triplicate at different days.

Statistical analysis

To determine if there were differences in biofilm formation capacity between strains from the three groups in the presence and absence of BC, linear mixed model with group (A, B, C) and treatments (control, 3.125 and 0.78 ppm) as fixed factors and isolate as random factor. A series of a priori contrasts to compare the mean in the control groups with the mean in the other two treatments in each group and to compare the mean in each group for each treatment. Alpha level was adjusted with Benjamini-Hochberg procedure. Results were significantly different if $p < 0.05$.

Results

A total of 30 *L. monocytogenes* strains was isolated: 25 were persistent, present during all visits, and 5 were sporadic, present during a single visit. The 25 persistent isolates were sub-divided into 2 Groups, A, 6 isolates, and B, 19 isolates, based on their pulsotypes. The 5 sporadic isolates were assigned to Group C (Table 4).

The cgMLST analysis showed eight cgMLST types (CT) corresponding to the six Pulsotypes. It is noteworthy that all of the CTs observed in our study were new in the BIGSdb database of the Institut Pasteur (at time of analysis). All of the strains from the group B (pulsotype 1) belonged to the new CT2802 whereas the strains from group A (pulsotype 16) showed two different CTs, with one strain belonging to CT4145 and the rest of the group to CT2825 (Figure 30). Interestingly, the sporadic strain p961 (pulsotype 18) from sporadic strains group was closely related to persistent group A, and sporadic strains p959 and p976 were closely related to group B (Figure 29).

The SNVphyl analysis showed some differences in hqSNV's numbers within the persistent strains: with 0 to 25 hqSNVs in group A and 0 to 13 hqSNVs in group B. Thus, in group A, only the p984 strain exhibited a high number of hqSNVs (25) and was more distant from the remaining strains (Figure 30 A). Almost all the strains from group B harbored 4 hqSNV differences or fewer, except P978, p965 and Lis8316 strains which had more hqSNV differences

compared to the rest of group B. This was reflected by the close positions in the phylogenetic tree (Figure 30 B).

SNVs confined mostly to prophage regions

To study different functions affected by mutations, hqSNVs were analyzed with the snpEff program. The inferred function of impacted proteins by the hqSNVs were mostly related to bacteriophage proteins, particularly in group A (Figure 31). Most of the hqSNVs were found within phage A118 (Table 5 A). Furthermore, the position of these phages within the genome was the same between the unrelated persistent groups A and B (Table 5 A and B). There were 8 hqSNVs that were detected in genes coding for known functions of the *L. monocytogenes* core genome in group B, but five out of these eight were present in only one to four strains (Table 5 B). Otherwise, in group B, a SNV in the *comk* gene was identified at a position that resulted in a disruption of this gene due to loss of a stop codon (Table 5 B). A stop codon in the *inlA* gene was detected as well as the SNVs, and this was confirmed by Sanger sequencing of the *internalin A* gene (*inlA*) in group B strains in a previous study (Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014). These SNVs lead to a premature stop codon (PMSC). Interestingly, another SNV was detected in an *internalin B* gene (*inlB*) confirmed by BLASTn. The rest of the SNVs were detected in genes coding for hypothetical proteins. Among them, many shared similarities with the A118 phage proteins (Supplementary Table S1).

Presence of *bcrABC* in a persistent strains group B

In order to study the presence or absence of genes associated with the persistence phenotype, identification of accessory genes was conducted on the persistent groups as well as on the five different sporadic strains isolated from the same slaughterhouse. Our results showed the presence of *bcrABC*, a resistance gene cassette to BC, a commonly used agri-food sanitizers (Elhanafi, Dutta et al. 2010, Fox, Leonard et al. 2011, Dutta, Elhanafi et al. 2013, Müller, Rychli et al. 2013, Rosa Ebner, Stephan et al. 2015). More importantly, this genetic determinant was present in only persistent group B and in its closely related sporadic strain p959, while the stress response island genes (*ssiI*) were present in all strains except p957 and p983 (Figure 32). The

bcrABC cassette was identified in a plasmid with 80 kbp in all the persistent strain group B with 100 per cent similarity with plasmid pLM80-cont 507, previously described (Nelson, Fouts et al. 2004) with accession number of AADR01000010 (Figure 33). In addition to *bcrABC*, this plasmid was identified as a vector for cadmium and arsenic resistance as well (Nelson, Fouts et al. 2004). To confirm the presence of the *bcrABC* genes in only the group B, a PCR was conducted in all studied isolates. The PCR confirmed the presence of the *bcrABC* cassette in the group B and its absence in the group A and in sporadic strains (table 4). Furthermore, using the CMI test, we observed growth in all isolates from the group B at 6.25 ppm of BC, indicating decrease of sensitivity to this compound, while the rest of isolates from the group A and C did not grow at this concentration (table 6).

BC effect on biofilm ability is strain and concentration dependent

In order to investigate the ability of biofilm formation by strains from the persistent group A, B and the sporadic strains in the presence and absence of BC, microtiter plate assay for biofilm growth was performed on all isolates. Since only strains from group B grew at 3.125 ppm and strains from groups A and C grew in the presence of 0.78 ppm of BC, comparisons were done at the latter concentration. Results showed no significant difference between isolates from the three groups in absence or presence of BC (Figure 34 A and 34 B, respectively), in fact all the strains were able to form biofilm and seem to have an equal ability for biofilm formation. To study if BC affected the biofilm formation of strains in each group, biofilms formed in the presence of BC at 3.125 ppm (for group B strains) and 0,78 ppm were compared to the biofilms formed in the absence of BC. Results showed that biofilms formed in presence of BC decreased for all groups at all concentrations of BC, but the differences were not significant for group A and C strains grown in the presence of a sublethal concentration of 0.78 ppm compared to the biofilms grown in the absence of BC (Figure 34 C). In contrast, for group B strains, biofilm formation in the presence of BC at a sublethal concentration of 3.125 ppm was significantly lower than growth in the absence of BC (Figure 34 C).

Discussion

The aim of this work was to identify genetic determinants that could be associated with persistence of *L. monocytogenes* strains within the slaughterhouse environment. We were especially interested in the potential role of genetic determinants related to resistance to quaternary ammonium, an antimicrobial compound commonly used as a disinfectant in slaughterhouses.

The persistence phenotype of some *L. monocytogenes* strains has been previously reported (Orsi, Borowsky et al. 2008, Carpentier and Cerf 2011, Stasiewicz, Oliver et al. 2015), however, the reason why these strains can persist in the food processing environment is yet to be fully understood (Ferreira, Wiedmann et al. 2014). Here, we describe genomic characteristics of two unrelated persistent groups of strains isolated from slaughterhouse environments at three different times. Although our sampling interval was relatively short, we believe that the isolation of the same CTs at the same location after daily cleaning and sanitation procedures, is a sufficient parameter to attribute the persistence character to our isolates. Furthermore, a sampling completed three years after our sampling for this study at the same location allowed us to isolate the same CT from the group B (Lis8316).

The cgMLST and the SNVphyl analysis confirmed the close genetic relatedness between isolates of pulsotype 1 from group B belonging to ST5 and clonal complex (CC) CC5, a clonal group involved in a variety of food products and processing environments contamination as well as in at least two outbreak listeriosis in the United states (Chen, Luo et al. 2017). Two different CTs, CT2825 and CT4146 were distinguished in group A strains (pulsotype 16) leading to improved discriminatory power, as reported in previous studies (Maury, Tsai et al. 2016, Moura, Criscuolo et al. 2016). These CTs belonged to ST9 which was described previously as highly prevalent in the food associated *L. monocytogenes* strains (Chenal-Francisque, Lopez et al. 2011, Martin, Perich et al. 2014, Ebner, Stephan et al. 2015). The SNVphyl analysis showed the presence of 0 to 9 hqSNV differences in the persistent groups, except for strain p984, in group A, where the number of different hqSNVs reached 25 relatives to the rest of the strains. This result was in accordance with cgMLST typing as this strain had a different CT from the rest of

group A. The number of hqSNVs did not vary significantly between each period and between strains within the two persistent groups, indicating that the strains were closely related. Indeed, there were no differences between them based on the number of SNVs. Such results are in accordance with other studies that observed limited accumulation of SNVs between two closely related strains isolated from a food processing plant at a 12-year interval (Orsi, Borowsky et al. 2008). In the current study, a great proportion of SNVs were confined to prophage regions in the genomes and there were very few biologically significant mutations affecting the core genome. Thus, while previous studies showed that prophage insertion into the *L. monocytogenes* genome was the most important element contributing to the diversification of the strains (Orsi, Borowsky et al. 2008), here we demonstrated *in silico* that the genes most affected by non-synonymous SNVs were also related to the prophage genes. These findings support the largely recognized view of the high stability of the *L. monocytogenes* genome (Orsi, Borowsky et al. 2008, Holch, Webb et al. 2013, Kuenne, Billion et al. 2013, Moura, Criscuolo et al. 2016). The presence of the *comk* prophage in the group B strains is in accordance with the persistence character of these strains and the association of the ST5 strains to food processing environment as described in previous study (Verghese, Lok et al. 2011). This study allowed the identification of *bcrABC* in persistent strains group B. These results complement the Ortiz et al. study (Ortiz, López-Alonso et al. 2016) where they found the *tn6188* transposon, which is known to serve as a vector for the *qacC* resistance gene transfer in persistent strains. Efflux pump *bcrABC* was described in *L. monocytogenes* for the first time by Elhanafi et al. in a large *Listeria monocytogenes* plasmid, pLM80 (Elhanafi, Dutta et al. 2010). This plasmid was also previously identified as the vector for cadmium and arsenic resistance determinants in *L. monocytogenes* (Nelson, Fouts et al. 2004).

Since then, many studies found the *bcrABC* in strains isolated from retail foods (Rosa Ebner, Stephan et al. 2015, Xu, Nie et al. 2016, Meier, Guldemann et al. 2017). The presence of *bcrABC* in strain Lis8216, isolated within a 3-years interval, may indicate the stability of the plasmid harboring this gene in environments where BC is commonly used. Moreover, persistent group B was isolated from conveyor surfaces, which have the greatest exposure to BC. However, in our analysis, if these strains were confirmed as less sensitive to BC treatments, they should still be considered as sensitive to BC concentrations used in the slaughterhouses where the sampling

was done. This apparent paradox was previously reported (Fox, Leonard et al. 2011, Xu, Li et al. 2014, Moretro, Schirmer et al. 2017) and was attributed to a dilution effect during sanitation procedures on wet surfaces, leading to sub-inhibitory concentrations of the disinfectants as reported previously (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016). Persistent group A did not harbor the *bcrABC* cassette, and strains from this group were more sensitive to BC as compared to the ones in group B. Therefore, group A isolates were susceptible to BC. It is noteworthy that these strains were collected from equipment (e.g., saws), places known to be hard to clean, one may suppose that strains residing in such areas could not be exposed frequently to disinfectant. It is therefore easy to hypothesize that strains from group A did not submit pressure selection for *bcrABC* acquisition. Results for biofilm formation ability showed no significant differences between strains from persistent and non-persistent groups and all isolates were able to form a 48h mature biofilm. Similar results were shown in previous studies where persistent and non-persistent *L. monocytogenes* strains isolated from different sources showed an equal biofilm formation capacity (Nilsson, Ross et al. 2011). Same results were obtained from environmental and food product strains in other recent studies where authors suggest that biofilm formation could not be a determinant for persistence (Koreňová, ORAVCOVÁ et al. 2016) or the persistence of studied *L. monocytogenes* strains was not linked to biofilm formation ability and other determinants should be investigated (Costa, Bertolotti et al. 2016). The presence of BC at 0.78 ppm during biofilm formation seems not to affect biofilm amount between the three groups, and when strains were compared for their ability to form biofilm in the presence and absence of BC, only isolates from group B seemed to be affected by the sublethal concentration of BC at 3.125, which may indicate the strain-specific variable responsiveness to the effect of BC on biofilm formation, and it appears that BC-resistant strains produced significantly less biofilm than susceptible strains as reported previously (Ortiz, López et al. 2014). It is not understood why BC-resistant *L. monocytogenes* strains had less ability to form biofilm in the presence of BC, though previous investigators suggested that modification of cellular morphology, phospholipids and fatty acids could be involved in biofilm formation (Ortiz, López et al. 2014).

Further studies using a greater number of unrelated strains should be conducted in different conditions, particularly those which mimic the slaughterhouse environment.

Our findings support the hypothesis that persistence, in the case of the strains from the group A, was related to biofilm formation and/or ecological niches formation in hard-to-clean places. Indeed, some authors suggested that persistence could be related to colonization of ecological niches less accessible during sanitation procedures as reported in previous reviews by Carpentier and Cerf (2011) and Ferreira et al. (2014) where authors concluded that there was no association between persistence and any phenotypic characteristics like biofilm formation and resistance to QAC (Carpentier and Cerf 2011, Ferreira, Wiedmann et al. 2014). While we cannot exclude that some environmental sites were less efficiently cleaned, our findings support that there is not always only one determinant explaining the persistence of *L. monocytogenes* strains and that this phenomenon could be due to multiple factors facilitating the survival of this bacterium. This could explain why some studies focusing on only one determinant, like resistance to QAC, could not find a causal effect with persistence (Stasiewicz, Oliver et al. 2015, Ortiz, López-Alonso et al. 2016). We propose that the localized environmental conditions in which strains were isolated in the food processing plant could give clues to identify which determinant(s) enhances the strain's survival. Thus, isolates collected from a conveyor known to be the most exposed surfaces to QAC disinfectants may benefit from QAC resistance while isolates recovered from difficult to clean surfaces may benefit from better biofilm formation phenotypes. We believe that persistent strains possess at least one, but most likely many persistence-associated determinants leading to survival in their specific environment conditions.

Conclusion

In this study, we described the distribution of non-synonymous SNVs in persistent *L. monocytogenes* genomes from a food processing environment and found evidence that the presence of genetic determinants associated with resistance to BC could be linked to the persistence of *L. monocytogenes* strains. The ability to differentiate between sporadic and persistent environmental contamination events using the methods described will be a key element in guiding risk management actions, such as determining the type of sanitary interventions (e.g., aggressive versus standard) required to mitigate identified hazards and adapt cleaning and sanitation procedures to avoid recurrent food contamination.

Declarations

- Ethics approval and consent to participate

Not

applicable

- Consent to publish

Not applicable

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

All genomes (except for the strain Lis8316 for which the genome is not published yet as it belongs to another current project) were submitted and published in the GenBank database on the NCBI web site (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>) and in the Institut Pasteur database

(http://bigsdbs.pasteur.fr/perl/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_listeria_isolates_public&page=query) with the accession number of the bioproject PRJNA433177 and detailed in the supplementary Table S2

Abbreviations

QAC: Quaternary ammonium compound

SMR: Small multidrug resistance

BC: Benzalkonium Chloride

WGS: Whole Genome Sequencing

SNV: Single Nucleotide Variant

hqSNV: High Quality Single Nucleotide Variant

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

UVM: University of Vermont Medium

BHI: Brain Heart Infusion

CAMP: Christie-Atkins-Munch-Petersen

CDC: Center disease and control center

ST: Sequence Type

NCBI: National Center of
CT: cgMLST Type
CLSI: clinical and laboratory standards institute
MICs: Minimal inhibitory concentrations
TSBYE: Tryptic Soy Broth Yeast Extract
PMSC: Premature Stop Codon
Acknowledgements

We thank Dr Alexandra Moura from Institut Pasteur for providing the cgMLST of the *L. monocytogenes* isolates, Dr Guy Beauchamp from the University of Montreal for statistical analysis, Paul Manninger from the Canadian Food Inspection Agency for the whole-genome sequences of the isolates and Dr Austin Markell from the Canadian Food Inspection Agency for critical reading of the manuscript.

Funding

This work was funded by the Canadian Food Inspection Agency (Food 1020 and 1231) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) RDCPJ 520873-17. The funding organisms did not have any influence neither in the design of the study, in the analysis and the interpretation of data, nor in the writing of the manuscript.

Authors' contributions

TC, PF, CC, DL and BB designed the study, TC, GLG and CC performed the experiments, TC, CC, IM analyzed the data, TC, BB, PF and SQ interpreted the results. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Aase, B., G. Sundheim, S. Langsrud and L. M. Rorvik (2000). "Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* 62 (1-2): 57-63.
- Arndt, D., J. R. Grant, A. Marcu, T. Sajed, A. Pon, Y. Liang and D. S. Wishart (2016). "PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool." *Nucleic Acids Res* 44 (W1): W16-21.
- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham and A. D. Prjibelski (2012). "SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing." *J Comput Biol* 19 (5): 455-477.
- Carpentier, B. and O. Cerf (2011). "Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises." *Int J Food Microbiol* 145 (1): 1-8.
- Charlier, C., E. Perrodeau, A. Leclercq, B. Cazenave, B. Pilmis, B. Henry, A. Lopes, M. M. Maury, A. Moura, F. Goffinet, H. B. Dieye, P. Thouvenot, M. N. Ungeheuer, M. Tourdjman, V. Goulet, H. de Valk, O. Lortholary, P. Ravaud and M. Lecuit (2017). "Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study." *Lancet Infect Dis* 17 (5): 510-519.
- Chen, Y., Y. Luo, P. Curry, R. Timme, D. Melka, M. Doyle, M. Parish, T. S. Hammack, M. W. Allard and E. W. Brown (2017). "Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States." *PLoS One* 12 (2): e0171389.
- Chenal-Francisque, V., J. Lopez, T. Cantinelli, V. Caro, C. Tran, A. Leclercq, M. Lecuit and S. Brisse (2011). "Worldwide Distribution of Major Clones of *Listeria monocytogenes*." *Emerg Infect Dis* 17 (6): 1110-1112.
- Cingolani, P., A. Platts, L. L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S. J. Land, X. Lu and D. M. Ruden (2012). "A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3." *Fly* 6 (2): 80-92.

Costa, A., L. Bertolotti, L. Brito and T. Civera (2016). "Biofilm formation and disinfectant susceptibility of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates from Gorgonzola cheese processing plants." *Foodborne Pathog Dis* 13 (11): 602-609.

de Noordhout, C. M., B. Devleeschauwer, F. J. Angulo, G. Verbeke, J. Haagsma, M. Kirk, A. Havelaar and N. Speybroeck (2014). "The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis* 14 (11): 1073-1082.

Dutta, V., D. Elhanafi and S. Kathariou (2013). "Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* 79 (19): 6067-6074.

Ebner, R., R. Stephan, D. Althaus, S. Brisse, M. Maury and T. Tasara (2015). "Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2014 from different food matrices in Switzerland." *Food Control* 57: 321-326.

Elhanafi, D., V. Dutta and 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 (24): 8231-8238.

Ericsson, H., A. Eklow, M. L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L. O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad and W. Tham (1997). "An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout." *J Clin Microbiol* 35 (11): 2904-2907.

Ferreira, V., M. Wiedmann, P. Teixeira and M. J. Stasiewicz (2014). "*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health." *J Food Prot* 77 (1): 150-170.

Fox, E. M., N. Leonard and K. Jordan (2011). "Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates." *Appl Environ Microbiol* 77 (18): 6559-6569.

Gahan, C. G. M. and C. Hill (2014). "*Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract." *Front Cell Infect Microbiol* 4.

Graves, L. M. and B. Swaminathan (2001). "PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis." *Int J Food Microbiol* 65.

Gurevich, A., V. Saveliev, N. Vyahhi and G. Tesler (2013). "QUAST: quality assessment tool for genome assemblies." *Bioinformatics* 29 (8): 1072-1075.

Hadfield, J., N. J. Croucher, R. J. Goater, K. Abudahab, D. M. Aanensen and S. R. Harris (2017). "Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics." *Bioinformatics*: btx610-btx610.

Hingston, P., J. Chen, B. K. Dhillon, C. Laing, C. Bertelli, V. Gannon, T. Tasara, K. Allen, F. S. L. Brinkman, L. Truelstrup Hansen and S. Wang (2017). "Genotypes Associated with *Listeria monocytogenes* Isolates Displaying Impaired or Enhanced Tolerances to Cold, Salt, Acid, or Desiccation Stress." *Front Microbiol* 8.

Holch, A., K. Webb, O. Lukjancenko, D. Ussery, B. M. Rosenthal and L. Gram (2013). "Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart." *Appl Environ Microbiol* 79 (9): 2944-2951.

Independent Investigator into the Listeriosis, O. and S. Weatherill (2009). Report of the independent investigator into the 2008 listeriosis outbreak, Canada.

Koreňová, J., K. ORAVCOVÁ, A. VÉGHOVÁ, R. KARPÍ KOVÁ and T. KUČHTA (2016). "Biofilm formation in various conditions is not a key factor of persistence potential of *Listeria monocytogenes* in food-processing environment." *J Food Nutr Res* 55 (2).

Kuenne, C., A. Billion, M. A. Mraheil, A. Strittmatter, R. Daniel, A. Goesmann, S. Barbuddhe, T. Hain and 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 (1): 47.

Lariviere-Gauthier, G., A. Letellier, A. Kerouanton, S. Bekal, S. Quessy, S. Fournaise and P. Fravallo (2014). "Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec." *J Food Prot* 77(12): 2121-2128.

Letunic, I. and P. Bork (2016). "Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees." *Nucleic acids research* 44 (W1): W242-W245.

Lundén, J. (2004). "Persistent *Listeria monocytogenes* contamination in food processing plants."

- Martin, B., A. Perich, D. Gomez, J. Yanguela, A. Rodriguez, M. Garriga and T. Aymerich (2014). "Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants." *Food Microbiol* 44: 119-127.
- Martínez-Suárez, J. V., S. Ortiz and V. López-Alonso (2016). "Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments." *Front Microbiol* 7.
- Maury, M. M., Y.-H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. C. Rocha, S. Brisse and M. Lecuit (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." *Nat Genet* 48: 308.
- Maury, M. M., Y. H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. C. Rocha, S. Brisse and M. Lecuit (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." *Nat Genet* 48(3): 308-313.
- Meier, A. B., C. Guldemann, A. Markkula, A. Pöntinen, H. Korkeala and T. Tasara (2017). "Comparative phenotypic and genotypic analysis of Swiss and Finnish *Listeria monocytogenes* isolates with respect to benzalkonium chloride resistance." *Front Microbiol* 8: 397.
- Moretro, T., B. C. T. Schirmer, E. Heir, A. Fagerlund, P. Hjemli and S. Langsrud (2017). "Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry." *Int J Food Microbiol* 241: 215-224.
- Moura, A., A. Criscuolo, H. Pouseele, M. M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, J. T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer and V. Enouf (2016). "Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*." *Nat Microbiol* 2: 16185.
- Müller, A., K. Rychli, M. Muhterem-Uyar, A. Zaiser, B. Stessl, C. M. Guinane, P. D. Cotter, M. Wagner and S. Schmitz-Esser (2013). "Tn6188-a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride." *PLoS One* 8 (10): e76835.
- Nakari, U. M., L. Rantala, A. Pihlajasaari, S. Toikkanen, T. Johansson, C. Hellsten, S. M. Raulo, M. Kuusi, A. Siitonen and R. Rimhanen-Finne (2014). "Investigation of increased

listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010." *Epidemiol Infect* 142 (11): 2261-2269.

Nelson, K. E., D. E. Fouts, E. F. Mongodin, J. Ravel, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, D. A. Rasko, S. V. Angiuoli, S. R. Gill, I. T. Paulsen, J. Peterson, O. White, W. C. Nelson, W. Nierman, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madupu, D. H. Haft, J. Selengut, S. Van Aken, H. Khouri, N. Fedorova, H. Forberger, B. Tran, S. Kathariou, L. D. Wonderling, G. A. Uhlich, D. O. Bayles, J. B. Luchansky and C. M. Fraser (2004). "Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species." *Nucleic Acids Res* 32 (8): 2386-2395.

Nilsson, R. E., T. Ross and J. P. Bowman (2011). "Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions." *Int J Food Microbiol* 150(1): 14-24.

Nowak, J., C. D. Cruz, M. Tempelaars, T. Abee, A. H. M. van Vliet, G. C. Fletcher, D. Hedderley, J. Palmer and S. Flint (2017). "Persistent *Listeria monocytogenes* strains isolated from mussel production facilities form more biofilm but are not linked to specific genetic markers." *Int J Food Microbiol* 256: 45-53.

Orsi, R. H., M. L. Borowsky, P. Lauer, S. K. Young, C. Nusbaum, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. A. Ivy, Q. Sun and L. M. Graves (2008). "Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment." *BMC genomics* 9 (1): 539.

Orsi, R. H., M. L. Borowsky, P. Lauer, S. K. Young, C. Nusbaum, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. A. Ivy, Q. Sun, L. M. Graves, B. Swaminathan and M. Wiedmann (2008). "Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment." *BMC Genomics* 9: 539.

Orsi, R. H., M. L. Borowsky, P. Lauer, S. K. Young, C. Nusbaum, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. A. Ivy, Q. Sun, L. M. Graves, B. Swaminathan and M. Wiedmann (2008). "Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment." *BMC Genomics* 9 (1): 539.

Ortiz, S., V. López and J. V. Martínez-Suárez (2014). "The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* 189: 106-112.

Ortiz, S., V. Lopez, D. Villatoro, P. Lopez, J. C. Davila and J. N. Martinez-Suarez (2010). "A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant." *Foodborne Pathog Dis*7(10): 1177-1184.

Ortiz, S., V. López-Alonso, P. Rodríguez and J. V. Martínez-Suárez (2016). "The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis." *Appl Environ Microbiol* 82 (1): 308-317.

Petkau, A. (2017). "SNVPhyl: a single nucleotide variant phylogenomics pipeline for microbial genomic epidemiology." *Microb Genom* 3(6).

Rosa Ebner, R., R. Stephan, D. Althaus, S. Brisse, M. Maury and T. Tasara (2015). Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2014 from different food matrices in Switzerland. *Food Control* (57): 321-326.

Sidhu, M. S., E. Heir, T. Leegaard, K. Wiger and A. Holck (2002). "Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci." *Antimicrob Agents Chemother* 46 (9): 2797-2803.

Simmons, C., M. J. Stasiewicz, E. Wright, S. Warchocki, S. Roof, J. R. Kause, N. Bauer, S. Ibrahim, M. Wiedmann and H. F. Oliver (2014). "*Listeria monocytogenes* and *Listeria spp.* contamination patterns in retail delicatessen establishments in three U.S. states." *J Food Prot* 77(11): 1929-1939.

Stasiewicz, M. J., H. F. Oliver, M. Wiedmann and H. C. den Bakker (2015). "Whole-Genome Sequencing Allows for Improved Identification of Persistent *Listeria monocytogenes* in Food-Associated Environments." *Appl Environ Microbiol* 81 (17): 6024-6037.

Verghese, B., M. Lok, J. Wen, V. Alessandria, Y. Chen, S. Kathariou and S. Knabel (2011). "comK prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific

adaptation, biofilm formation, and persistence." *Appl Environ Microbiol* 77 (10): 3279-3292.

Wang, J., A. J. Ray, S. R. Hammons and H. F. Oliver (2015). "Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have *inlA* premature stop codons." *Foodborne Pathog Dis* 12 (2): 151-158.

Wattam, A. R., J. J. Davis, R. Assaf, S. Boisvert, T. Brettin, C. Bun, N. Conrad, E. M. Dietrich, T. Disz, J. L. Gabbard, S. Gerdes, C. S. Henry, R. W. Kenyon, D. Machi, C. Mao, E. K. Nordberg, G. J. Olsen, D. E. Murphy-Olson, R. Olson, R. Overbeek, B. Parrello, G. D. Pusch, M. Shukla, V. Vonstein, A. Warren, F. Xia, H. Yoo and R. L. Stevens (2017). "Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D535-D542.

Xu, D., Y. Li, M. Shamim Hasan Zahid, S. Yamasaki, L. Shi, J.-r. Li and H. Yan (2014). "Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods." *Int J Food Microbiol* 190: 24-30.

Xu, D., Q. Nie, W. Wang, L. Shi and H. Yan (2016). "Characterization of a transferable *bcrABC* and *cadAC* genes-harboring plasmid in *Listeria monocytogenes* strain isolated from food products of animal origin." *Int J Food Microbiol* 217: 117-122.

Zhou, Y., Y. Liang, K. H. Lynch, J. J. Dennis and D. S. Wishart (2011). "PHAST: A Fast Phage Search Tool." *Nucleic Acids Research* 39(suppl_2): W347-W352.

Zhou, Z., N.-F. Alikhan, M. J. Sergeant, N. Luhmann, C. Vaz, A. P. Francisco, J. A. Carrico and M. Achtman (2017). "GrapeTree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens." *bioRxiv*.

List of tables and figures

Table 4 : Strain origin and pulsotype (as determined by CDC PulseNet PFGE protocol) of isolates obtained during monitoring sampling of an industrial slaughterhouse over a four weeks period.

Isolates	ST ID (PFGE type [§])	Isolate characteristics*	Isolation dates (visit)	Origin
p960 p962 p958 p975 p985 p984	ST9 (16)	Persistent Group A	2011-02-26 (1) 2011-02-26 (1) 2011-02-26 (1) 2011-03-19 (2) 2011-03-27 (3) 2011-03-27 (3)	Viscera tank Chilling door Saw Saw Saw Bleeding
p963 p974 p964 p966 p967 p965 p968 p971 p972 p969 p970 p973 p980 p977	ST5 (1) ST5 (1)	Persistent Group B	2011-02-26 (1) 2011-03-19 (2)	meat conveyor

p978 p979 p981 p982	ST5 (1)		2011-03-27 (3)	
lis8316	ST5 (1)		2014-01-12	
p959 p961 p957 p976 p983	ST5(10) ST9(18) ST1(8) ST5(9) ST6(6)	Sporadic Group C	2011-02-26 (1) 2011-02-26 (1) 2011-02-26 (1) 2011-03-19 (2) 2011-03-27 (3)	Line Chilling entry Saw Floor Door

§ PFGE type corresponds to the Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV) nomenclature (Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014).

* Persistent vs sporadic groups determined by PFGE.

List of figures

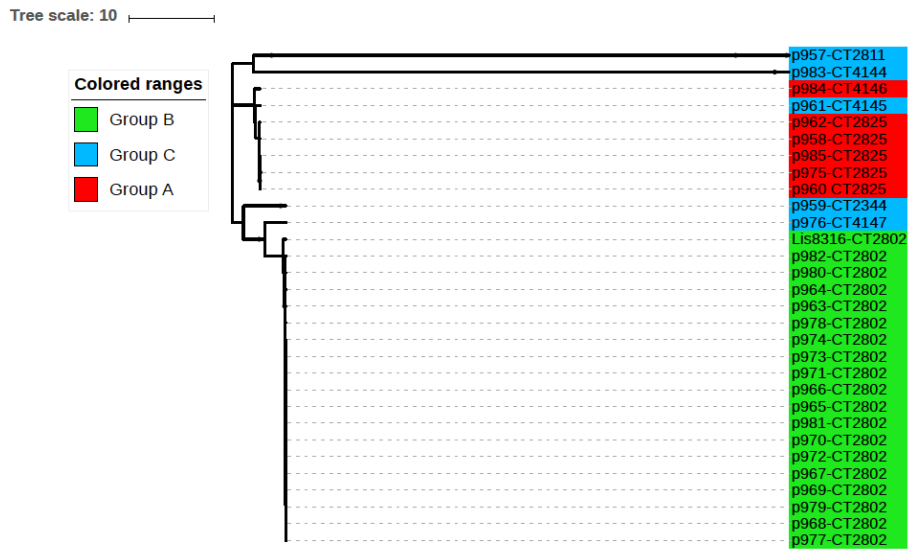


Figure 29 : Phylogeny reconstruction of the persistent groups A, B and the sporadic strains group C isolated from an industrial slaughterhouse over a four weeks period; the tree was based on the cgMLST allelic profile distances. The interactive tree of life (ITOL) was used to visualize the tree (Letunic and Bork 2016).

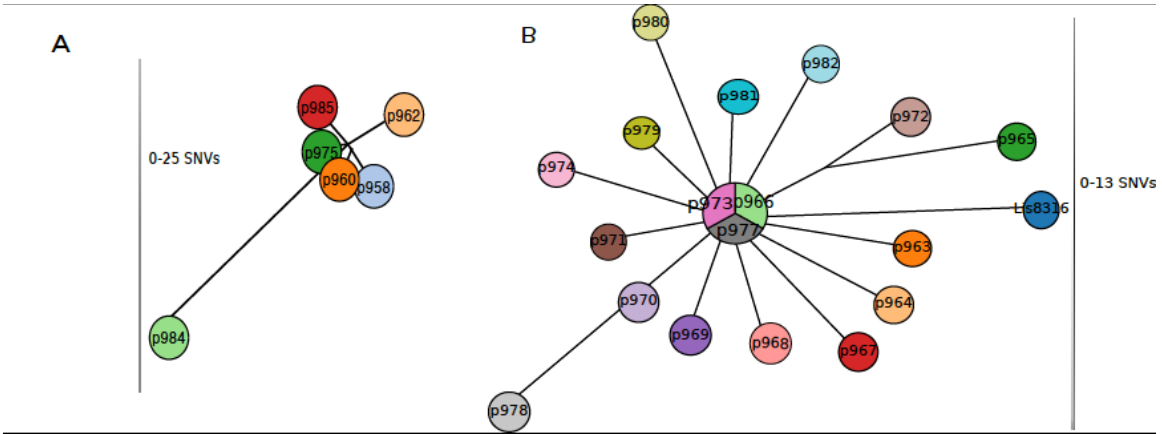


Figure 30 : Minimum spanning tree based on high quality core genome SNV positions identified amongst 6 genomes over 80% of the reference genome for the group A (2A), and amongst 19 genomes over 80% of the reference genome for the group B (2B). The visualization of the MST was done using GrapeTree (Zhou, Alikhan et al. 2017).

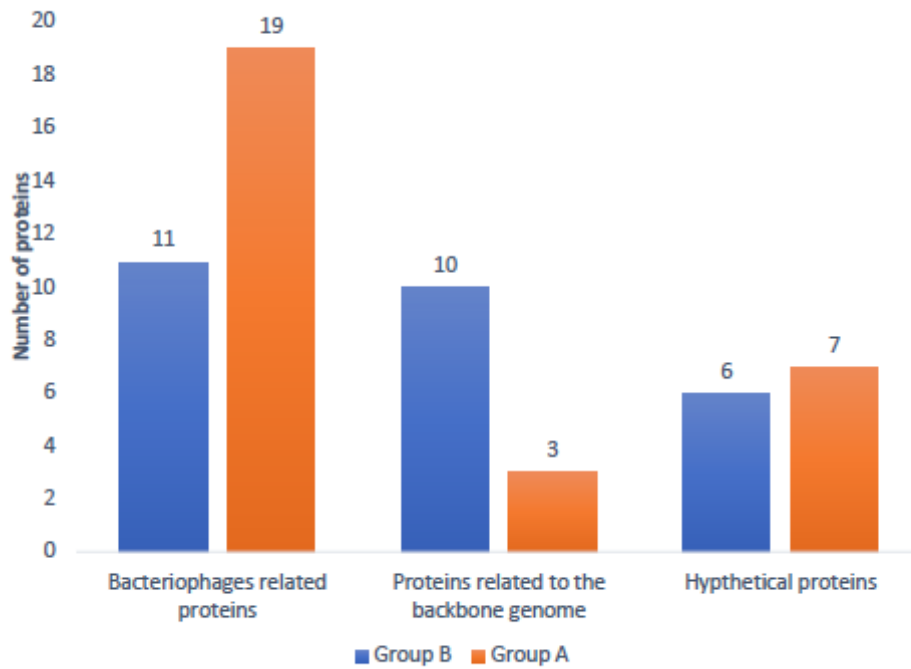


Figure 31 : Number of SNVs in *Listeria monocytogenes* isolates isolated from an industrial slaughterhouse over four weeks according to their annotations and function predictions using the snpEff in the persistent groups A and B. All the inferred functions to the known bacteriophage proteins were grouped in “Bacteriophage proteins”, all hypothetical proteins were grouped in one cluster, and the other affected functions related to the backbone genome of *L. monocytogenes* were grouped.

Table 5 : Composition of the annotated high impact SNVs in the persistent groups A (table A) and B (table B) in *Listeria monocytogenes* strains isolated from an industrial slaughterhouse over four weeks with their position and the altered nucleotide according to the references of the respective persistent groups.

A)

SNVs	REF-ALT	Position	Protein inference
H28	A-T	2365617	holin
H2	C-A	2366926	protein gp20
H6	A-C	2370180	Protein gp17
H11	G-T	2371838	putative tape-measure
H12	G-T	2376360	Protein gp15
H13	A-T	2378030	Protein gp11
H7	G-C	2383240	putative portal protein
H8	G-C	2387299	Protein gp66
H23	T-C	2396331	Protein gp43
H14	C-A	1134999	Cadmium resistance protein
H20	T-A	2268215	putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)
H3	G-A	2397250	Hypothetical protein
H21	G-A	2398304	Hypothetical protein
H4	C-A	2399019	Hypothetical protein
H22	T-A	2435024	Hypothetical protein
H24	T-C	2725852	Hypothetical protein
H29	C-T	2806268	Hypothetical protein
H30	C-T	2862889	Hypothetical protein
H25	A-G	2928670	Hypothetical protein
H9	G-C	2388916	Hypothetical protein
H5	T-C	2389387	Hypothetical protein

H19	G-A	1062031	Hypothetical protein
H26	G-T	1106182	Hypothetical protein
H27	G-T	1683477	Hypothetical protein
H15	A-T	2363489	Hypothetical protein

B)

SNVs	REF-ALT [§]	Position	protein inference
H1	T-C	13003993	DUF3310 domain-containing protein
H2	G-T	1307219	Phage tail measure protein
H6	T-A	1314894	Phage tail tape measure protein
H23	T-C	1300393	VRR-NUC domain-containing protein
H11	A-T	2467036	Phage antirepressor Ant
H12	C-G	2473719	recombinase family protein
H15	G-A	1323444	DUF3800 domain-containing protein
H16	T-A	447408	Polysaccharide deacetylase
H17	T-A	463360	Internalin A
H18	T-A	465225	Internalin
H19	C-A	2932396	6-phospho-beta-glucosidase
H21	T-A	1146752	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
H22	T-A	2347583	Oligoendopeptidase F
H26	G-T	431637	alpha-mannosidase
H27	G-T	972616	GntR family transcriptional regulator
H8	T-G	2432776	Competence protein Comk
H13	G-T	1307219	Peptidase

H5	G-A	2465545	Hypothetical protein
H9	G-T	2445638	Hypothetical protein
H20	G-A	2940879	Hypothetical protein
H24	A-C	2458383	Hypothetical protein
H25	A-G	79636	Hypothetical protein
H28	A-T	1430257	Hypothetical protein
H29	A-T	444637	Hypothetical protein
H10	G-T	2461077	hypothetical protein
H14	G-T	2445638	Hypothetical protein

§REF-ALT: Reference-Alteration: Definition of the nucleotides present in the reference genome and their substitution after the mutation in the genomes of this study

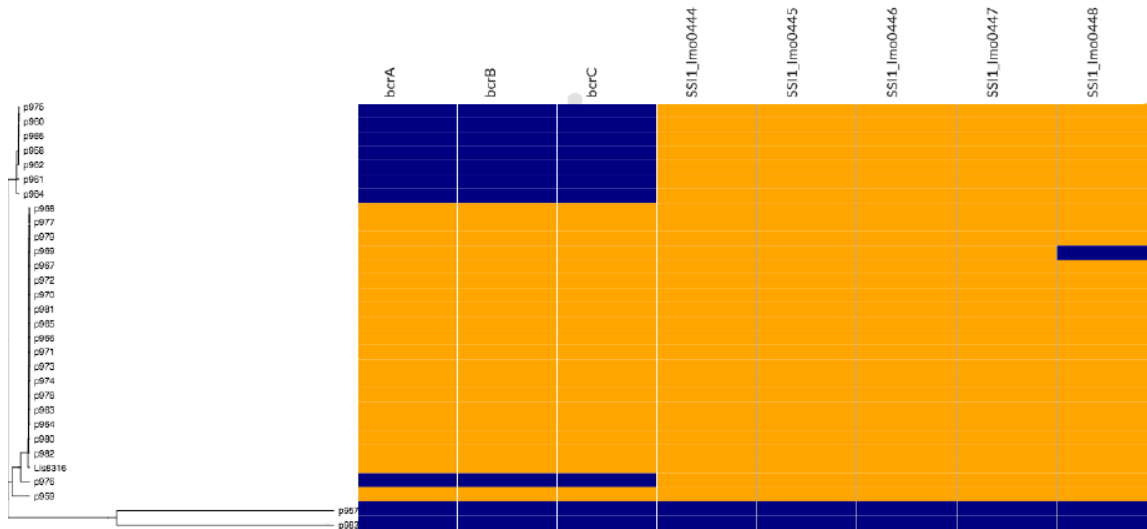


Figure 32 : Phylogenetic distribution of the resistance genes bcrABC and stress response genes (ssi-1) in *Listeria monocytogenes* strains isolated from an industrial slaughterhouse over four weeks; the presence-absence heatmap of the bcrABC and ssi-1 in the persistent and sporadic groups are shown in orange when present and blue when absent.

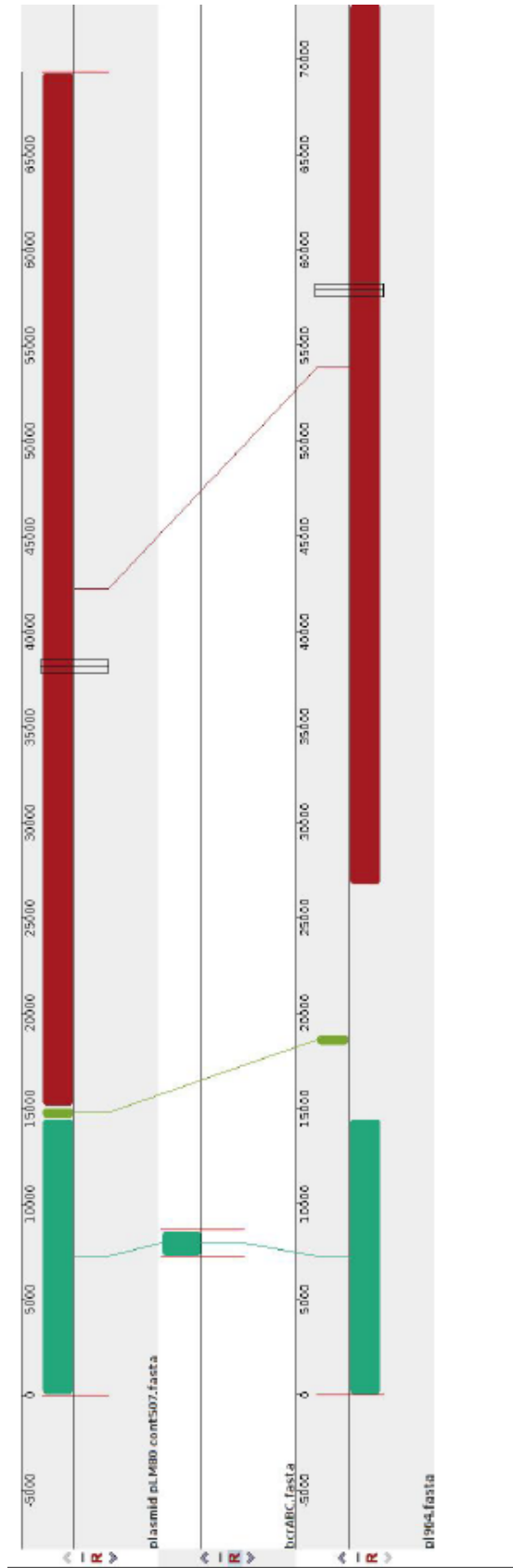


Figure 33 : Multiple sequence alignment of the *bcrABC* genes (accession number JX023284.1) and pLM80 cont 507 (accession number: AADR01000010) with a large plasmid identified in in persistent group B as shown in selected strain p964 (p964) and in a closely related strain Lis8316, isolated three years after the isolation of the rest group B strains.

Table 6: In silico and phenotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains from group A, B, and C isolated from an industrial slaughterhouse over a four weeks or three years (for Lis8216) period; In silico identification of determinants for persistence. Phenotypic determination of resistance to BC in *L. monocytogenes* strains isolated: Minimal inhibitory concentrations of all isolates. PCR screening test to identify the *bcrABC* cassette in the studied strains.

Genetic determinants	Strains		
	group A	group B	group C
In silico identification			
<i>bcrABC</i> resistance genes	-	+	-
Stress response island genes <i>ssi1</i>	+	+	+
<i>comk</i> prophages	-	+	-
Presence of pLM80 plasmid	-	+	-
Phenotypic confirmation			
<i>bcrABC</i> detection by PCR	-	+	-
Minimal inhibitory concentration	-	+	-

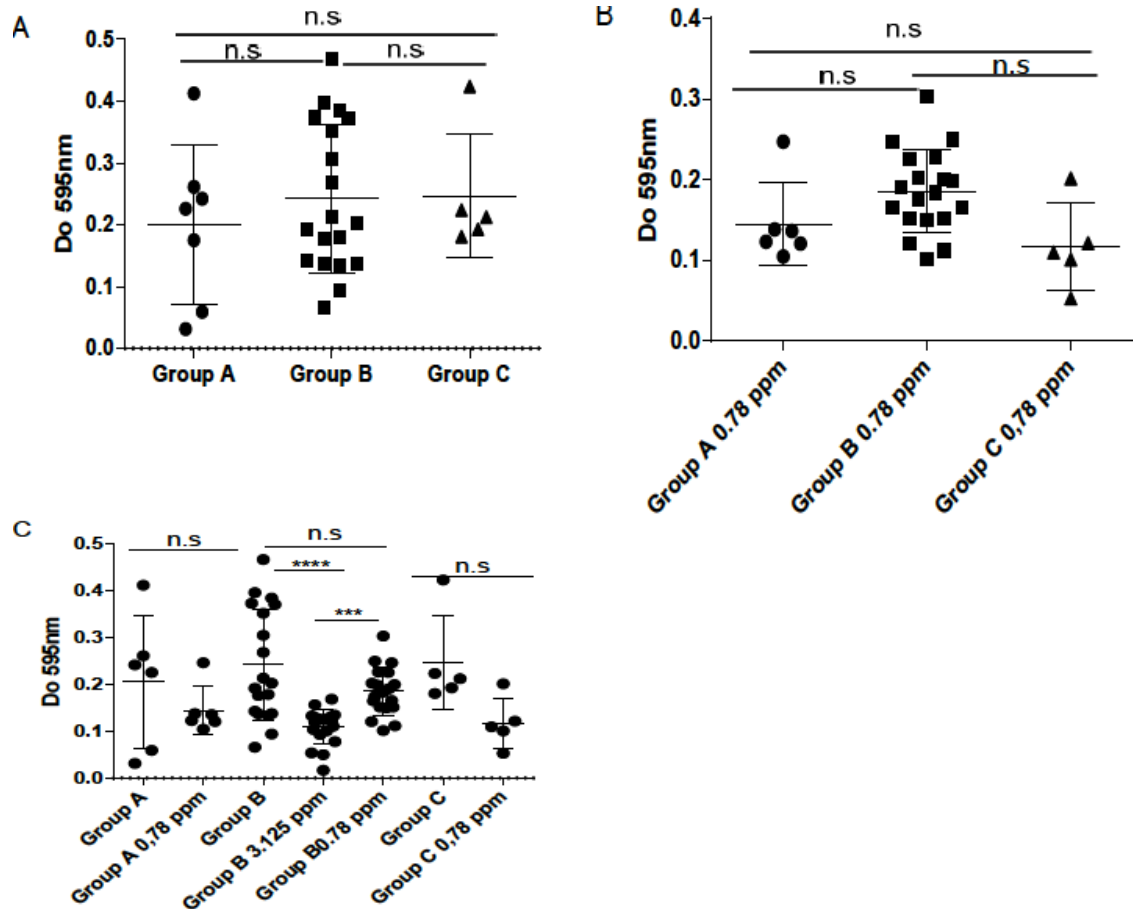


Figure 34 : Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* strains from persistent groups A, B and sporadic group C isolated from a pig slaughterhouse at three or four visits (for group B). A) comparison of biofilm formation ability between the group A, B and C in the absence of BC. B) comparison of biofilm formation ability between the group A, B and C in the presence of BC. C) Effect of BC at 3.125 and 0.78 ppm on biofilm formation capacity of persistent strains from the group A and B and the sporadic strains C. Significance, n.s: non-significant, **** : $p < 0.0001$, *** : $p = 0.0014$

Supplementary Table S1: complete annotation of the high impact SNV and function prediction for the group A (spreadsheet group A) and group B (spread sheet group B)

Supplementary Table S2: PRJNA433177 Assembly Details and Institut Pasteur ID of the 29 *Listeria monocytogenes* strains isolated from an industrial slaughterhouse over a 4 weeks period.

Supplementary Figure S1: Pulsed field gel electrophoresis profile of AscI and ApaI restriction enzymes in *L. 20 monocytogenes* strains isolated from a slaughterhouse over a four weeks period

III.4 Article IV

Metagenomic study of cleaned and sanitised conveyor surfaces revealed the co-occurrence of *Listeria monocytogenes* with other bacterial genera and their respective diversity

Cherifi Tamazight^{1,2,3}, Arsenault Julie^{2,3}, Sylvain Quessy^{1,3} and Philippe Fravallo^{1,2,3}

Article en préparation en vue de le soumettre dans le journal « The journal of applied Microbiology »

Contribution de la candidate à la réalisation de ce travail : J'ai participé activement au design expérimental de ce travail, à la réalisation des expérimentations, à l'analyse des données bio-informatiques et à l'interprétation des résultats. J'ai également rédigé l'article.

Abstract

Tolerance to disinfection and persistence on working surfaces are important attributes allowing bacterial pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, to survive and contaminate food products. Persistence is a complex phenomenon involving interactions between many bacterial genera within biofilm and is modulated by *in situ* characteristics such as the type of matrix and presence of remnant chemical compounds that might be present in case of disinfection context. Using molecular tools for characterization of microbial communities may allow to better appreciate the relative contribution of different bacteria to this phenomenon as well as to better understand the contamination risk by *L. monocytogenes*. In this work we sought to describe *in silico* the bacterial communities identified on meat cleaned conveyor surfaces after sanitation procedures through four sampling periods and to study co-occurrence between *Listeria spp.* and other bacterial genus. From the background microflora, a total of twenty-five genera, such as *Sphingomonas* and *Paracoccus*, were found to interact negatively with *Listeria spp.*, suggesting a possible *Listeria* growth inhibition or an absence of shared habitat. Through these results, a complete scenario of interactions of *Listeria spp.* and *L. monocytogenes*, was established which may contribute in identifying avenues that could prevent the growth and persistence of *L. monocytogenes* on working surfaces.

Introduction

The presence of *Listeria monocytogenes* in food processing plants is a major concern for food business operators and food authorities (Sofos 2008, Heir, Møretrø et al. 2018). The ubiquitous nature of this bacteria, combined to its ability to grow in harsh conditions including high salt concentrations and large temperature ranges, make its control within food production environment a continuous challenge (Ortiz, Lopez et al. 2010). Indeed, the ability of *L. monocytogenes* to persist within food processing environment was reported in many studies (Ortiz, Lopez et al. 2010, Fox, Leonard et al. 2011, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016, Ortiz, López-Alonso et al. 2016, Moretro, Schirmer et al. 2017) and the reason for this persistence phenomenon appears to be complex (Carpentier and Cerf 2011). *Listeria* biofilm formation and resistance to the commonly used disinfectants in industries may explain partly this persistence (Pan, Breidt et al. 2006, Fox, Leonard et al. 2011, Giaouris, Heir et al. 2014, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016, Ortiz, López-Alonso et al. 2016, Moretro, Schirmer et al. 2017). Indeed, authors have found an increased ability for biofilm production in *L. monocytogenes* persistent strains. Otherwise, the presence of resistance genes to quaternary ammonium compounds (QACs) in persistent strains isolated from food processing plant could be associated to the tolerance to disinfectants (Elhanafi, Dutta et al. 2010, Dutta, Elhanafi et al. 2013, Cherifi, Carrillo et al. 2018). Nevertheless, the biofilm composed of *L. monocytogenes* is expected in industry to include other species as was previously reported (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretrø et al. 2017). Thus, species dominated by Gram negative bacteria identified on a salmon slaughterhouse conveyor belts seemed to have, according to the authors, an inhibition effect on *L. monocytogenes* in a mixed biofilm (Langsrud, Moen et al. 2016). However, these studies were based on cultured-based method to identify communities present on conveyor surfaces, consequently, only the most abundant/cultivable bacteria could be identified based on such methods. Thus, nowadays there is no information about possible links and/or interactions between *Listeria monocytogenes* and other bacteria present on meat conveyor surfaces. While bacteria could co-occur or exclude each other for many reasons like competing for the same resources (Elias and Banin 2012, Zupančič, Raghupathi et al. 2018), the identification of a possible connection and co-occurrence of *L. monocytogenes* with other

particular bacterial genus may help industrials and other concerned food authorities to avoid the proliferation and /or persistence of this pathogen.

So far, there is a little, and somewhat debates, about the co-occurrence of *L. monocytogenes* and other bacteria species over time in food production. For instance, previous studies showed that *L. monocytogenes* was outcompeted by a mixture of bacterial species present on wooden shelves due mainly to competition to nutrients (Guillier, Stahl et al. 2008, Mariani, Oulahal et al. 2011). Inhibition of growth of *L. monocytogenes* could also be the result of bacteriocin molecules secretion by other species like *Enterococcus faecium* (Arihara, Cassens et al. 1993). Other studies, in contrast, demonstrated positive interaction between *L. monocytogenes* and other bacteria. Indeed, previous studies showed that *Flavobacterium spp.*, which was part of background microbiota of food processing plant, enhanced the colonization of *L. monocytogenes* on stainless steel surfaces (Bremer, Monk et al. 2001). Finally others reported no interaction between *L. monocytogenes* and other bacteria like *Pseudomonas fluorescens* as they have similar growth rate (Fagerlund, Møretro et al. 2017, Overney, Jacques-André-Coquin et al. 2017). The aim of this study was 1) was to define the microbiota diversity of meat conveyor surfaces, after cleaning and disinfection procedures, in one swine slaughterhouse at different dates and depending on samples with detection or not of *L. monocytogenes* in culture-based method and 2) to characterize the co-occurrence of *Listeria* genus with other bacterial communities present on cleaned meat conveyor surfaces. The whole microbiota was identified by high throughput 16s RNA sequencing of DNA extracted from samples collected at four different times, from which the traditional culture-based detection of *L. monocytogenes* was performed in parallel.

Materials and methods

Sampling procedure, sample analysis, bacterial growth

Samples were collected in the cutting facility of one slaughterhouse, during four visits, after cleaning and disinfection operations. Sampling consisted on a swabbing of 1m² of five meat conveyor surfaces after mechanical mobilization (brushing) using prewarmed wet swabs with a

D/E (Dey-Engley) neutralizing broth (Innovation Diagnostic, Saint-Eustache, QC, Canada). A total of 45 samples was collected. 100 ml of saline was added to each swab and shaken vigorously. A volume of 10 ml was taken into a separate tube, centrifuged and supernatants were discarded. The tubes containing pellets were immediately stored at -80 °C for DNA extraction. The detection of *L. monocytogenes* was performed on the 90 mL remaining suspension according to the MFHPB30 method (Pagotto 2001) with a few modifications, briefly, all samples were enriched in 90 ml of 2X concentrated University of Vermont media 1 (UVM-1; Innovation Diagnostics, Saint-Eustache, QC, CA) by incubation at 30°C for 48h. A second enrichment broth Fraser (Innovation Diagnostics, Saint-Eustache, QC, CA) was used at 37 °C for 24h. The cultures were plated on the selective media Compass agar (Innovation Diagnostics, Saint-Eustache, QC, CA) and typical colonies isolated on blood agar (Oxoid, Nepean, On, CA). The identification and characterization of *Listeria monocytogenes* was performed using the polymerase chain reaction (PCR) used for genoserogrouping (Kérouanton, Marault et al. 2010). For further analysis, all positive samples to *Listeria monocytogenes* by culture were referred as “pos” and negative samples as “neg”. In addition to samples, four controls (clean swabs and brush) corresponding to each visit were transported during sampling and were analyzed in the same way as samples for both bacteriological and molecular analyses.

DNA extraction, 16s RNA construction library and bioinformatics analysis

The conserved pellet from the step above was used for DNA extraction using the phenol chloroform protocol. Briefly, bacteria were lysed with a lysis buffer (Tris-Hcl, EDTA, NaCl and SDS) and glass beads with vortexing using the fastprep (MP Biomedical, Solon, OH, USA). The phenol Chloroform isoamylc solution was added to the supernatant and after mixing by inversion for 2 min, solution was centrifuged and phenol-Chloroform isoamylc was added to the supernatant. An additional 2min mixing was realized and finally the solution was centrifuged to collect the supernatant. Ammonium acetate and cold ethanol 100% were added to the supernatant and kept at -80°C for 24 h for DNA precipitation. After precipitation, the tubes were centrifuged at 14000 rpm for 15 min and the pellet was washed with ethanol before drying. The DNA was solubilized in a 50 µl of nuclease free water and stored at -20°C.

A PCR reaction on the v4 region in the 16s RNA was performed using the extracted DNA from samples of conveyor belt surfaces for 16S sequencing. The primers 515F/806R pair (Caporaso, Lauber et al. 2012) was used to amplify the V4 region and the libraries were prepared using the NEXTERA kit (Illumina). The sequencing technology Illumina Miseq was used to perform the paired end sequencing at Genome Québec Platform (<http://www.gqinnovationcenter.com/index.aspx>).

Illumina sequencing data analysis

Data were analyzed using Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) 2 v 2017.12 (Caporaso, Kuczynski et al. 2010) pipeline, the demultiplexed reads were filtered and denoised using Dada2 v 2017.12.1 software (Callahan, McMurdie et al. 2016) resulting in a amplicon single variants (ASVs) table.

ASVs table was clustered into operational taxonomic units (OTU) using vsearch (Rognes, Flouri et al. 2016) v 2018.8.0 and the clustering was done with a cluster features open reference (Rideout, He et al. 2014) with identity cutoff of 0.99. To minimize the impact of potential false positive and cross contamination, we used decontam package in R (Davis, Proctor et al. 2017) to detect and remove potential contaminants using default setting.

In order to take into account the phylogenetic relationship within microbiota diversity and its effect on the detection or not detection of *L. monocytogenes*, a phylogenetic tree was constructed from the resulting OTU table using FastTree 2 (Price, Dehal et al. 2010) to analyze the diversity indices.

To explore the abundance and composition of different observed OTUs in each sample and between samples according to the sampling periods and according to *L. monocytogenes* positive samples in culture-based method, alpha and beta diversity respectively were performed on rarefied sequences at 20000 counts per sample. This threshold was defined based on rarefaction curves of the raw sequences (supplementary-figure S1 and supplementary table 1) using phyloseq package (McMurdie and Holmes 2013) v 1.26.1 in R. For alpha diversity appreciation

of the community within each sample, Shannon index and its evenness were estimated. For beta diversity measures, Bray-Curtis and Jaccard distances were computed to explore the quantitative (community abundance) and qualitative (presence/absence) dissimilarities of microbial community respectively using phyloseq package in R. Pairwise comparisons between sampling periods were done using a Kruskal–Wallis test and Bonferroni multiple testing correction was used to adjust p-values.

To compare Bray-Curtis and Jaccard distances between samples of the four sampling periods and the two group of samples, pos and neg, pairwise Permanova was performed with 999 permutations.

To explore the presence on relationship between microbial communities and particularly with *Listeria* genus, we sought to study the presence of positive and/or negative correlations with one or several bacterial genera. Taxonomic composition of samples was identified by performing a pre-trained naïve Bayes classifier on the reference taxonomy and sequences from Silva database with 99 % identity (Quast, Pruesse et al. 2013). The feature classifier sklearn-classify (Quast, Pruesse et al. 2013) was used for taxonomic classification. In order to study the taxonomic composition of the conveyor surface microbial ecosystems and the relative proportion of their components, OTUs were assigned to the trained database.

To identify the co-occurrence between microbial populations and *Listeria* genus, CoNet program (Faust and Raes 2016) implemented in Cytoscape software v 3.3.0 (Shannon, Markiel et al. 2003) was used to perform correlation analysis between communities by constructing a network. An OTU-taxonomy table was used to construct network. The OTU-taxonomy table was filtered to discard feature with prevalence below 0.05% and OTU with the same taxa (at the genus level) were agglomerated using phyloseq package. The filtered table was used to construct network based on spearman and Pearson correlations, Bray-Curtis and Kullback-Leibler dissimilarities and finally mutual information for dependencies identification. Rare taxa were filtered to remove all taxa below minimum of 20 occurrences across all samples. For each metric and each edge 100 renormalized permutations and bootstrap score distributions were computed, Brown's method was used to merge all measures-specific-p-values and the false discovery rate

correction was computed with Benjamini-Hochberg multiple testing correction. In order to identify communities interacting with *Listeria*, a second network deriving from the general one was constructed taking into account only bacterial communities co-occurred with *Listeria* genus.

The resulted network was visualized in Gephi v 0.9.2 (Bastian, Heymann et al. 2009) using Fruchterman Reingold algorithm (Fruchterman and Reingold 1991). Nodes representing all communities having significant interactions were clustered using the modularity class to identify the community structure of the network (Blondel, Guillaume et al. 2008) and the size of each node represented the relative abundance of population.

Results

L. monocytogenes was detected by culture-based method in 13 (27.1%) out of the 48 samples. The sampling period 1 (sp1) and 2 (sp2) showed the highest proportion of positive samples (Table 7).

Table 7: Bacteriological detection of *L. monocytogenes* on a slaughterhouse conveyor surfaces after cleaning and sanitation. Results were shown according to the four sampling periods with one year between sp1 and sp2 and one month (for sp2, sp3 and sp4) of interval between each period.

Sampling period	Date of sampling	Number of samples	Number (%) of positive samples to <i>L. monocytogenes</i> (%)
Sp1	2014-05-23	12 ^a	6 (50)
Sp2	2015-01-18	12 ^b	5 (41.7)
Sp3	2015-02-07	12	1 (8.33)
Sp4	2015-02-28	12	1 (8.33)
Total		48	13 (27.1)

^a: 2 samples were not sequenced, ^b: one sample from the sp 2 was not sequenced

From 48 samples, 45 samples were sequenced with regard to the limited amount of DNA in the three remaining samples. Number of sequences after quality control analysis by Dada2 in the 45 sequenced samples ranged from 20287 to 229410 sequences (supplementary Table S1). All downstream analyses were performed based on the metadata table showed in the supplementary Table S1.

Qualitative and quantitative composition of background microbiota changed on conveyor surfaces during time

Diversity analysis based on alpha and beta indices revealed a high and changing diversity according to the sampling periods. Indeed, Shannons index and its Evenness showed that in the sp1 samples were less diverse and abundances of their components differed from the rest of sampling periods (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, Figure 35 a). The highest diversity and the higher abundance equality were observed during the sampling period sp2 with significant differences as compared to sp4 (Figure 35 a). Diversity comparisons between the group of samples positive and negative to *L. monocytogenes* (culture-based method) showed no difference (Figure 35 b). When richness estimations were compared between periods by pairwise permanova analysis based on Bray-Curtis and Jaccard distance matrices, the diversities were significantly different (Table 8) except between sp2 and sp3 (Figure 36 a and 36 b). Furthermore, same results were shown when analyzing the phylogenetic relationship based on weighted and unweighted Unifrac distances (data not shown). Diversity comparisons between the group of samples positive and negative to *L. monocytogenes* (culture-based method) showed no difference (Figure 36 c and d).

Table 8 : Pairwise Permanova analysis based on Bray-Curtis and Jaccard distance matrices with 999 permutations. Pseudo-F test was used to compare the four sampling periods.

Sampling period compared		<i>P</i> -value	
Group 1	Group 2	Bray-Curtis	Jaccard
sp1	sp2	0.001	0.001
sp1	sp3	0.001	0.003
sp1	sp4	0.001	0.001
sp2	sp3	0.401	0.152
sp2	sp4	0.001	0.001
sp3	sp4	0.009	0.002

A total of 114 different taxa were obtained after agglomerating OTUs with the same taxa at genus level (table 2). Overall, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Acidobacteria* were the most abundant phyla constituting 98.8 % of the background microbiota (Figure 37 a) and the relative abundance of *Proteobacteria* alone occupied 73.2 % of the total count followed by *Bacteroidetes* (12.4 %), *Actinobacteria* (9.9 %), and *Firmicutes* (2.7 %) (figure 37 a). *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* and *Caulobacter* were the most relatively abundant genus identified. Proportions of these taxa changed between sampling periods, thereby, in the sp1 *Pseudomonas* was highly dominant followed by *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, and *Sphingomonas* (Figure 37 b). *Listeria* appeared among the lowest relative abundance genus; thus, it was identified quasi exclusively in the sp1 and this was in accordance with the proportion of *L. monocytogenes* in culture-based method. Interestingly, while in the rest of sampling periods the proportion of *Pseudomonas* and *Listeria* decreased, the relative abundance of *Caulobacter* and *Sphingomonas* increased over the sampling periods to reach their higher level in the sp4 (Figure 37 b). The proportion of *Propionibacterium* and *Acinetobacter* increased also in the sp2, sp3 and sp4 respectively (Figure 37 b). In order to identify co-occurrence of *L. monocytogenes* (as established by bacteriological culture) with other bacteria belonging to a given genus (molecular based analyses), respective relative abundances of the top twenty most abundant genera per sample were kept. Results showed that *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* and *Acinetobacter* genus were highly prevalent in the pos

group as compared to the neg group, whereas *Sphingomonas* and *Caulobacter* were in high abundance in the neg group (Figure 37 c).

Differential community interaction

Our results showed the presence of co-occurrence among 80 communities with 788 links (Figure 38 a, 38 b). Network composed of eight modules corresponding to eight communities within network (Figure 38 a, 38 b). The community including *Listeria* genus was composed of 3 genera : *Zymomonas*, *Paracoccus*, *Acrobacter* and two unknown genera.

From the original network, two other ones, based on co-presence and mutual exclusion were constructed to include only correlations between the *Listeria* genus and other communities. According to our results, *Listeria* genus had no positive correlation with any other bacterial communities (Figure 39 a) but mutual exclusion was highly present between *Listeria* and other bacteria (Figure 39 b). Thus, twenty-nine genera belonging to the five phyla; *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Elucimicrobia* were involved in a negative relationship with the *Listeria* genus. Interestingly, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were the phylum which had more interactions with *Listeria* respectively while *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* and *Elucimicrobia* had only two, one and one genus respectively interacting with *Listeria*. From *Proteobacteria* phylum, *Sphingomonas* and *Caulobacter* genera accounted from the most abundant population in all samples interacting negatively with *Listeria* (Figure 39 b).

Discussion

In this study we aimed to describe the dynamic of microbial populations present on a cleaned meat conveyor surface over four sampling periods. The second objective of this was to identify *in silico* the co-occurrence of microbial populations with *Listeria* genus, including *Listeria monocytogenes*, as confirmed by a culture-based method.

The proportion of positive samples to *L. monocytogenes* observed here was at the same range that is was reported in other studies (Ortiz, Lopez et al. 2010). The relative abundance of *L. monocytogenes* revealed by 16S metagenomic in positive samples to *L. monocytogenes* were

higher than in negative samples. This concordance between the two methods may suggest that *L. monocytogenes* was the most prevalent species among *Listeria spp.* present in conveyor surfaces but the 16S sequencing based-method did not reach the species level for the most of bacteria. Moreover, when the classification could reach the species level, only *L. monocytogenes* was identified among *Listeria* genus (supplementary figure 2) but overall only six OTU were classified at species level. For this reason, we decided to keep genus level for all downstream analyses.

Overall, there was no significant difference in diversity of microbial communities (16S) between the group of positive and negative samples to *L. monocytogenes* (culture-based method). This result may indicate that the presence of *L. monocytogenes* may not be related to the variability (abundance of species) and variety (number of different species) of species composing the cleaned meat conveyor surfaces.

Diversity analysis showed significant difference in both composition and organization of microbial communities depending on sampling periods considered. Continuous new sources of bacteria, as new incoming materials, water or persons entering within the processing environment, augmented by differences in efficiency to withdrawn contamination from the surface by cleaning and disinfecting operations, should be considered in interpreting such a diversity. It is known, for example, that carcasses may contaminate plant environment (Nesbakken, Kapperud et al. 1996, Kathariou 2002). Thereby, from one batch to another, the microbiota composition (number and representation of the bacteria) could change particularly if we take into account the long interval between each sampling period (one year for sp1 and sp2 and one month between other periods). Otherwise, fluctuations in humidity, temperature, nutrient access, shear forces and other physico-chemical stresses could affect microbiota composition on conveyor surfaces from one period to another and one may think that only bacteria that can withstand these fluctuations could establish a resident niche as supported by Møretro and Langsrud (2017).

According to taxonomic classification *Proteobacteria* phylum was the most abundant phylum followed by *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Acidobacteria*. Few data are

available to discuss these distributions. Despite most phyla were the same as observed in another study, it was reported in this case that *Actinobacteria* was the most abundant phylum detected in meat samples (Rodríguez-López, Bernárdez et al. 2019). This discrepancy could be due to the fact that in this previous study, sampling was done before cleaning and sanitation and sampling covered different types of surface whereas in our study, we focused only on meat conveyor surfaces (meat cutting surfaces) and the sampling was done after cleaning and sanitation. It was reported that such factors may affect the composition of bacteria community (Møretrø and Langsrud 2017).

From the 114 identified genera, the Gram-negative *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* and *Caulobacter* were the most abundant genera across all sampling periods. These genera were already pointed out as the most important part of the background microbiota of meat conveyor surfaces (Fagerlund, Møretrø et al. 2017) as well as fish processing plant equipment (Fagerlund, Langsrud et al. 2016, Langsrud, Moen et al. 2016, Møretrø and Langsrud 2017, Heir, Møretrø et al. 2018). Furthermore, a residential character for *Pseudomonas* and *Acinetobacter* was reported previously beside their high biofilm forming ability (Fagerlund, Langsrud et al. 2016, Møretrø and Langsrud 2017) which may contribute to explain their high abundance. *Sphingomonas* genus was not detected when culture-based approaches were used while the sequence-based cultivation-independent approaches found this genus as the most abundant with *Pseudomonas*. (Brightwell, Boerema et al. 2006). Authors explain the failure to detect *Sphingomonas* in culture based-method may be attributed to the fact that some *Sphingomonas* need higher levels of growth factors such as Mg^{2+} (Hoo, Hashidoko et al. 2004) and to the competition effect between species (Brightwell, Boerema et al. 2006). We confirm a significant part of this genus to the microbial communities, and this underline complementarity of both methods for description of bacterial populations.

Listeria counted from the less abundant across the most represented phylum but the most representative genus, with *Staphylococcus*, in Firmicutes phylum. In accordance with previous studies, given the fact that *Listeria* and particularly *L. innocua* and *L. monocytogenes*, described as weak competitors in presence of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretrø et al. 2017), it could be expected that this genus could be less abundant

in our communities were both *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were well represented. Independently of the abundance, the co-occurrence of *Listeria* and *Pseudomonas* genus depending on sampling periods was in accordance with other studies where although some species of *Pseudomonas* like *P. putida* and *P. fragi* hampered the growth of *L. monocytogenes*, number of cells of this latter increased with the increase of *P. putida* and *P. fragi* biofilm (Giaouris, Chorianopoulos et al. 2013, Fagerlund, Møretro et al. 2017). Moreover, when *Pseudomonas* and *Listeria* grown in a mixed biofilm with other genera, it was shown that *Pseudomonas* dominated but did not eliminate *Listeria* from the biofilm (Langsrud, Moen et al. 2016). This may indicate that *Listeria* formed niches within *Pseudomonas* biofilm and could withstand cleaning and disinfection procedures and other harsh conditions. The all aforementioned conclusions were based only on the cultivation-based methods which is known to be limited in identification of numerous bacteria. The strong competition that occurred during enrichment steps in culture and the viable but non-cultivable properties of some species on surfaces in the other hand could explain the afore mentioned interest in non-culture-based analysis. For this reason, we aimed to study these interactions considering all bacterial populations using the 16s sequence-based method. Noteworthy this method cannot distinguish between dead and viable bacteria, so once interactions are identified, they should be confirmed by cultivation-based methods.

From the community network considering all bacterial populations and based on correlation and dissimilarities methods, only negative correlations between *Listeria* and other bacteria were detected. Such a situation was previously reported where among twenty-nine bacterial species recovered from dairy environment, sixteen of them induced reduction of biofilm formation of *L. monocytogenes* (Carpentier and Chassaing 2004). Such result indicate at least that these populations were not mutualistic, their niches were not common or competition for nutrients exist as reported in previous study in the case of multispecies biofilm (Yang, Liu et al. 2011). The competition between species could be related to nutrient limitation, increased by antimicrobial compounds production as reported by Giaouris et al (Giaouris, Heir et al. 2014). If we refer to what was observed about interaction between *Listeria spp.*, particularly *L. monocytogenes*, and other bacterial species, negative interactions were the most often reported results, where the growth of *L. monocytogenes* particularly in biofilm co-culture was hampered

(Zhao, Podtburg et al. 2013, Fox, Solomon et al. 2014, Langsrud, Moen et al. 2016). It is known that *Listeria monocytogenes* is a weak competitor when placed in co-culture (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017, Heir, Møretro et al. 2018), therefore, the observed results in our study is in line with this belief. It is noteworthy that, except for *Sphingomonas*, these bacteria have never been cultivated along with *Listeria spp.* The low abundance of these genera compared to *Pseudomonas* and *Sphingomonas* and hardness cultivation or non-cultivable of some of these genera, like certain species of *Herminiimonas* (Kim, Park et al. 2014) and *Pseudoclavibacter* (Oyaert, De Baere et al. 2013), could be the reasons why they were not detected in classical bacteriology. The negative interaction between *Listeria* and *Sphingomonas* was supported by previous study where *Sphingomonas* inhibited the growth of *L. monocytogenes* by production of astaxanthin (Mageswari, Subramanian et al. 2015) and more interestingly species from *Paracoccus* genus like *P. marcusii* which had a strong negative interaction with *Listeria* genus, is reported to produce astaxanthin as well (Lee, Kim et al. 2004, Oren 2011). Similar negative interaction with *Listeria* genus or *L. monocytogenes* was observed with other species like *Lactococcus lactis* (Zhao, Podtburg et al. 2013).

The source of contamination by these microorganisms on the conveyor surfaces may be multiple like the carcasses, the employee activities and as well as water. Indeed, this latter could have contributed to the conveyor surfaces contamination by *Sphingomonas* as previous study showed the high contribution of different sources of water (like mineral, seawater and water in sewage treatment plant) as a source of contamination by species from *Sphingomonas* genus (Balkwill, Fredrickson et al. 2006).

Conclusion

In summary, this study showed significant evolution in structure (diversity in composition and abundances) of residual microbiota on pork meat conveyor surfaces over time, which highlight non-stable bacterial communities composition to the meat industry environment. However, a core bacteria population represented by the most abundant bacteria, were often the same over time in this environment, strongly suggesting their residential abilities. From this background microflora, a total of twenty-five genera such as *Sphingomonas*, were found to interact

negatively with *Listeria spp.* suggesting a possible *Listeria spp.* growth inhibition. These results provide interesting information regarding relationship between background microflora and *Listeria spp.* in order to identify potential bacterial species inhibiting its persistence with the food production environment.

Conflict of interest

All authors declared no conflict of interest with this work

Funding

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) RDCPJ 520873-17. The funding organisms did not have any influence neither in the design of the study, in the analysis and the interpretation of data, nor in the writing of the manuscript

References

- Arihara, K., R. G. Cassens and J. B. Luchansky (1993). "Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* 19 (2): 123-134.
- Bastian, M., S. Heymann and M. Jacomy (2009). "Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks." *Icwsn* 8 (2009): 361-362.
- Blondel, V. D., J.-L. Guillaume, R. Lambiotte and E. Lefebvre (2008). "Fast unfolding of communities in large networks." *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* 2008 (10): P10008.
- Bremer, P. J., I. Monk and C. M. Osborne (2001). "Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp." *J Food Prot* 64 (9): 1369-1376.
- Brightwell, G., J. Boerema, J. Mills, E. Mowat and D. Pulford (2006). "Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis." *Int J Food Microbiol* 109 (1-2): 47-53.
- Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. P. Holmes (2016). "DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data." *Nat Methods* 13 (7): 581.
- Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Pena, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld and R. Knight (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." *Nat Methods* 7 (5): 335-336.
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser and M. Bauer (2012). "Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms." *ISME J* 6 (8): 1621.
- Carpentier, B. and O. Cerf (2011). "Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises." *Int J Food Microbiol* 145 (1): 1-8.

Carpentier, B. and D. Chassaing (2004). "Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises." *Int J Food Microbiol* 97 (2): 111-122.

Cherifi, T., C. Carrillo, D. Lambert, I. Miniaï, S. Quessy, G. Larivière-Gauthier, B. Blais and P. Fravallo (2018). "Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates reveals that their persistence in a pig slaughterhouse is linked to the presence of benzalkonium chloride resistance genes." *BMC Microbiol* 18 (1): 220.

Davis, N. M., D. Proctor, S. P. Holmes, D. A. Relman and B. J. Callahan (2017). "Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data." *bioRxiv*: 221499.

Dutta, V., D. Elhanafi and S. Kathariou (2013). "Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* 79 (19): 6067-6074.

Elhanafi, D., V. Dutta and 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 (24): 8231-8238.

Elias, S. and E. Banin (2012). "Multi-species biofilms: living with friendly neighbors." *FEMS Microbiol Rev* 36 (5): 990-1004.

Fagerlund, A., S. Langsrud, B. C. Schirmer, T. Møretrø and E. Heir (2016). "Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon and poultry processing environments and comparison with related strains." *PLoS One* 11 (3): e0151117.

Fagerlund, A., T. Møretrø, E. Heir, R. Briandet and S. Langsrud (2017). "Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces." *Appl Environ Microbiol*: AEM. 01046-01017.

Faust, K. and J. Raes (2016). "CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape." *F1000Research* 5.

Fox, E. M., N. Leonard and K. Jordan (2011). "Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates." *Appl Environ Microbiol* 77 (18): 6559-6569.

Fox, E. M., K. Solomon, J. E. Moore, P. G. Wall and S. Fanning (2014). "Phylogenetic Profiles of In-House Microflora in Drains at a Food Production Facility: Comparison and Biocontrol

Implications of *Listeria*-Positive and -Negative Bacterial Populations." *Appl Environ Microbiol* 80 (11): 3369-3374.

Fruchterman, T. M. and E. M. Reingold (1991). "Graph drawing by force-directed placement." *Software: Practice and experience* 21 (11): 1129-1164.

Giaouris, E., N. Chorianopoulos, A. Doulgeraki and G.-J. Nychas (2013). "Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride." *PLoS One* 8 (10): e77276.

Giaouris, E., E. Heir, M. Hebraud, N. Chorianopoulos, S. Langsrud, T. Moretro, O. Habimana, M. Desvaux, S. Renier and G. J. Nychas (2014). "Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods." *Meat Sci* 97 (3): 298-309.

Guillier, L., V. Stahl, B. Hezard, E. Notz and R. Briandet (2008). "Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves." *Int J Food Microbiol* 128 (1): 51-57.

Heir, E., T. Møretro, A. Simensen and S. Langsrud (2018). "*Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments." *Int J Food Microbiol* 275: 46-55.

Hoo, H., Y. Hashidoko, M. T. Islam and S. Tahara (2004). "Requirement of a relatively high threshold level of Mg²⁺ for cell growth of a rhizoplane bacterium, *Sphingomonas yanoikuyae* EC-S001." *Appl Environ Microbiol* 70 (9): 5214-5221.

Kathariou, S. (2002). "*Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective." *J Food Prot* 65 (11): 1811-1829.

Kérouanton, A., M. Marault, L. Petit, J. Grout, T. T. Dao and A. Brisabois (2010). "Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping." *J Microbiol Methods* 80 (2): 134-137.

Kim, S.-J., S.-J. Park, M.-Y. Jung, J.-G. Kim, E. L. Madsen and S.-K. Rhee (2014). "An uncultivated nitrate-reducing member of the genus *Herminiimonas* degrades toluene." *Appl Environ Microbiol*. 03975-03913.

Langsrud, S., B. Moen, T. Møretro, M. Løype and E. Heir (2016). "Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants." *J Appl Microbiol* 120 (2): 366-378.

Lee, J. H., Y. S. Kim, T.-J. Choi, W. J. Lee and Y. T. Kim (2004). "Paracoccus haeundaensis sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium." *Int J Syst Evol Microbiol* 54 (5): 1699-1702.

Mageswari, A., P. Subramanian, R. Srinivasan, S. Karthikeyan and K. M. Gothandam (2015). "Astaxanthin from psychrotrophic *Sphingomonas faeni* exhibits antagonism against food-spoilage bacteria at low temperatures." *Microbiol Res* 179: 38-44.

Mariani, C., N. Oulahal, J.-F. Chamba, F. Dubois-Brissonnet, E. Notz and R. Briandet (2011). "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening." *Food Control* 22 (8): 1357-1362.

Martínez-Suárez, J. V., S. Ortiz and V. López-Alonso (2016). "Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments." *Front Microbiol* 7.

McMurdie, P. J. and S. Holmes (2013). "phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data." *PLoS One* 8 (4): e61217.

Møretro, T. and S. Langsrud (2017). "Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality." *Compr Rev Food Sci Food Saf* 16 (5): 1022-1041.

Moreto, T., B. C. T. Schirmer, E. Heir, A. Fagerlund, P. Hjemli and S. Langsrud (2017). "Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry." *Int J Food Microbiol* 241: 215-224.

Nesbakken, T., G. Kapperud and D. A. Caugant (1996). "Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry." *Int J Food Microbiol* 31 (1-3): 161-171.

Oren, A. (2011). Characterization of pigments of prokaryotes and their use in taxonomy and classification. *Methods Microbiol*, Elsevier. 38: 261-282.

Ortiz, S., V. Lopez, D. Villatoro, P. Lopez, J. C. Davila and J. N. Martinez-Suarez (2010). "A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant." *Foodborne Pathog Dis* 7 (10): 1177-1184.

Ortiz, S., V. López-Alonso, P. Rodríguez and J. V. Martínez-Suárez (2016). "The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis." *Appl Environ Microbiol* 82 (1): 308-317.

Overney, A., J. Jacques-André-Coquin, P. Ng, B. Carpentier, L. Guillier and O. Firmesse (2017). "Impact of environmental factors on the culturability and viability of *Listeria monocytogenes* under conditions encountered in food processing plants." *Int J Food Microbiol* 244: 74-81.

Oyaert, M., T. De Baere, J. Breyne, E. De Laere, S. Mariën, P. Waets and W. Laffut (2013). "First Case of *Pseudoclavibacter bifida* Bacteremia in an Immunocompromised Host with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)." *J Clin Microbiol* 51 (6): 1973-1976.

Pagotto, F., Daley, E., Farber, J., Warburton, D. (2001). "Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples in Compendium of Analytical Methods, Vol 2. HPB method-MFHPB-30."

Pan, Y., F. Breidt, Jr. and S. Kathariou (2006). "Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment." *Appl Environ Microbiol* 72 (12): 7711-7717.

Price, M. N., P. S. Dehal and A. P. Arkin (2010). "FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments." *PLoS One* 5 (3): e9490.

Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F. O. Glöckner (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." *Nucleic Acids Res* 41 (D1): D590-D596.

Rideout, J. R., Y. He, J. A. Navas-Molina, W. A. Walters, L. K. Ursell, S. M. Gibbons, J. Chase, D. McDonald, A. Gonzalez and A. Robbins-Pianka (2014). "Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences." *PeerJ* 2: e545.

Rodríguez-López, P., M. Bernárdez, J. J. Rodríguez-Herrera, Á. S. Comesaña and M. L. Cabo (2019). "Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments." *Food Control* 95: 6-17.

Rognes, T., T. Flouri, B. Nichols, C. Quince and F. Mahé (2016). "VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics." *PeerJ* 4: e2584.

Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." *Genome Res* 13 (11): 2498-2504.

Sofos, J. N. (2008). "Challenges to meat safety in the 21st century." *Meat Sci* 78 (1-2): 3-13.

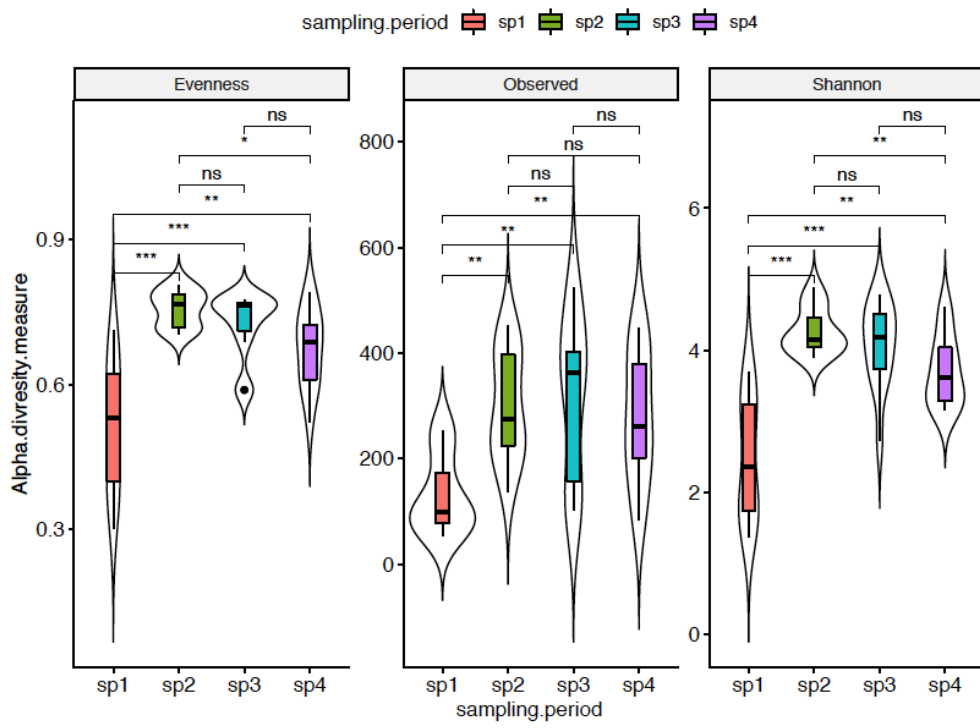
Yang, L., Y. Liu, H. Wu, N. Høiby, S. Molin and Z. j. Song (2011). "Current understanding of multi-species biofilms." *Int J Oral Sci* 3 (2): 74.

Zhao, T., T. C. Podtburg, P. Zhao, D. Chen, D. A. Baker, B. Cords and M. P. Doyle (2013). "Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant." *J Food Prot* 76 (4): 601-607.

Zupančič, J., P. K. Raghupathi, K. Houf, M. Burmølle, S. J. Sørensen and N. Gunde-Cimerman (2018). "Synergistic Interactions in Microbial Biofilms Facilitate the Establishment of Opportunistic Pathogenic Fungi in Household Dishwashers." *Front Microbiol* 9.

List of figures

a)



b)

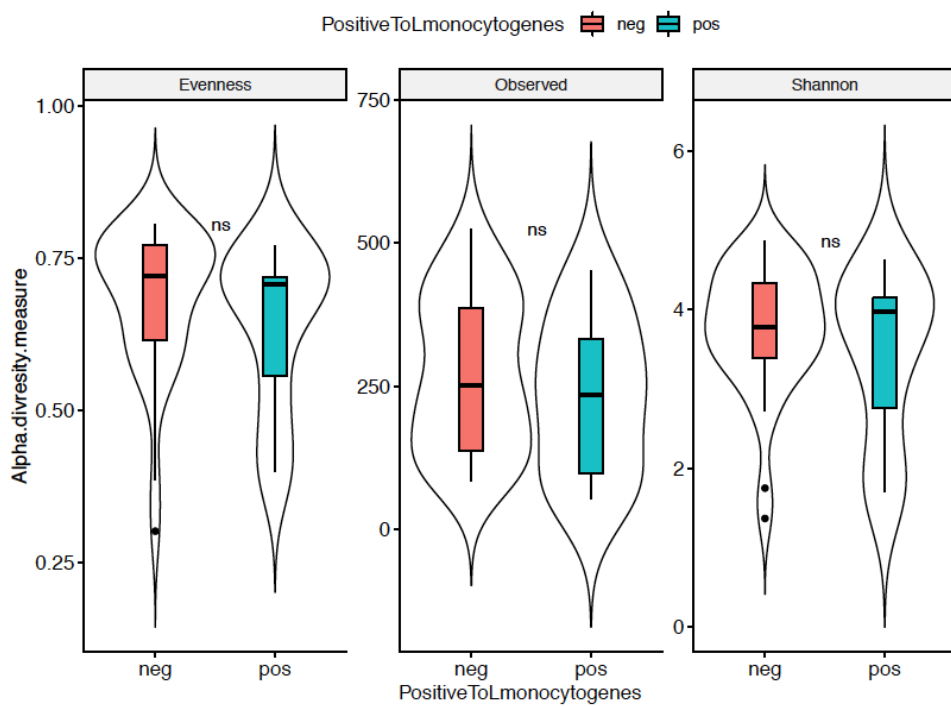
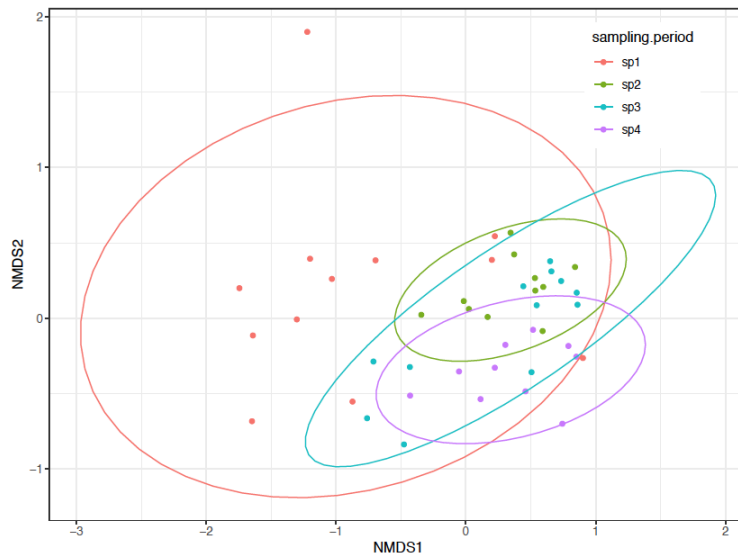
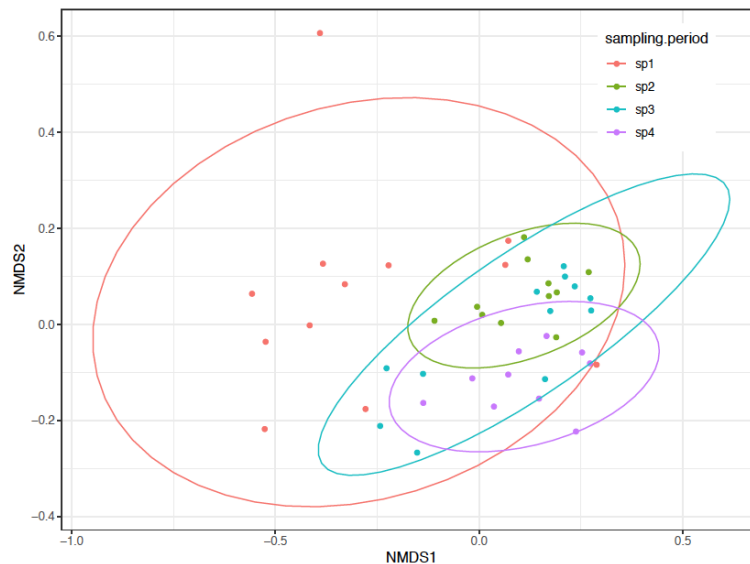


Figure 35 : Violin box plot representation of alpha diversity of bacterial community from cutting facility conveyor-surface. a) Diversity was measured by Shannon index and its evenness according to the sampling periods. b) Diversity was measured by Shannon index and its evenness according to positive samples to *Listeria monocytogenes*. For sampling period category, significance: p-values: *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$. For PositiveToLmonocytogenes category, Wilcoxon test was used to compare means. Significance: p -not significant (n.s) when: $p > 0.05$.**

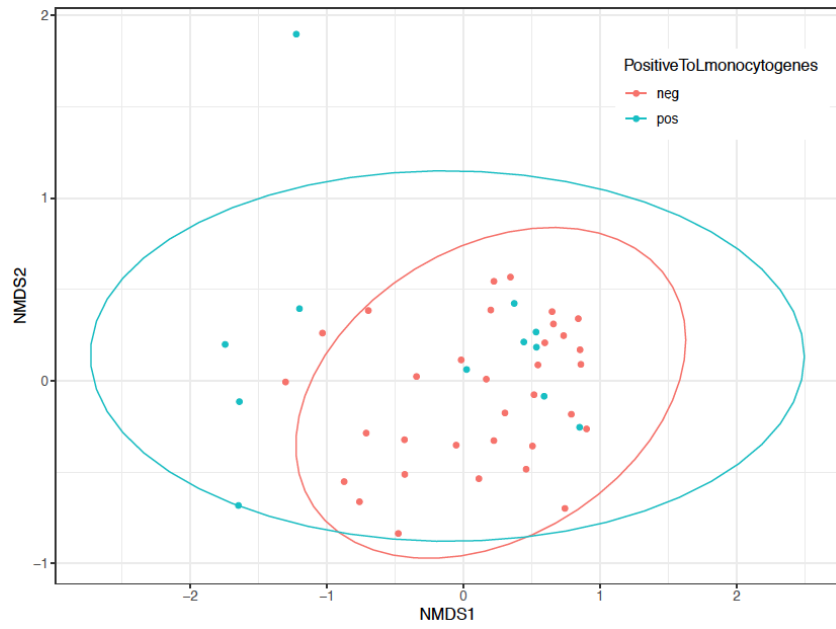
a)



b)



c)



d)

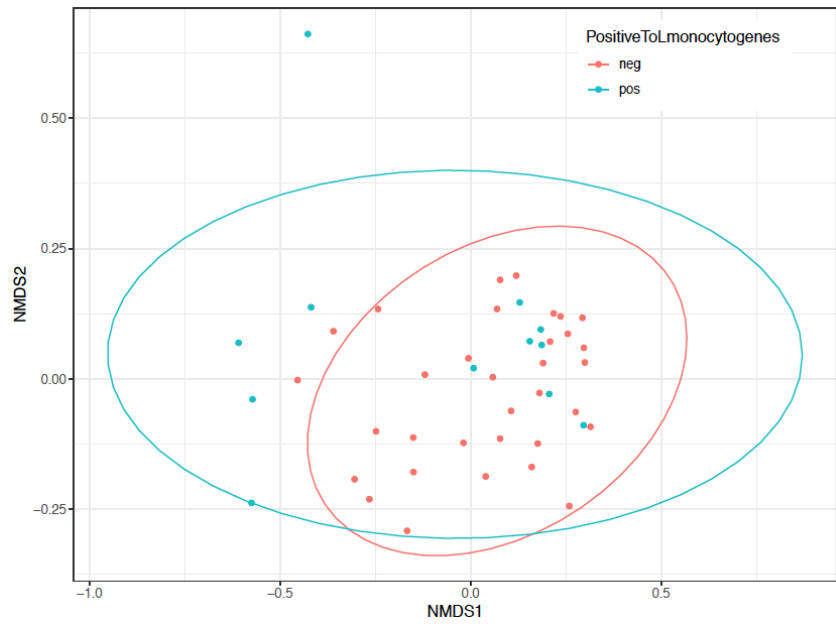
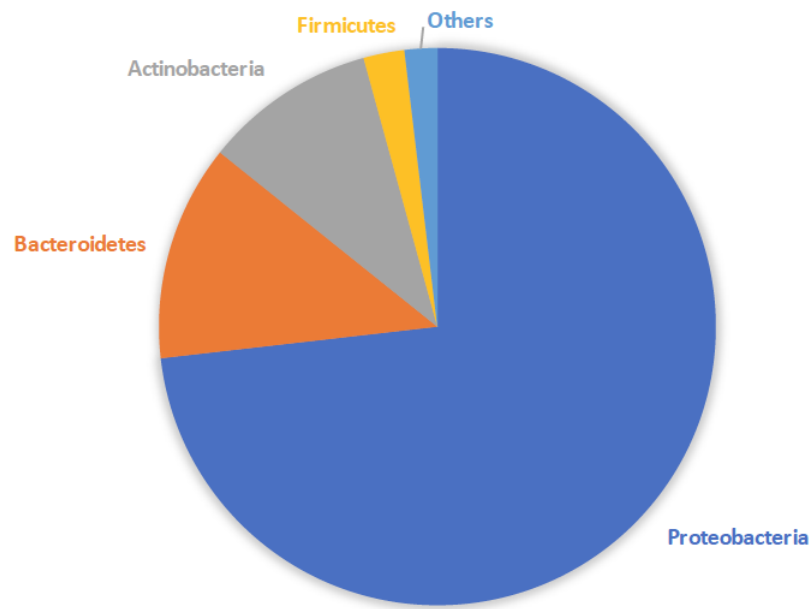
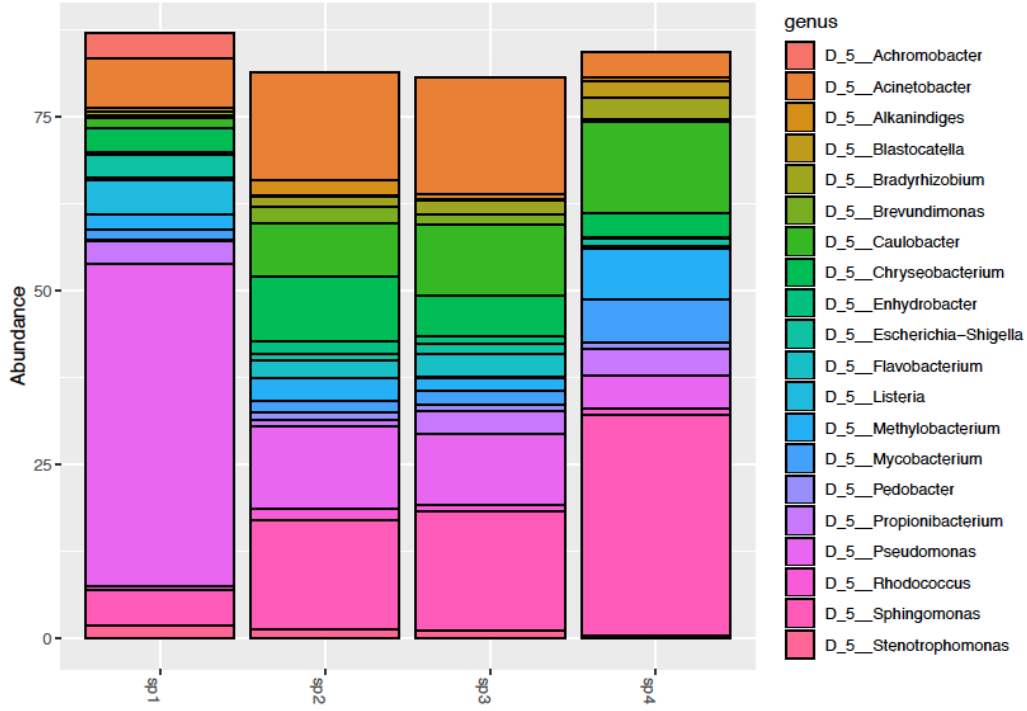


Figure 36 : Non-metric multidimensional scaling (NMDS) of Bray-Curtis and Jaccard distances of bacteria community identified using 16s Miseq sequencing technology on samples isolated from cutting facility conveyor-surfaces according to sampling period (a and b) and samples positive to *Listeria monocytogenes* in culture-based method (c and d). For sampling.period category, pairwise permanova with 999 permutations (using pseudo-F ratios) was used to compare between sampling periods. For PositiveToLmonocytogenes category, analysis of variance was performed using distance matrices of beta diversities indices (Bray-Curtis and Jaccard).

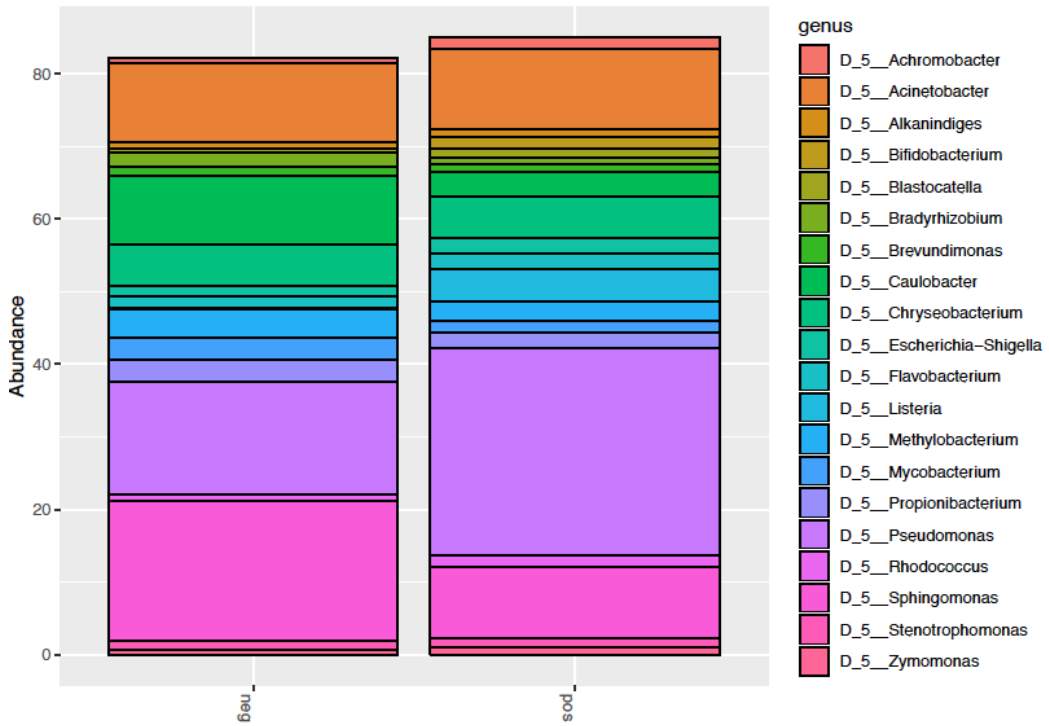
a)



b)



c)



b)

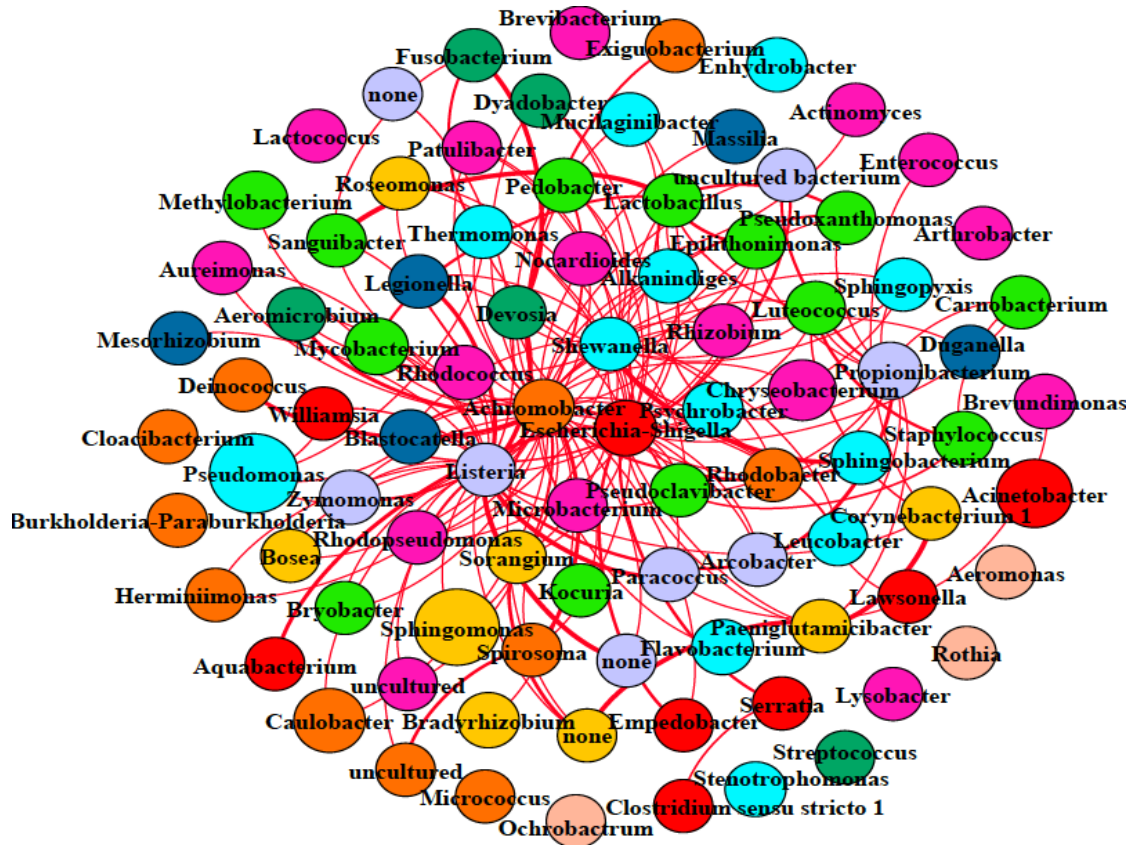
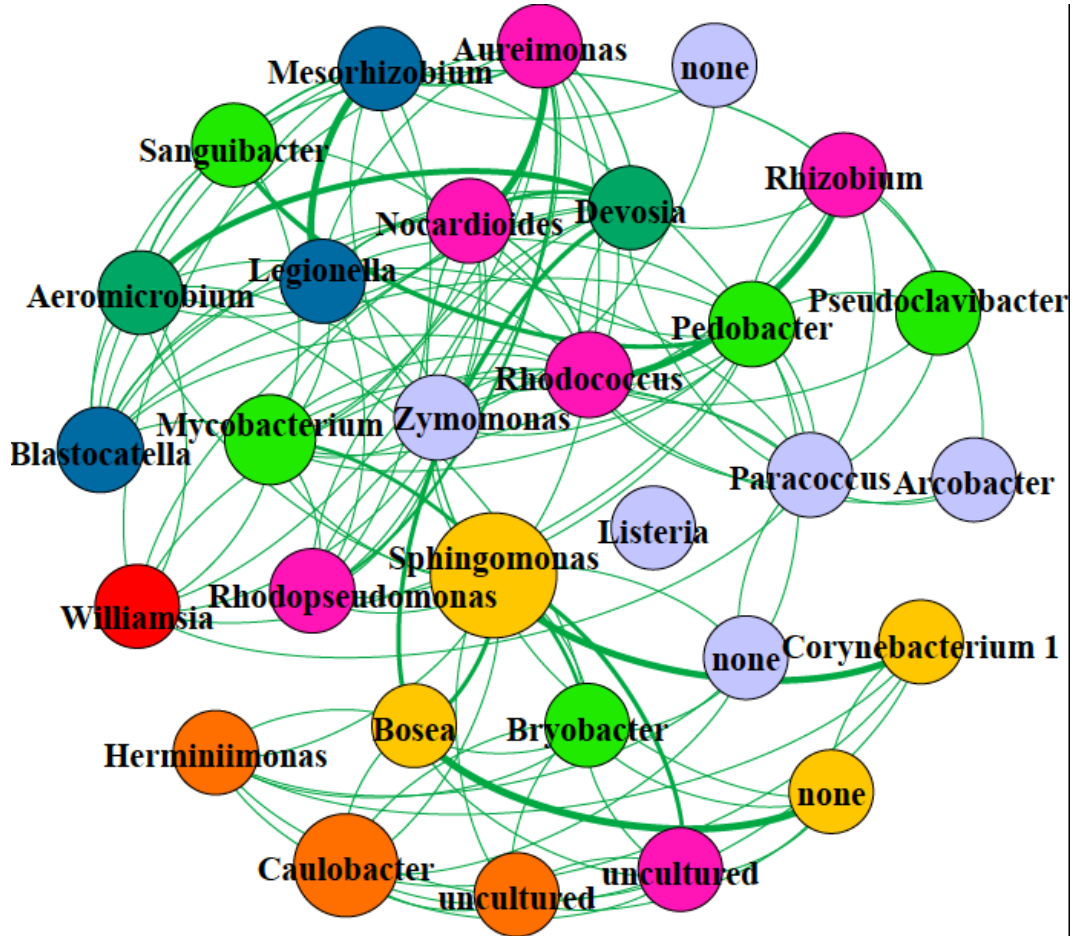


Figure 38 : Network construction based on spearman, Pearson correlations and Bray-Curtis, Kulback-Liebler dissimilarities and mutual information of bacterial community at genus level. a) General network of all positive interactions (co-presence) between communities, clustered according to modularity class (communities sharing most links between each other), the size of each node referred to the number of degrees (links). b) Negative interaction (mutual exclusion) of all bacterial communities.

a)



b)

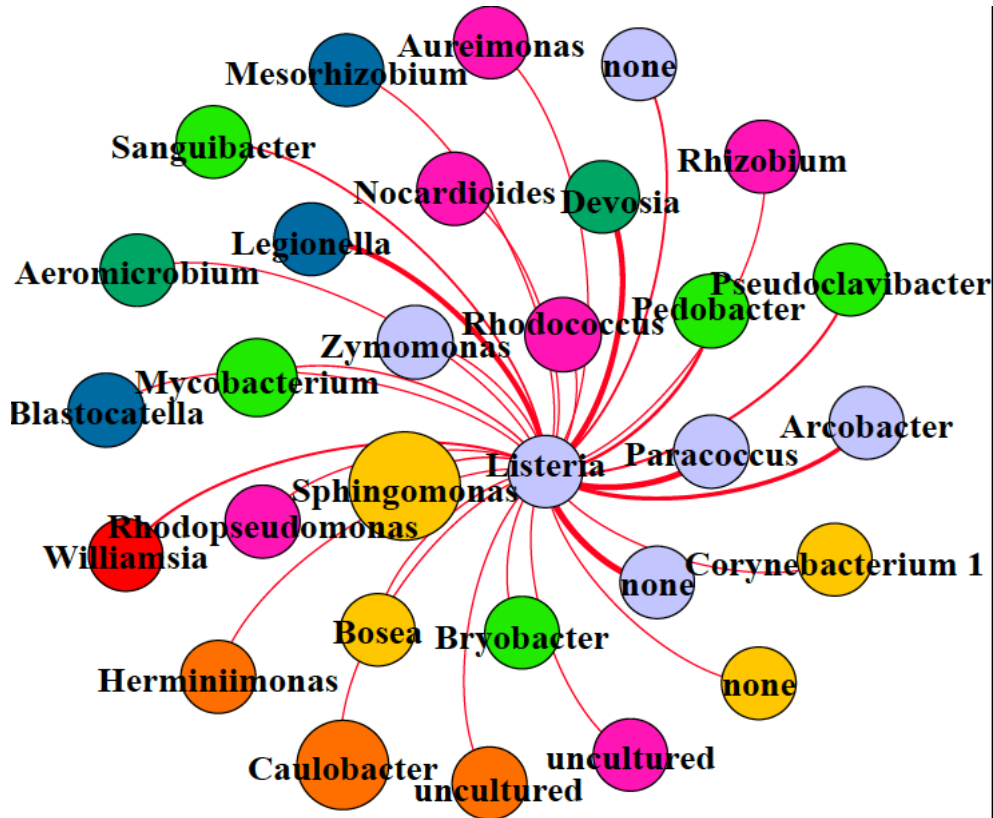


Figure 39 : Network representation of interaction between *Listeria* genus and other bacterial communities identified from meat conveyor surfaces. a) Positive interaction of bacterial communities in *Listeria* genus network. b) Negative interaction between *Listeria* genus and other bacteria. The size of nodes refers to the relative abundance of the genus. Node color refer to the module (community) to which bacteria belong.

IV. Discussion Générale

IV.1 Distribution et diversité des souches de *Listeria monocytogenes* dans les abattoirs

IV.1.1 Profil de contamination des abattoirs et usines de découpe par *Listeria monocytogenes*

Bien que des études sur la présence et la distribution de *L. monocytogenes* dans les abattoirs de porcs aient déjà été réalisées dans d'autres pays, elles sont limitées en nombre et décrivent essentiellement la situation en Europe (Rørvik, Caugant et al. 1995, Giovannacci, Ragimbeau et al. 1999, Lopez, Villatoro et al. 2008, Ortiz, Lopez et al. 2010, Meloni, Piras et al. 2013). Il n'y a en effet pas eu d'étude approfondie décrivant la présence de ce pathogène à l'étape de la production des matières premières et de l'environnement des industries de transformation primaire en Amérique du Nord et particulièrement au Canada. Toutefois, à travers ces études européennes, des risques de contamination environnementale des carcasses et des produits par *L. monocytogenes* ont pu être mis en évidence (Nesbakken, Kapperud et al. 1996, Lopez, Villatoro et al. 2008).

Une première étude, réalisée au Québec, mais dans un seul abattoir, a montré qu'il y avait une diversité de souches de *L. monocytogenes* avec la présence de profils PFGE majeurs, mais différents entre les secteurs de l'abattage et des salles de découpe (Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014). De la même façon, Giovannacci, Ragimbeau et al. (1999) ont observé un pulsotype majeur malgré une diversité importante de souches. Dans une autre étude menée sur des carcasses de porcs, la viande transformée et l'environnement, on a montré que des pulsotypes prédominants étaient présents dans l'environnement et les pièces de viande, suggérant une contamination environnementale de ces dernières (Lopez, Villatoro et al. 2008).

Notre étude s'est étalée sur quinze mois dans le but de suivre l'évolution de la contamination environnementale, la diversité et de la persistance de *L. monocytogenes* dans quatre abattoirs au courant de quatre visites pour chaque abattoir. Nous avons observé que la

fréquence de détection de *L. monocytogenes* dans les abattoirs étudiés est semblable à celle déjà observée dans d'autres études (Giovannacci, Ragimbeau et al. 1999, Autio, Säteri et al. 2000, Ortiz, López et al. 2010). Ceci qui pourrait être dû aux procédures d'abattage du porc ainsi que celles du nettoyage et de désinfection qui sont néanmoins similaires. Il est intéressant de souligner que dans une précédente étude menée dans des abattoirs de porcs et dans une autre réalisée dans des usines de produits de la pêche, les niveaux de contamination de *L. monocytogenes* avant la désinfection étaient très élevés, variant entre 23 % (Meloni, Piras et al. 2013) et 67 % d'échantillons positifs (Wulff, Gram et al. 2006) respectivement alors qu'après nettoyage et désinfection le taux de contamination est réduit à seulement à 57 % dans le cas des usines des produits de la pêche, soulignant l'inefficacité des procédures de nettoyage et désinfection (Wulff, Gram et al. 2006).

Dans notre étude, lorsque les taux de contamination ont été comparés entre abattoirs, il apparaît qu'ils étaient similaires excepté pour un abattoir qui était beaucoup plus contaminés (article I). Ce qui est pertinent à souligner dans cet abattoir, c'est que selon nos observations, les conditions d'hygiène présentaient des lacunes pour les différentes sections de l'usine, incluant les salles de découpe qui restent le secteur le plus sensible à la contamination par *L. monocytogenes* selon notre étude (article I).

Nos résultats ont montré que, généralement, la présence résiduelle (i.e après nettoyage et désinfection) de *L. monocytogenes* était la plus élevée pour les salles d'habillage-éviscération, réfrigération et de découpe. Un tel résultat est cohérent avec les propriétés psychrophiles de *L. monocytogenes* et peut s'expliquer également par le fait que la bactérie apparaît comme faiblement compétitrice dans un contexte de contamination résiduelle par d'autres bactéries (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017). Alors, les conditions présentes dans ces salles, avec des températures entre 4 et 7 °C et une flore bactérienne réduite, peuvent favoriser la croissance ou pour le moins sa présence. Une étude autre suggérait que la contamination par *L. monocytogenes* augmentait en allant vers l'aval des étapes d'abattage pour s'amplifier en réfrigération et en découpe. Les auteurs expliquaient également cette évolution par des successions de contaminations croisées par les équipements et les carcasses (Nesbakken, Kapperud et al. 1996).

IV.1.2 Diversité des souches le long du processus d'abattage et de découpe

Ce projet de thèse rapporte pour la première fois des résultats visant à décrire non seulement la diversité des souches résiduelles dans l'environnement des abattoirs et usines de découpe de porc, mais aussi à étudier l'évolution de cette diversité le long du processus d'abattage et de découpe des viandes. Le but était de mesurer si le processus d'abattage affecte la diversité des souches de *L. monocytogenes* présentes sur les surfaces des usines. Nous nous basions sur une étude préliminaire dans laquelle la diversité des pulsotypes avait tendance à diminuer au cours du processus d'abattage et de découpe de la viande de porcs (Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014). En effet, le long du processus d'abattage-découpe, les conditions environnementales caractéristiques des différentes sections de l'usine changent. C'est le cas de la température, qui n'est pas la même dans les secteurs en amont (attente, abattage) vs. en aval du processus (habillage-éviscération, réfrigération et découpe), qui oscille entre 4 et 7 °C. Les conditions hygiéniques qui y sont appliquées également ne sont pas les mêmes (la préoccupation pour la désinfection n'est pas la même dans le secteur de l'attente que sur les surfaces en contact avec la viande en découpe). De plus, étant donné que *L. monocytogenes* peut être présente dans la flore intestinale des porcs (Fenlon, Wilson et al. 1996, Autio, Säteri et al. 2000), les porcs sur pieds puis les carcasses peuvent représenter une source de diversité de souches entrantes dans le processus. Leur éventuelle sélection en cours de processus, en fonction de l'état de transformation de la carcasse, mérite d'être évaluée, particulièrement si la sélection peut favoriser des éléments liés à la virulence et/ou à la persistance (des souches), déterminants cruciaux en santé publique.

Une grande diversité de souches de *L. monocytogenes* a été décrite dans les industries de viande dans de précédentes études. Cette diversité est généralement établie par la caractérisation des souches par sérotypage, MLST, MVLST ou par PFGE (Chasseignaux, Toquin et al. 2001, Thevenot, Delignette-Muller et al. 2005, Ortiz, López et al. 2010, Lariviere-Gauthier, Letellier et al. 2014, Martin, Perich et al. 2014). Même si la diversité des souches de *L. monocytogenes* dans les abattoirs a été rapportée dans les études citées plus haut, des types particuliers de

souches émergent souvent avec une représentation importante des isolats de l'étude, d'où l'importance d'étudier comment cette diversité évolue le long du processus d'abattage.

L'objectif, dans ce projet de thèse, était de décrire cette diversité de souches au Québec, plus généralement au Canada et plus largement (géographiquement) dans une étude qui comprend quatre abattoirs avec une capacité de production qui oscille entre 18500 porcs par semaine à 37500 porcs par semaine (communication personnelle, industriels) et lors de quatre visites d'échantillonnage différentes (4-5 mois d'intervalle pour chaque visite) pour chaque abattoir. Notre étude a montré une grande diversité de *L. monocytogenes* dans l'environnement des abattoirs (article I) comparée aux études précédentes (Chasseignaux, Toquin et al. 2001, Ortiz, López et al. 2010, Larivière-Gauthier, Letellier et al. 2014). Cette diversité pourrait être liée à la grande taille des usines et donc la diversité de leurs activités. En effet, dans une précédente étude, une plus grande diversité de souches a été observée dans les plus grandes installations d'usines alimentaires (Chasseignaux, Toquin et al. 2001). Notre étude a montré qu'en général, il n'y avait pas de différence significative quant à la diversité entre les abattoirs sauf pour un seul abattoir qui a présenté une très grande diversité par rapport aux autres (article I). Il est intéressant de souligner que les animaux qui arrivent dans cet abattoir en particulier viennent en très grande majorité des fermes extérieures de la province du Québec. En effet, 65 % des animaux abattus dans l'abattoir C viennent de fournisseurs externes alors que les animaux du reste des abattoirs viennent des fermes locales du Québec (communication personnelle par les industriels). Il est donc possible de supposer que la différence de la source d'approvisionnement de l'abattoir C ait conduit à avoir une diversité plus élevée.

Lorsque la diversité des souches a été étudiée entre les étapes du processus d'abattage (*i.e* attente, abattage, habillage-éviscération, réfrigération et découpe), il n'y avait pas de différence significative entre ces étapes. Ces résultats signifient que le processus d'abattage et les conditions présentes dans chaque secteur n'affectent pas la diversité des souches résiduelles de *L. monocytogenes*. Un tel résultat serait lié aux contaminations croisées et/ou à une recontamination de certains secteurs normalement nettoyés et désinfectés quotidiennement, ce qui est le cas pour les étapes post-abattage (habillage-éviscération, réfrigération et la salle de découpe). En effet, les risques liés à la contamination de l'environnement des salles de

réfrigération et de découpe, notamment par les carcasses qui arrivent de l'étape de l'habillage-éviscération, ont été rapportés auparavant (Nesbakken, Kapperud et al. 1996) ce qui aurait pour effet l'apport constant des différentes souches vers ces étapes d'abattage.

Par ailleurs, dans la présente étude, plusieurs des profils PFGE observés n'ont pas été identifiés auparavant dans la base de données du Laboratoire national de microbiologie (LNM), ce qui voudrait dire que ces souches n'ont jamais été isolées ni des aliments ni des cas de listériose humaine. Plusieurs explications peuvent être avancées, telle qu'une introduction récente dans les usines d'abattage et de découpe ou l'acquisition de nouveaux éléments génétiques mobiles, ce qui conduirait à de nouveaux profils. Ceci est d'autant plus possible que quelques profils identifiés dans cette étude ont un pourcentage de similarité très proche de quelques nouveaux profils tel que montré dans la figure 1 de l'article I. Finalement, la possibilité que ces souches ne se retrouvent jamais ou rarement sur les matières premières, lesquelles restent le vecteur le plus probable pour contaminer les produits finis dans les industries de transformation, reste présente puisqu'il est généralement accepté que la majorité des listérioses, 99% de celles-ci est causée par la contamination des aliments (Scallan, Hoekstra et al. 2011). L'hypothèse qui soutiendrait cette dernière possibilité serait que des souches de production animale, adaptées à un environnement d'élevage, puissent entrer à l'abattoir, mais ne s'y établissent pas de façon à contaminer les matières premières. Cependant, il est important d'étudier plus en profondeur ces nouveaux profils afin de vérifier s'ils sont déjà observés dans d'autres régions du monde. Par exemple, le séquençage de ces profils permettrait de mieux les comparer aux autres souches disponibles dans d'autres bases de données afin de valider ces hypothèses.

Quand la distribution des différents profils de *L. monocytogenes* à travers les quatre abattoirs a été étudiée. Il est intéressant de noter que certains profils étaient largement distribués puisqu'ils ont été détectés dans tous les abattoirs et/ou les salles de découpe (article I). Il est difficile de proposer de manière probante qu'elle est la source de ces profils, présents à travers les différentes régions éloignées du Québec où se trouvent les abattoirs. Toutefois, une hypothèse comme la présence des mêmes fournisseurs d'animaux qui approvisionnent les différents abattoirs est possible. Ceci suggère que la source de contamination pourrait être soit

l'environnement de la ferme ou les animaux. Il a d'ailleurs déjà été rapporté en Europe que la ferme est une source de contamination significative pour les abattoirs (Hellström, Laukkanen et al. 2010).

Finalement, l'étude de la diversité des souches de *L. monocytogenes* dans les abattoirs de porcs a permis d'identifier des profils correspondant à ceux de souches isolées de produits rappelés lors des procédures de surveillance et/ou des cas de listériose humaine (article I). Plus important encore, une étude a montré que les souches de l'un de ces profils, LS1, sont responsables de la majorité des épidémies de listériose humaine au Canada (Knabel, Reimer et al. 2012). Il est donc probable que la présence de ce profil en amont de la production indique une large distribution à travers le pays tel qu'il a été supposé plus haut.

Pour conclure, l'étude de la diversité des souches de *L. monocytogenes* dans les abattoirs et usines de découpe de porcs a révélé une grande diversité de souches appartenant majoritairement aux lignées II et I. Ce travail a montré que des profils nouveaux, non identifiés auparavant dans les aliments ou les cas de listériose humaine au Canada sont présents dans les abattoirs. Enfin, l'identification de profils génétiques correspondant à ceux isolés d'aliments et de cas de listériose humaine indique l'importance d'approfondir l'étude et le suivi de ces souches par rapport à leur potentiel de virulence.

IV.2 Persistance des souches de *Listeria monocytogenes*

La persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement des usines agroalimentaires est un phénomène bien connu. Plusieurs études ont montré que, malgré le nettoyage et la désinfection réalisés quotidiennement dans ces usines, certaines souches de *L. monocytogenes* pouvaient y être retrouvées plusieurs mois, voire plusieurs années (Orsi, Borowsky et al. 2008, Ortiz, López et al. 2010, Stasiewicz, Oliver et al. 2015) après leur premier isolement. Cependant, la définition d'une souche persistante est encore équivoque, car il est parfois difficile de distinguer une souche persistante d'une souche récurrente. La récurrence d'une souche est considérée comme le résultat d'une contamination répétée de l'environnement par une même source, par exemple des animaux qui entrent périodiquement à l'abattoir. La persistance est, quant à elle, reliée au

caractère résident d'une souche (Ferreira, Wiedmann et al. 2014) et implique un certain niveau de colonisation de l'environnement. De plus, les paramètres que les chercheurs retiennent pour attribuer à une souche le caractère de persistance varient selon les études. Ainsi, l'intervalle de temps entre chaque isolement de la même souche et la méthode utilisée pour caractériser la persistance de la souche sont encore sujet à discussion (Carpentier and Cerf 2011). Il n'y a donc pas de définition unique qui fasse consensus. Ceci a pour conséquence une certaine ambiguïté dans l'expression des résultats proposés par quelques études précédentes, comme décrit dans la revue de Ferreira, Wiedmann et al. (2014) sur le sujet. Au moment d'amorcer cette étude, il n'y avait pas beaucoup d'informations sur les paramètres permettant de bien caractériser les souches persistantes de *L. monocytogenes*. Le préalable à cette caractérisation est de vérifier que l'on a affaire à deux souches identiques (ce que l'on traduisait par PFGE par profils non différenciables). Les derniers développements de l'identification bactérienne (WGS et analyse du core génome par cgMLST ou wgMLST (Moura, Criscuolo et al. 2016, Petkau 2017) où les mutations ponctuelles sur le génome des souches de *L. monocytogenes*, permettent de confirmer que les souches sont les mêmes, mais aussi, dans des contextes à plus long terme, de décrire l'évolution de la population clonale dans l'environnement des abattoirs (Stoller, Stevens et al. 2019). Les résultats de l'article II confirment que ces méthodes permettent d'avoir une meilleure discrimination que le PFGE, qui reste néanmoins actuellement, la méthode de référence pour cette bactérie. Leur application dans l'identification des souches présumées persistantes dans les industries agroalimentaires permettra de mieux suivre l'évolution de la contamination de l'environnement et/ou des aliments tout en caractérisant ces isolats non seulement pour des propriétés propres à la persistance (biofilm et résistance aux antimicrobiens de désinfection), mais aussi bien au-delà, dans une perspective directement reliée à la santé publique, la virulence et l'antibiorésistance.

IV.2.1 Dynamique des souches persistantes dans l'environnement de la production primaire

Si le phénomène de persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries agroalimentaires est bien documenté, il n'en demeure pas moins qu'il n'existe

pratiquement pas, encore aujourd'hui, au Canada, d'information quant à la prévalence et la circulation de ces souches le long du processus d'abattage jusqu'à la transformation primaire (usines de découpe). Il est toutefois assez bien connu que ces souches persistantes sont le plus souvent isolées à partir de l'environnement et des équipements de ces industries plus que des produits (Miettinen, Siitonen et al. 1999, Senczek, Stephan et al. 2000, Vogel, Jørgensen et al. 2001, Lunden, Autio et al. 2003).

Dans la présente étude, sur les 58 profils PFGE identifiés, 8 ont été associés à des souches persistantes (article I). Ces souches ont été considérées persistantes selon les critères décrits précédemment (Keto-Timonen, Tolvanen et al. 2007, Ortiz, López et al. 2010) i.e ces souches, avec un profil PFGE identique, ont été isolées au moins 3 fois dans un même abattoir durant quinze mois.

La prévalence de ces pulsotypes persistants a été étudiée, dans les différents abattoirs et les différents secteurs, depuis l'abattage jusqu'à l'étape de la découpe. Cette étude a démontré qu'au niveau des abattoirs, la fréquence des souches persistantes ne changent pas significativement sauf pour un abattoir qui correspond à celui ayant le taux de contamination et de diversité de souches les plus élevés (article I).

Au niveau des secteurs, les souches persistantes étaient significativement plus présentes à la fin du processus et, tout particulièrement, aux étapes de découpe par rapport au début de production (attente et abattage; article I). Un tel résultat implique que pour les secteurs post-abattage jusqu'à la découpe des viandes, les conditions environnementales (liées à l'hygiène et à la température) favoriseraient la croissance mais aussi la persistance de *L. monocytogenes*. En effet, la fréquence d'application et les produits utilisés pour les procédures de nettoyage et de désinfection sont les mêmes dans ces secteurs et sont souvent à base d'ammonium quaternaire (QAC). La mauvaise utilisation de ces QACs peut conduire au développement de la résistance (Buffet-Bataillon, Tattevin et al. 2012). Il serait donc possible que la présence de concentrations sous-léthales de QACs, liée à un effet de dilution créé lors de l'étape du rinçage (Martinez-Suárez et al., 2016; Ortiz et al., 2016; Moretro et al., 2017), conduirait à la résistance et donc à la survie et la persistance des souches de *L. monocytogenes* dans ces secteurs.

Ensemble, ces facteurs pourraient être à l'origine d'une sélection favorable de souches de *L. monocytogenes*, sélection renforcée éventuellement par la présence de conditions protectrices (équipements ou zones fissurées et difficiles d'accès pour le nettoyage et la désinfection (Carpentier and Cerf 2011), le tout contribuant à leur persistance. Ainsi, le développement d'une résistance ou d'une tolérance aux désinfectants constituent manifestement deux caractères à considérer pour la définition de la persistance.

Le constat établi dans cette étude (article I) prend alors toute son importance quant aux risques liés à la contamination des produits, particulièrement pour la découpe où justement la prévalence des souches persistantes était la plus élevée (article I). En effet, le fait d'avoir des conditions qui soient favorables à la sélection de *L. monocytogenes* plus adaptées à l'environnement des usines et, finalement favorables à la persistance de certaines de ces souches, devient un paramètre important à considérer dans une perspective de santé publique.

IV.2.2 Portion des souches persistantes en abattoir-découpe de porc parmi les souches isolées des aliments et des cas de listériose humaine.

Si les souches persistantes sont plus présentes en fin du processus d'abattage, la possibilité que des souches possédant les mêmes profils PFGE soient également surreprésentées dans les étapes suivantes de la production voire de la consommation peut être évoquée. En effet, les conditions présentes dans les usines de découpe, où les souches persistantes sont le plus présentes (article I), sont semblables à celles retrouvées dans les industries de transformation. Il est donc envisageable que de telles souches (ayant le même profil PFGE et des caractéristiques de souches persistantes) soient soumises aux mêmes conditions environnementales que celles de notre étude et persistent plus loin dans la chaîne alimentaire, éventuellement jusqu'au consommateurs. C'est pourquoi nous avons voulu vérifier (article I) une possible surreprésentation des génotypes persistants tels que caractérisés lors de notre étude, parmi ceux isolés d'aliments (lors de la mise en œuvre de programmes de surveillance ou de rappels de produits), mais également parmi les isolats provenant de cas de listériose humaine survenus dans

la province du Québec. Il s'agissait donc de comparer les profils PFGE des souches de notre étude avec ceux des populations de souches issues d'aliments et de cas de listériose humaine.

Selon les résultats obtenus, il apparaît que les profils des souches persistantes identifiées dans notre étude seraient assez fréquents au Québec. En effet, notre étude a montré une association significative entre la persistance de 3 profils PFGE (LS1, LS2 et LS4) et l'observation de tels profils au sein des souches isolées des aliments et des cas de listériose humaine sur une période de seize ans allant de 2000 à 2016 (article I). Des éléments tels que la fréquence des souches persistantes dans l'environnement des abattoirs, mais, plus important encore, la fréquence dans les cas cliniques des profils LS2, LS4 au Québec (communication personnelle, LSPQ) et LS1 au Canada (Knabel, Reimer et al. 2012) laisserait penser que ces profils seraient très répandus dans l'environnement. Il est cependant nécessaire de vérifier de tels hypothèses avec une étude plus élargie dans les différents secteurs agroalimentaires et également comparer la fréquence de ces profils avec celle des autres profils isolés dans les cas cliniques.

Par ailleurs, tel que mentionné plus haut, il est important de souligner que le profil LS1, qui correspond au profil des souches responsables de la majorité des cas d'épidémies de listériose depuis deux décennies (Knabel, Reimer et al. 2012), est également trouvé chez des souches considérées comme persistantes dans notre étude : le profil LS1 a été isolé lors de toutes les visites d'échantillonnage dans un abattoir, pendant une durée de quinze mois (article I).

À la lumière de nos résultats, il apparaît important de considérer la contamination environnementale des abattoirs, et plus particulièrement des usines de découpe dans la compréhension de la diffusion de *L. monocytogenes* le long de la chaîne alimentaire. Les caractéristiques de cette contamination, que nous mettons en avant ici de façon originale en Amérique du nord sont : la grande diversité de souches présente dans ces usines, mais aussi la capacité de certaines d'entre-elles à s'établir sur des périodes prolongées et dont les souches possédant le même profil génétique ont tendance à être surreprésentées dans les collections de souches des surveillances alimentaires et humaines au Québec. Tout ceci doit permettre de reconsidérer l'importance du pathogène au-delà de sa présence dans le secteur du prêt à manger,

qui reste le seul secteur actuellement couvert par une réglementation stricte (Farber, Kozak et al. 2011).

Mais le regard porté ici à la production porcine devrait être élargi à d'autres filières de production susceptibles elles aussi d'introduire des isolats persistants dans les usines de transformation des aliments. La présence de *L. monocytogenes* dans d'autres filières d'importance au Canada (saumon, bovins, volaille et production laitière) et les caractéristiques des souches qui en sont issues restent à être mieux établis. En effet, en France, une étude a montré que l'apport d'autres filières alimentaires en *L. monocytogenes* n'est pas négligeable (Henri, Félix et al. 2016).

IV.3 Mécanismes de persistance de *Listeria monocytogenes*

IV.3.1 Formation de biofilm

IV.3.1.1 Effet des conditions de laboratoire sur la formation du biofilm de *Listeria monocytogenes*

L'étude du biofilm au laboratoire requiert la mise en œuvre de certaines conditions environnementales de base (telles que la température et la composition du milieu de culture), mais aussi de conditions spécifiques à la méthode choisie pour former le biofilm. Ainsi, la littérature décrit deux principales méthodes que les chercheurs utilisent pour produire le biofilm de *L. monocytogenes* (ou d'autres espèces bactériennes) : une méthode basée sur des conditions statiques et une méthode basée sur des conditions dynamiques. La grande différence de principe entre ces deux approches concerne l'apport des nutriments et l'élimination des déchets métaboliques de la culture qui ne peuvent être réalisés en continu qu'en conditions dynamiques. Par ailleurs, dépendamment de l'intensité du flux d'apport de milieu en conditions dynamiques, il est possible de reproduire des conditions de stress (forces de déchirement) pour biofilm produit afin de mimer les conditions rencontrées dans les industries (Buckingham-Meyer, Goeres et al. 2007).

La plupart des études menées sur le biofilm de *L. monocytogenes* ont été réalisées dans des conditions statiques (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Borucki, Peppin et al. 2003, Marsh, Luo et al. 2003, Monk, Cook et al. 2004, Di Bonaventura, Piccolomini et al. 2008). L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple à utiliser et ne nécessite pas beaucoup de matériels et de réactifs. Cependant, des divergences dans les résultats obtenus dans différentes études ont été soulignées, que ce soit la biomasse du biofilm produit (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Takahashi, Miya et al. 2009), ou l'organisation et l'architecture du biofilm (Marsh, Luo et al. 2003, Monk, Cook et al. 2004, Rieu, Briandet et al. 2008, Renier, Chagnot et al. 2014, Guilbaud, Piveteau et al. 2015). Ces divergences seraient dues en partie aux limites de la méthode utilisée, reconnue aujourd'hui pour son manque de reproductibilité entre laboratoires (Azevedo, Briandet et al. 2017).

Récemment, une nouvelle méthode de formation du biofilm sous des conditions microfluidiques a vu le jour. Elle est basée sur un environnement microscopique, ce qui permet un meilleur contrôle des conditions entourant le biofilm et, donc, améliorerait la reproductibilité (Meyer, Roy et al. 2011). Le choix de la méthode pour étudier le biofilm est d'autant plus important quand il s'agit de comprendre des mécanismes liés à sa production, comme l'expression génique, l'organisation cellulaire au sein du biofilm ou le rôle de certaines composantes extracellulaires dans sa structuration.

Ainsi, dans ce projet, l'un des premiers buts était de développer un protocole optimal pour l'étude du biofilm de *L. monocytogenes* en utilisant le système micro-fluidique. L'article II de cette thèse décrit les différents paramètres et conditions utilisés pour mettre en place le protocole. Cette étude a démontré que le système micro-fluidique est adapté pour l'étude du biofilm de *L. monocytogenes* sous réserve de respecter les paramètres suivants : la pression, la concentration de l'inoculum et la température (article II).

L'utilisation de ce système permet de suivre en temps réel l'évolution du biofilm de *L. monocytogenes* et d'étudier de manière plus précise l'importance de certaines composantes du biofilm dans son organisation ou d'observer l'effet de molécules anti-biofilm tout au long de leur action.

IV.3.1.2 Effet des conditions de limitation en nutriments sur l'organisation du biofilm de *Listeria monocytogenes*

Le biofilm de *L. monocytogenes*, comme le biofilm d'autres espèces bactériennes, est caractérisé par son architecture (ou sa structure) et sa composition. La structure du biofilm est importante dans ce mode de vie de la bactérie, car elle intervient dans la stabilité même du biofilm et dans la facilité de circulation des nutriments en son sein. L'organisation en biofilm a un rôle reconnu dans la protection de la population bactérienne contre des conditions difficiles de l'environnement qui l'entourent; ceci comprend l'utilisation régulière d'agent bactéricide, comme ce peut être le cas sur des surfaces en contact avec les aliments dans les usines de transformation des viandes.

Tel que rapporté dans la revue de littérature, le biofilm peut être influencé par certaines conditions comme la température (Di Bonaventura, Piccolomini et al. 2008) et la composition du milieu de culture (Combrouse, Sadovskaya et al. 2013). Dans les industries agroalimentaires, les bactéries sont régulièrement soumises à des conditions de limitation en nutriments notamment après le nettoyage et la désinfection. C'est le cas pour les souches de *L. monocytogenes* qui persistent dans cet environnement. De précédentes études se sont intéressées à l'effet de la concentration des nutriments sur le biofilm de *L. monocytogenes*. Les avis semblent diverger car certaines études ont montré que dans des milieux pauvres, *L. monocytogenes* formait un biofilm plus important (Zhou, Feng et al. 2012, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013, Kadam, den Besten et al. 2013) alors que d'autres rapportent que la production de biomasse était plus importante en milieu riche (Stepanovic, Cirkovic et al. 2004, Guilbaud, Piveteau et al. 2015).

Au moment d'amorcer cette thèse, il n'y avait que très peu d'information concernant l'effet de la concentration en nutriments sur l'organisation du biofilm de *L. monocytogenes*. Notre étude a été réalisée en utilisant le système micro-fluidique, ce qui a permis de suivre la croissance du biofilm du début de sa production jusqu'à sa maturation, mais aussi de mieux

contrôler l'apport du milieu et la température. Nos résultats semblent indiquer que le milieu pauvre en nutriments induit la formation d'un biofilm plus dense, tel que démontré lors de certaines études citées précédemment (Zhou, Feng et al. 2012, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013, Kadam, den Besten et al. 2013). Toutefois, ce qui nous semble le plus important à souligner est que la structure et la croissance du biofilm de *L. monocytogenes* dépendent de la concentration en nutriments, même en conditions d'apport continu permises par le système dynamique. En effet, l'observation microscopique de la croissance du biofilm en milieu pauvre (dilution au 1/10 d'un milieu de culture classique) a montré une croissance sous forme de longs filaments pour donner lors de la maturation du biofilm un réseau dense de cellules entre lesquelles des espaces sont ménagés (matériel supplémentaire S1 dans l'article II).

Cette structure a déjà été observée dans une autre étude, là encore seulement dans des conditions dynamiques et dans des milieux de culture dilués (Rieu, Briandet et al. 2008). En effet, en présence de milieux riches, le biofilm de *L. monocytogenes* est seulement formé d'une multicouche cellulaire semblable à ce qui a été observé en conditions statiques.

D'après certaines études portant sur le biofilm de *L. monocytogenes*, des résultats similaires sont rapportés : la formation d'un biofilm avec une biomasse importante dans des conditions de limitation en nutriments (Zhou et al., 2012; Combrouse et al., 2013; Kadam et al., 2013). Ceci serait dû au fait que dans de telles conditions, les bactéries sont soumises à un stress. La mort cellulaire ou la lyse cellulaire est alors induite, ce qui va libérer l'ADN-e qui aura alors un rôle important dans la stabilité de la structure du biofilm des bactéries (Allesen-Holm, Barken et al. 2006, Flemming, Neu et al. 2007, Yang, Barken et al. 2007, Das, Sharma et al. 2010). L'importance de l'ADN-e dans la structuration du biofilm de *L. monocytogenes*, a été mise en évidence dans notre étude (article II). Si son rôle pour le maintien du biofilm de *L. monocytogenes* avait déjà été soulignée dans une précédente étude (Harmsen, Lappann et al. 2010), notre étude a permis de décrire les conditions dans lesquelles le biofilm de *L. monocytogenes* est significativement plus fort, grâce à l'ADN-e. Ceci ouvre la porte à des développements de moyens originaux pour éradiquer le biofilm, en ciblant l'ADN-e.

IV.3.1.3 Capacité des souches à former le biofilm

De nombreuses études ont montré que toutes les souches de *L. monocytogenes* n'ont pas la même capacité à former le biofilm (Harvey, Keenan et al. 2007, Guilbaud, Piveteau et al. 2015). Cette différence de capacité à produire le biofilm a fait l'objet de plusieurs études dans lesquelles les chercheurs ont essayé d'associer la différence de production de biofilm à la phylogénie ou aux conditions environnementales imposées. Ainsi, certaines études ont démontré que les souches de la lignée II, connues pour être très répandues dans l'environnement, formaient un biofilm plus abondant (Norwood and Gilmour 2001, Borucki, Peppin et al. 2003, Harvey, Keenan et al. 2007, Combrouse, Sadovskaya et al. 2013) alors que d'autres suggèrent que ce sont les souches de la lignée I qui formeraient plus de biofilms (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Takahashi, Miya et al. 2009). Ces divergences sont en partie causées une fois de plus par les conditions expérimentales dans lesquelles le biofilm a été produit, ce qui souligne l'importance de considérer ce facteur dans de telles études.

Nos résultats dans l'article II, en ce qui a trait à la comparaison de la biomasse formée dans le biofilm de deux souches de *L. monocytogenes* appartenant aux serotypes 1/2a et 1/2b, donc aux lignées II et I respectivement, n'ont montré aucune différence significative de capacité à former le biofilm. Bien que ce résultat ne soit soutenu que par la seule étude de deux souches, il rejoint une récente étude où les chercheurs ont observé qu'au sein d'une même lignée et sérotype, il y avait des souches qui formaient un important biofilm alors que d'autres étaient classées parmi les plus faibles productrices (Doijad, Barbuddhe et al. 2015). Par ailleurs, des facteurs génétiques peuvent favoriser la formation de biofilm tel qu'il a été rapporté auparavant dans une étude où les souches où l'on retrouvait un ilot génétique favorable à l'adaptation cellulaire (pour Rapid adaptation island (RAI)), formaient plus de biofilms (Verghese, Lok et al. 2011). Cette observation suggère que la différence de capacité de formation du biofilm de *L. monocytogenes* serait une caractéristique souche dépendante. Néanmoins, la relation entre la caractéristique de persistance et celle de former du biofilm pour une souche données méritait d'être explorée.

IV.3.1.4 Lien entre la persistance et la capacité à former le biofilm

Depuis longtemps, de nombreux chercheurs se sont intéressés au phénomène de persistance de certaines souches de *L. monocytogenes* en tentant de la relier à des caractéristiques ou des fonctions précises que la bactérie possède. La formation de biofilm est l'une des caractéristiques qui a été explorée pour expliquer cette persistance. Mais si les premières études réalisées sur la persistance de *L. monocytogenes* et la formation du biofilm remontent à 1994 (Jeong and Frank 1994), la question du lien entre la persistance et la formation de biofilm reste de nos jours encore difficiles à élucider. Bien que certaines études aient rapporté que des souches persistantes de *L. monocytogenes* formaient plus de biofilm, ce qui laisserait supposer que cette caractéristique lui confierait le caractère de persistance (Lunden, Miettinen et al. 2000, Borucki, Peppin et al. 2003, Møretro and Langsrud 2004, Nowak, Cruz et al. 2017), ces résultats ne font pas l'unanimité puisqu'un nombre important d'autres auteurs n'arrivent pas à trouver d'association entre la persistance et la capacité d'une souche persistante à former plus de biofilm (Djordjevic, Wiedmann et al. 2002, Nilsson, Ross et al. 2011, Costa, Bertolotti et al. 2016, Koreňová, ORAVCOVÁ et al. 2016).

Nos résultats, tels que rapportés dans l'article III, ont également montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les capacités moyennes des souches persistantes et les non persistantes à former le biofilm. De plus, l'analyse du génome de ces souches n'a pas pu identifier de facteurs génétiques connus pour favoriser la formation du biofilm dans ces souches. Il est néanmoins généralement admis que la formation du biofilm peut favoriser la persistance de *L. monocytogenes* par la protection qu'il confère contre le nettoyage et la désinfection et d'autres stress environnementaux.

Cependant, étant donné qu'il n'existe pas de facteurs génétiques faciles à identifier pouvant expliquer la persistance, il est difficile d'établir un lien clair entre ces deux phénomènes. Le caractère du biofilm de *L. monocytogenes* à lui seul serait insuffisant, notamment du fait de la complexité de l'environnement dans lequel se trouvent les bactéries en industrie. Par exemple les différentes interactions qui peuvent se produire avec d'autres populations microbiennes au sein d'un biofilm mixte tel qu'il existe sur les surfaces dans les usines (Langsrud, Moen et al.

2016, Ottesen, Ramachandran et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017) ne sont pas considérées dans l'évaluation classique tant au cristal violet (statique), qu'en condition microfluidique.

Pour conclure ce segment, même si la formation du biofilm de *L. monocytogenes* pourrait contribuer à la persistance, la seule capacité de production de biofilm par cette bactérie, ne peut expliquer la caractéristique persistance. Le fait de mettre en place de nouveaux protocoles contrôlant de manière plus précise la formation du biofilm, dans un contexte d'un biofilm mixte, pourrait aider les chercheurs à aboutir à des conclusions plus définitives.

IV.3.2 Résistance aux désinfectants

Tel que mentionné dans le recensement de la littérature, la résistance de *L. monocytogenes* aux désinfectants est bien connue et des gènes en support de cette résistance aux désinfectants sont aussi bien documentés (Romanova, Wolffs et al. 2006, Fox, Leonard et al. 2011, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016, Ortiz, López-Alonso et al. 2016). Plusieurs gènes de résistance aux QACs sont notamment décrits chez *L. monocytogenes* et les plus communs sont le *bcrABC* et *qacH* (Elhanafi, Dutta et al. 2010, Müller, Rychli et al. 2013, Kovacevic, Ziegler et al. 2016).

Des études précédentes ont rapporté des proportions variables (entre 7 à 79% des souches) de résistance aux désinfectants parmi les isolats de *L. monocytogenes* issus d'aliments ou d'industries agroalimentaires (Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016). Cette hétérogénéité suggère que cette résistance pourrait expliquer la persistance de certaines souches de *L. monocytogenes*. Plusieurs études, rapportées dans la revue de Ferreira, Wiedmann et al. (2014), se sont intéressées à un possible lien entre la résistance aux désinfectants et la persistance de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires. Cependant, si quelques-unes ont pu mettre en évidence une association directe entre ces deux phénomènes (Aase, Sundheim et al. 2000, Lunden, Autio et al. 2003, Fox, Leonard et al. 2011, Ortiz, López-Alonso et al. 2016), seule une étude récente a pu appuyer sa conclusion par la démonstration de la présence d'un gène de

résistance aux QACs, déjà décrit chez *L. monocytogenes*, le *qacH* (Ortiz, López-Alonso et al. 2016).

En se basant sur ces données récentes, l'intérêt d'étudier le phénomène de résistance dans le cadre de ce projet de thèse était donc évident : la résistance aux désinfectants peut-elle expliquer, du moins en partie, la persistance des souches de *L. monocytogenes* identifiées dans notre étude. L'objectif de cette portion de l'étude était d'étudier la résistance des souches de *L. monocytogenes* par la recherche de gènes de résistance aux QACs et par la susceptibilité de ces souches envers le QAC le plus utilisé dans les industries agroalimentaires, le Benzalkonium Chloride (BC). Dans l'article III, deux groupes d'isolats présumés persistants et phylogénétiquement différents ont été étudiés en parallèle par séquençage du génome, en comparaison à un groupe de cinq isolats sporadiques, pour la recherche de gènes de résistance aux désinfectants.

Les résultats de cette étude ont démontré la présence d'un gène de résistance au BC, le *bcrABC*, dans un groupe d'isolats persistants, alors qu'il était absent dans les autres groupes de souches comprenant les souches sporadiques pour un groupe et des isolats persistants dans l'autre groupe (article III). La persistance de ces isolats pourrait être donc être expliquée par la résistance au BC, d'autant que cette dernière a été démontrée également phénotypiquement, plus particulièrement par la croissance des souches en présence de concentrations de BC deux à huit fois supérieures à celle empêchant la croissance de souches non persistantes (article III). Bien que ces souches soient considérées résistantes au BC, il est cependant important de noter que tous ces isolats restent sensibles aux concentrations de QAC généralement utilisées dans l'industrie (entre 200 et 1000 ppm). C'est pour cela que certains chercheurs préfèrent parler de tolérance au BC (Kovacevic, Ziegler et al. 2016) ou de faible résistance (Langsrud, Sidhu et al. 2003, Martínez-Suárez, Ortiz et al. 2016). En revanche, il est connu que, de façon générale, plusieurs facteurs peuvent affecter l'efficacité des désinfectants, notamment des effets de dilution et particulièrement au niveau d'interfaces microscopiques (Fox, Leonard et al. 2011). L'attachement aux surfaces pour former des biofilms est également un facteur qui favorise la résistance et le développement de la résistance des souches de *L. monocytogenes* aux désinfectants par un mécanisme équivalent à celui retrouvé dans l'acquisition de la résistance à

certains antibiotiques (Langsrud, Sidhu et al. 2003). Le développement de la résistance aux désinfectants serait donc favorisé par l'exposition des souches à des concentrations sous-létales, lesquelles peuvent être dues à une faible diffusion du désinfectant à travers les biofilms, mais aussi à l'humidité présente sur les surfaces microscopiques (e.g. influence de la rugosité du sol). De plus, un rinçage non efficace peut aussi conduire à la présence de faibles concentrations de désinfectants en contact avec les bactéries résiduelles sur les surfaces traitées, et donc à une plus grande probabilité d'acquisition ou de développement de la résistance.

Enfin, il y a également la possibilité que les QACs s'accumulent dans l'environnement du fait qu'ils ne sont pas biodégradables en conditions aérobies (Tezel and Pavlostathis 2015). Ceci pourrait conduire aussi à l'exposition des bactéries à des gradients de concentrations variables (Jennings, Minbiole et al. 2015).

Dans les résultats présentés dans l'article I, une claire association entre la persistance des souches et la résistance au BC est notée. En effet, il s'est avéré que 75 % des souches persistantes portent un gène de résistance au BC, *bcrABC* ou encore le gène *emrE* alors que les non-persistantes ne les portent que dans 16 % des cas. Cela laisse supposer que, pour les abattoirs étudiés, la persistance de *L. monocytogenes* est principalement reliée à la résistance aux désinfectants. En revanche, il faut noter que d'autres souches persistantes ne présentent pas de résistance génétique et phénotypiques au BC et inversement, des souches non persistantes peuvent présenter une résistance au BC. Ce résultat illustre une fois de plus la complexité du phénomène de persistance chez *L. monocytogenes*.

Il est intéressant de souligner que le gène *emrE*, évoqué dans la résistance au BC, est confiné au sein d'une population de souches appartenant au complexe clonal 8 et n'est retrouvé quasi exclusivement qu'au Canada (Gilmour, Graham et al. 2010, Knabel, Reimer et al. 2012, Kovacevic, Ziegler et al. 2016). Seules deux études en Europe ont pu trouver un tel gène dans d'autres souches (Meier, Guldimann et al. 2017, Painset, Björkman et al. 2019). Dans notre étude, seuls les isolats du pulsotype LS1 portaient le gène *emrE* (article I). Ce gène code pour une pompe à efflux et est présent sur un îlot génétique, le *Listeria* genomic island 1 (LGI1). Le LGI1 a été identifié dans les isolats ayant causé la majorité des cas de listérioses au Canada (Gilmour, Graham et al. 2010) et il est encore difficile d'expliquer l'absence de cet îlot dans

d'autres isolats, qu'ils proviennent de cas cliniques, de l'environnement ou d'aliments. Curieusement, la CMI des isolats portant ce gène est deux fois inférieure à celle des souches portant le gène *bcrABC* (article I).

Globalement, dans notre étude, seuls les gènes *bcrABC* (principalement) et *emrE* (pour le cas de la souches LS1) ont été détectés. De façon similaire, une autre étude récente a détecté seulement le gène *qacH* dans des isolats (Ortiz, López-Alonso et al. 2016) alors que d'autres ont trouvé que l'un des deux gènes est majoritaire au sein des populations de souches de *L. monocytogenes* étudiées (Dutta, Elhanafi et al. 2013, Ebner, Stephan et al. 2015). L'acquisition de ces deux gènes par *L. monocytogenes* résulte de deux mécanismes différents. En effet, le gène *bcrABC* est transporté via deux mécanismes : soit par un élément transposable, *IS1216*, présent sur large plasmide pLM80 ou par une acquisition chromosomique également par transposition (Piercey, Ells et al. 2017). Le gène *qacH* est, quant à lui, transporté par le transposon Tn6188 pour pouvoir s'insérer dans le chromosome (Müller, Rychli et al. 2013).

En résumé, notre étude a relié la résistance de souches de *Listeria monocytogenes* aux QACs par la présence du gène *bcrABC* et établi que ce dernier est un déterminant génétique nécessaire pour la persistance de certaines souches de *L. monocytogenes*. Ceci est en accord avec un résultat semblable lié avec la présence d'un autre support génétique : le transposon tn6188 abritant le gène de résistance *qacH* (Ortiz, López-Alonso et al. 2016).

Bien que la résistance aux désinfectants soit identifiée comme un des déterminants de la persistance, l'explication de l'occurrence de cette dernière ne peut se résumer à ce seul paramètre. D'autres caractéristiques de souches de *L. monocytogenes* telles que la capacité de la formation de biofilm, comme discuté antérieurement, peuvent également expliquer la persistance. Même s'il n'existe à ce jour aucun déterminant génétique qui pourrait expliquer à lui seul la persistance d'une souche par la formation du biofilm, il apparaît tentant d'associer ces deux phénomènes (biofilm et résistance aux antimicrobiens) et des études en ce sens devraient être encouragées.

Néanmoins, il faut garder en tête la possibilité, de façon beaucoup plus pragmatique, tel que suggéré par Carpentier et Cerf (2011) que la persistance de certaines souches de *L. monocytogenes* puisse être aussi liée à la formation de communautés microbiennes, particulièrement dans des endroits difficilement accessibles au nettoyage et à la désinfection. Cette situation, compatible avec une capacité à former le biofilm, est tout à fait concevable dans le cas du deuxième groupe d'isolats persistants de notre étude (article III).

IV.3.3 Interaction avec le microbiote de l'environnement des usines de découpe

Tel que discuté abondamment dans ce projet de thèse, la difficulté d'expliquer le phénomène de persistance de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires tient au fait que plusieurs mécanismes contribuent à son établissement et réside également dans le fait même que ces mécanismes sont vraisemblablement inter-reliés. C'est le cas de la résistance aux désinfectants et la formation de biofilm.

Il est largement accepté par la communauté scientifique que dans un environnement naturel comme celui des industries agroalimentaires, le biofilm bactérien est le plus souvent mixte. En effet, plusieurs espèces bactériennes peuvent se retrouver au sein d'un biofilm pour former une communauté mixte dans laquelle des interactions intra et inter-espèces vont se produire (Moons, Michiels et al. 2009). La survie d'une espèce particulière au sein d'une communauté bactérienne mixte va dépendre de la nature de l'interaction qui existe entre les espèces. Ainsi, des interactions positives entre deux espèces bactériennes conduisent à favoriser leur croissance ou au moins renforcer leur survie, alors que lors d'interactions négatives, il y aura inhibition de la croissance voire élimination de l'espèce la moins compétitive de cette communauté (Moons, Michiels et al. 2009, Elias and Banin 2012).

De précédentes études ont montré que *L. monocytogenes* interagit avec d'autres espèces bactériennes au sein d'un biofilm mixte (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017). En effet, des études de co-culture en biofilm mixte ont montré que la croissance de *L. monocytogenes* serait inhibée par plusieurs espèces bactériennes issues de l'environnement,

telles que *Pseudomonas fragi* (Norwood and Gilmour 2001, Heir, Møretrø et al. 2018) alors que d'autres ont rapporté, au contraire, une interaction en faveur de *L. monocytogenes* en présence de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* et de *Flavobacterium spp* (Bremer, Monk et al. 2001, Puga, SanJose et al. 2014, Fagerlund, Møretrø et al. 2017).

Cependant, la caractérisation plus complète des populations constituant le biofilm se heurte aux écueils classiques de la culture : viabilité et difficulté d'isoler des espèces sous-représentées dans la communauté microbienne. En effet, les études réalisées jusqu'à présent se sont basées sur des co-cultures des genres bactériens les plus dominants, dans des milieux non sélectifs (Fagerlund, Møretrø et al. 2017, Heir, Møretrø et al. 2018). Ceci veut dire que seules les interactions entre *L. monocytogenes* et les bactéries les plus dominantes retrouvées en industries agroalimentaires sont connues. Avec cette seule approche, on comprend que les informations disponibles sur les couples bactéries-*Listeria monocytogenes* qui favoriseraient ou inhiberaient le pathogène, et conduiraient donc respectivement à renforcer sa présence ou à l'exclure des surfaces d'industries agroalimentaires, sont parcellaires. On comprend que les enjeux de ces recherches sont majeurs.

Dans l'article IV de ce projet de thèse, notre intérêt s'est donc porté à identifier les interactions possibles de *Listeria monocytogenes* avec les genres bactériens présents sur des surfaces en industrie des viandes (identifiés par séquençage d'une région de l'ADN codant pour l'ARN 16s). L'étude a été réalisée à partir d'échantillons issus des surfaces de convoyeurs de découpe des viandes, surfaces importantes du fait de leur contact direct avec les produits et de la diversité des pièces découpées qui fournit une diversité de composition microbienne attendue importante pour ces communautés.

Les résultats de cette étude ont montré que la composition de la flore bactérienne des surfaces change en fonction du temps (article IV). Cela pourrait s'expliquer par la variabilité dans l'efficacité du nettoyage et de la désinfection d'une période à une autre, la quantité de matière organique résiduelle disponible pour la croissance bactérienne étant alors variable. De plus, considérant l'hétérogénéité de la flore bactérienne entrante dans l'usine (il existe des différences marquées de composition microbienne de surface entre lots de carcasses), les lots

d'animaux présentant également un microbiote, notamment digestif, avec une forte variabilité interindividuelle, pourraient également expliquer les différences de diversités bactériennes observées entre les périodes d'échantillonnage (Jakobsen, Bahl et al. 2019).

Conséquemment, les interactions existantes au sein de la flore bactérienne résiduelle associée à *L. monocytogenes* seraient changeantes d'une période à une autre. Le premier paramètre de cette variabilité serait la composition même de la communauté microbienne en place sur les surfaces de découpe des viandes au moment de l'échantillonnage. Si la persistance de *L. monocytogenes* dépend des genres bactériens avec lesquels elle cohabite et du type d'interaction qui existe dans la communauté, on peut imaginer qu'il existe un core-microbiote plus constant au sein duquel les interactions seront moins volatiles. Ainsi, si une interaction positive est établie avec des espèces ou genres bactériens connus pour leur caractère résident de l'environnement des industries agroalimentaires, la persistance de *L. monocytogenes* pourrait en être favorisée. C'est le cas des genres *Pseudomonas* et *Sphingomonas*. À la première visite, le genre *Pseudomonas* était le plus abondant de tous et c'est à ce même moment que le genre *Listeria* était aussi le plus abondant. En revanche, dans les trois autres dates, l'abondance de *Pseudomonas* et *Listeria* a drastiquement et parallèlement diminué, contrairement à *Sphingomonas* (article IV). La coïncidence de la forte présence de *Pseudomonas* avec *Listeria* laisserait supposer que les espèces de ce genre, notamment *L. monocytogenes*, cohabitent avec des espèces de *Pseudomonas*. Certaines espèces de ce dernier genre comme *Pseudomonas fluorescens* forment un fort biofilm; il est possible que *L. monocytogenes* forme une niche au sein de ce biofilm. Cette hypothèse est aussi soutenue par le fait que de précédentes études ont montré que l'attachement de *L. monocytogenes* sur une surface où le biofilm de *Pseudomonas fluorescens* est préalablement établi est augmenté significativement (Puga, Dahdouh et al. 2018). De plus, il a été démontré que lorsque le biofilm composé d'une culture mixte de bactéries issues des surfaces de convoyeurs est exposé à des cycles de nettoyage et de désinfection en conditions de laboratoire, une diminution de la croissance des genres bactériens est notée, exceptée pour *P. putida*, *P. fluorescens* et *L. monocytogenes*, qui vont devenir les plus dominants (Fagerlund, Møretrø et al. 2017). De plus, le fait qu'il y ait une faible diversité en présence de *Pseudomonas* serait en faveur non pas de la croissance de *L. monocytogenes*, qui est une faible compétitrice, mais de son maintien au sein du biofilm.

Il est important de noter que les genres bactériens les plus abondants détectés dans cette étude demeurent ceux déjà identifiés dans de précédentes études (Carpentier and Chassaing 2004, Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017, Heir, Møretro et al. 2018). Par ailleurs, il est intéressant de souligner que dans notre étude, la détection de *L. monocytogenes* en bactériologie classique coïncide avec les échantillons présentant une abondance de séquence du genre *Listeria* relativement élevée, ce qui est cohérent avec le fait que *L. monocytogenes* est parmi les espèces sinon l'espèce la plus abondante du genre *Listeria* dans ces environnements. Il a en effet déjà été rapporté que *L. monocytogenes* était parmi les bactéries les plus dominantes retrouvées sur les surfaces de découpe des viandes, à côté de *Pseudomonas* et *Acinetobacter* après nettoyage et désinfection (Fagerlund, Møretro et al. 2017). Fait surprenant, lorsque *Pseudomonas* a été détecté avec une très forte abondance (à la première visite), la diversité de la communauté a été la moins élevée (article IV). Ce résultat peut être lié à la forte compétition qu'imposerait *Pseudomonas*, un résident commun de cet environnement, aux autres espèces bactériennes. Cette compétition pourrait être liée à la disponibilité en nutriments ou à l'encombrement spatial par exemple (habitat). Cette tendance semble être commune chez *Pseudomonas*, car une autre étude a également observé que lorsque *Pseudomonas* était fortement présent dans un échantillon, la présence d'autres genres était très réduite (Fagerlund, Møretro et al. 2017). L'association retrouvée avec *Listeria* serait alors assez spécifique pour justifier de prolonger les études d'interactions.

L'étude de l'interaction des populations bactériennes détectées sur les surfaces de découpe des viandes nettoyées et désinfectées a permis d'identifier les communautés bactériennes les plus susceptibles de cohabiter ou de s'exclure mutuellement (article IV). En effet, l'utilisation de méthodes de corrélations couplées à des méthodes d'analyse des distances, de similarité établit deux types d'interactions entre les différents genres identifiés : une interaction positive (ou une co-présence) et une interaction négative ou une exclusion mutuelle (article IV). Dans le but d'identifier les interactions entre le genre *Listeria* et le reste de la flore bactérienne, un réseau décrivant ces interactions a été construit. Les analyses statistiques ont montré la présence d'interactions négatives entre plusieurs genres bactériens et *Listeria* (article IV). En effet, les genres bactériens tels que *Caulobacter*, *Herminimonas*, *Rodhococcus*,

Sphingomonas interagissent négativement avec *Listeria*. Cela veut dire qu'il existe une compétition entre ces genres et *Listeria*. Cette compétition serait liée à l'occupation d'une niche écologique par exemple dans un contexte d'un biofilm ou une compétition aux nutriments. La faible compétitivité de *L. monocytogenes* a déjà été rapportée auparavant (Langsrud, Moen et al. 2016, Fagerlund, Møretro et al. 2017, Heir, Møretro et al. 2018) ce qui laisse fortement supposer que cette compétition serait en faveur des autres genres bactériens. Ce serait le cas des genres *Sphingomonas* et *paracoccus*, pour lesquels il a déjà été montré que certaines espèces de ces genres produisent une bactériocine, l'astaxhantin (Lee, Kim et al. 2004, Mageswari, Subramanian et al. 2015), qui inhiberait la croissance de *L. monocytogenes* (Mageswari, Subramanian et al. 2015). Dans ce réseau d'interaction, il a été noté aussi que *Pseudomonas* interagit finalement faiblement avec le reste de la flore (article IV) ce qui peut expliquer et confirmer les résultats de diversité tel que rapporté plus haut. Le genre *Pseudomonas*, faiblement engagé dans les interactions avec le reste de la flore et très bien adapté à cet environnement occupe alors rapidement et efficacement la place au détriment de la diversité bactérienne.

Pour conclure, cette dernière portion de l'étude a montré que l'écosystème microbien de l'environnement des industries agroalimentaires est composé de plusieurs genres avec une importante diversité. En effet, la composition de la flore bactérienne peut varier considérablement en fonction du temps, mais certains genres sont considérés comme des résidents tels que *Pseudomonas*. Dans cette étude, on a pu également décrire plusieurs interactions possibles de *Listeria* avec le reste de la flore bactérienne. Ainsi, seules des interactions négatives entre *Listeria* et certains autres genres bactériens, tels que *Sphingomonas*, ont été identifiées. Nos résultats ont également montré qu'une cohabitation entre *Listeria* et *Pseudomonas* est possible, ce qui pourrait favoriser la persistance de *L. monocytogenes* dans cet environnement.

IV.4 Limites de l'étude

Certaines limites sont à souligner quant à ce travail.

La venue de nouvelle méthode de caractérisation des bactéries a permis d'atteindre un niveau de discrimination plus élevé que ce que le PFGE offre encore aujourd'hui. Ainsi, les

méthodes de caractérisation de *L. monocytogenes* basées sur le séquençage de nouvelle génération commencent à être intégrées dans les systèmes de surveillance de *L. monocytogenes* dans les aliments et dans la surveillance de la listériose (Moura, Tourdjman et al. 2017). Dans nos études, nous avons utilisé le PFGE pour caractériser les souches de *L. monocytogenes*. Une plus grande diversité de souches serait accessible dans l'environnement des abattoirs et des usines de découpe avec ces méthodes de séquençage plus performantes pour l'identification pour l'identification des souches.

Par ailleurs, dans ce projet de thèse, la sélection des isolats pour la caractérisation s'appuie sur les résultats de sérotypage (deux sérotypes différents et deux isolats conservés) et de ribotypage : lorsque le sérotype des deux isolats du même échantillon était le même et possédait donc un même profil ribotype, un isolat par échantillon a été sélectionné. Cela a été le cas dans la majorité des échantillons (151 échantillons sur 220). Cependant, d'autres échantillons (n=69) avec un ribotype identique pour deux isolats du même échantillon ont été également caractérisés par PFGE. Le résultat a montré qu'environ 15 % de ces isolats (n=10) présentaient deux pulsotypes différents. En se basant sur ces résultats, il est donc probable qu'une certaine part de la diversité n'ait pas été prise en compte dans notre étude.

Une autre limite à notre étude peut être soulignée; elle concerne les conditions utilisées au laboratoire pour la production de biofilm de *L. monocytogenes*. Pour l'ensemble du travail présenté dans cette thèse, le biofilm a été formé dans des conditions de température de 30°C alors que dans l'environnement des industries agroalimentaires, sauf sur la ligne d'abattage, les températures sont entre 4 et 7°C. Cependant, des essais préliminaires portant sur la capacité des souches de *L. monocytogenes* à former le biofilm ont été réalisés dans différentes conditions dans le cadre de ce travail. Il semblerait que les souches de notre collection, sauf pour de rares exceptions, conservent leurs caractéristiques de fortes ou faibles formatrices de biofilm à 30°C et à 7°C.

Par ailleurs, l'association entre la persistance d'un pulsotype et sa détection dans les cas humain de listériose telle qu'elle apparaît dans l'analyse des résultats présentés dans l'article I doit être considéré au regard de la limite suivante : bien que la base de données du LSPQ

renferme toutes les souches de cas de listériose au Québec depuis que cette maladie est devenue une MADO, en l'absence d'évaluation de sous-diagnostic (notamment pour des listérioses non invasives) la généralisation de ce lien entre persistance et cas humains devra être consolidée notamment en améliorant la récolte et la caractérisation des souches aux deux extrémités de la chaîne considérée (production de viande et cas humains).

Par ailleurs, en ce qui concerne la portion de l'étude de l'interaction du microbiote résiduel des surfaces de découpe des viandes, nous émettons une autre réserve : puisque les interactions suggérées par les analyses bio-informatiques et statistiques n'ont pas été confirmées en laboratoire, il faut les considérer comme des hypothèses de travail. Elles doivent être testées en utilisant une méthode de culture bactériologique permettant de réunir les différentes conditions de croissance des différents genres ou espèces identifiés, ce qui représente un défi technique considérable. Ce défi est d'autant plus considérable compte tenu du fait que le niveau taxonomique le plus précis atteint dans cette étude est le genre, le choix de ou des espèces à considérer dans une étude bactériologique pourrait être difficile.

De plus, il est important de rappeler l'identification des espèces bactériennes présentes est basée sur le séquençage de l'ADN, ce qui veut dire que même des bactéries mortes sont potentiellement considérées dans ce genre d'étude. C'est particulièrement possible pour les genres bactériens anaérobiques dont la survie dans un environnement tel que les surfaces de découpe de viandes est ardue.

V. Conclusion

À travers les travaux réalisés dans ce projet de thèse, une meilleure connaissance de la présence et la diversité de *L. monocytogenes* dans les abattoirs et les usines de découpe de porcs a pu être atteinte. D'autre part, ces travaux ont contribué à une meilleure compréhension, dans une perspective plus globale, du phénomène de persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries agroalimentaires.

Dans une première étude, un état des lieux a été réalisé pour la première fois au Canada quant à la prévalence de *L. monocytogenes* dans l'environnement des abattoirs et des usines de découpe de porcs. Les taux de contamination de cet environnement sont semblables à ce qui est déjà observé dans d'autres pays. Par ailleurs, la diversité de *L. monocytogenes* a été étudiée de manière très profonde ce qui nous a permis de conclure qu'il n'y a pas de changement de diversité de souches de *Listeria monocytogenes* le long du processus d'abattage et de découpe. Toutefois, le changement des conditions d'environnement d'une étape à une autre induirait une plus forte fréquence d'isolement des souches persistantes, comme c'est le cas du secteur de la découpe.

Parmi les 58 souches caractérisées dans cette étude, 8 sont considérées persistantes puisqu'elles ont été isolées au moins à trois reprises durant plus d'une année. L'étude de la distribution de ces souches à travers le processus d'abattage et de découpe a permis de conclure que les souches persistantes de *L. monocytogenes* sont significativement plus présentes dans les étapes post-éviscération, et, plus particulièrement, dans les usines de découpe, par rapport au début d'abattage. C'est une conclusion très importante dans le contexte car le risque d'une contamination répétée des matières premières devient bien réel. Notre étude a permis d'identifier les mêmes souches (profils PFGE de souches persistantes) dans des collections de *Listeria monocytogenes* isolées d'aliments et/ou de cas de listériose humaine et de montrer que parmi nos souches persistantes, certaines ont le profil génétique de souches souvent responsables d'épidémies de listériose au Canada.

Afin d'expliquer la persistance des souches de *L. monocytogenes*, les phénomènes de formation de biofilm, de résistance aux QACs et d'interaction avec l'écosystème bactérien de l'environnement des industries agroalimentaires ont été étudiés.

Dans ce travail, nous avons, bien qu'indirectement, montré que la capacité à former des biofilms pour *L. monocytogenes* n'intervient pas de façon essentielle dans la persistance. En effet, lors de la présente étude, aucune différence phénotypique de capacité à former le biofilm par les souches persistantes et les non persistantes n'est apparu. De plus, l'analyse du génome de ces souches n'a pas permis d'identifier de déterminants génétiques pouvant favoriser la formation de biofilm des souches persistantes.

Cependant, lors de l'étude des caractéristiques du biofilm de *L. monocytogenes*, par l'utilisation d'une nouvelle méthode permettant une meilleure reproductibilité, mais aussi un meilleur contrôle des conditions entourant l'environnement du biofilm, il a été établi que les conditions de limitation en nutriments conduisaient à la formation d'un biofilm ayant une structure particulière, en forme de réseau, grâce à la libération de l'ADN-e. Cet ADN-e permettrait une meilleure adhésion aux surfaces dans les conditions micro-fluidiques.

L'étude des caractéristiques de résistance aux QACs a permis d'observer une forte association entre la persistance et la résistance aux désinfectants des souches persistantes de *L. monocytogenes*. En effet, les gènes de résistance aux désinfectants *bcrABC* et *emrE* ont été retrouvés presque exclusivement dans les souches persistantes, ces dernières maintiennent une croissance à des concentrations de BC 2 à 4 fois supérieures à celles inhibant les autres souches (non-persistantes et ne possédant pas de gènes de résistance aux QACs). Par ailleurs dans cette même étude, nous avons pu montrer l'importance de la caractérisation la plus précise (par l'utilisation du WGS). Une analyse intégrant le nombre et la position des SNP permet d'approfondir l'analyse à l'échelle clonale et de tenir compte de l'évolution des souches dans ces environnements stressants, particulièrement lorsqu'il s'agit d'une persistance sur plusieurs années.

Un autre facteur pouvant favoriser la persistance de *L. monocytogenes* a été étudié dans ce projet de thèse : il s'agit des interactions entre *L. monocytogenes* et d'autres bactéries présentes dans l'environnement de l'industrie agroalimentaire. Ainsi, notre étude a démontré

que la flore résiduelle bactérienne des surfaces de découpe des viandes est variable dans le temps.

Par ailleurs, cette étude a montré que le genre *Listeria*, avec la confirmation de la présence de l'espèce *monocytogenes*, présentait des interactions négatives avec plusieurs autres genres bactériens, notamment *Sphingomonas*, ce qui traduirait une compétition envers les nutriments et/ou l'habitat. La présence de *Pseudomonas* en même temps que *Listeria* avec une abondance relativement importante laisse croire qu'une possible cohabitation entre des espèces de ces deux genres peut s'établir.

Enfin, l'étude de l'ensemble de ces facteurs pouvant favoriser la persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries agroalimentaires nous a permis de constater, à bien des égards, que le phénomène de persistance de cette bactérie ne peut être expliqué par un seul facteur de manière indépendante. En effet, il est connu que la formation de biofilm par les bactéries leur permettrait de se protéger des conditions difficiles entourant leur environnement. C'est aussi le cas de *L. monocytogenes* qui, par la formation de biofilm, réussit à survivre malgré une exposition quotidienne au nettoyage et à la désinfection. Si nous avons montré que la capacité de la souche à former seule un biofilm n'est pas une condition sine qua non à la persistance, il faut rappeler qu'en industrie ce même biofilm peut être composé d'autres espèces bactériennes et pourrait permettre sinon la croissance de *L. monocytogenes*, au moins son maintien sous une forme plus ou moins latente. C'est lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance que la contamination serait à notre avis, la plus probable. La vie dans une communauté mixte et dynamique permet également l'acquisition des gènes de résistance, ce qui se fait également en partie grâce à la présence d'autres espèces bactériennes porteuses de ces gènes, notamment *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*. Le biofilm peut donc aussi intervenir dans le transfert de ces gènes de résistance et contribuer ainsi au processus de résistance aux désinfectants, lequel est considéré dans notre étude comme le mécanisme clef conduisant à la persistance pour les souches étudiées.

De manière plus générale, ce projet a apporté des informations importantes sur le statut de *L. monocytogenes* dans les abattoirs et les usines de découpe de porcs au Québec. Il a démontré l'importance de considérer le niveau de contamination des industries de transformation primaire des produits de viande ainsi que le type de souche dans le contrôle de cette bactérie. Ceci pourra aider les industries en aval de la production à mieux connaître les sources de contamination et de l'environnement et du produit dans un premier temps, puis de prendre les mesures nécessaires pour contrôler ces contaminations par une bactérie qui demeure un défi de santé publique.

VI. Perspectives

En se basant sur les conclusions de ce projet de thèse, de nouvelles avenues portant sur l'étude de la persistance de *L. monocytogenes* dans les industries agroalimentaires peuvent être proposées :

Dans le but de confirmer que l'environnement des abattoirs est une source de contamination des matières premières (viande crue) par les souches persistantes de *L. monocytogenes*, l'étude de leur prévalence et la vérification de la présence des gènes de résistance au QAQ dans les matières premières (les produits crus) et dans les industries de transformation serait intéressante. En effet, la forte présence de ces souches dans l'environnement des salles de découpe, particulièrement sur les surfaces en contact avec les produits, laisse supposer que leur présence sera également importante en aval de la production.

L'utilisation d'autres désinfectants que ceux à base de QACs, ou d'autres stratégies (décontamination par vapeur des équipements) permettront de diminuer ou d'éviter le phénomène de résistance et de persistance. Ainsi, la recherche d'autres composés actifs contre *L. monocytogenes* dans l'environnement des industries agroalimentaires permettra de valider l'intérêt de leur utilisation en alternance avec les QACs.

L'étude du biofilm des souches persistantes de *L. monocytogenes* en présence de désinfectants permettra d'élucider leurs rôles phénotypiques dans la persistance. Aussi, l'étude des interactions entre des espèces bactériennes avec *L. monocytogenes* en co-culture au sein d'un biofilm mixte sera plus qu'intéressante. Ainsi, une telle étude aurait pour but de confirmer les résultats d'interactions entre *L. monocytogenes* et d'autres genres, révélés par des analyses bio-informatiques et statistiques. Enfin, la caractérisation des souches de *L. monocytogenes* détectées directement dans ces communautés bactériennes permettrait d'identifier si ces souches appartiennent bien aux mêmes profils de souches persistantes de *L. monocytogenes*.

Dans le contexte réglementaire actuel, il serait particulièrement intéressant pour cette filière de soutenir la mise en place d'un programme de surveillance structurée portant sur le dépistage et la caractérisation des souches persistantes de *L. monocytogenes* dans les usines produisant de la viande crue.

Par ailleurs, une meilleure caractérisation au niveau clonal des souches retrouvées dans l'environnement de ces abattoirs permettra de mieux les comparer avec d'autres souches isolées d'aliments ou des cas cliniques. De cette façon une meilleure image du risque que l'industrie porcine représente sera dressée au niveau provincial. De plus, une étude approfondie de la virulence de ces souches environnementales comparée à celle de souches isolées de cas humains, serait très intéressante à mener afin de mieux apprécier le poids de ces environnementales en santé publique. L'étude apparaît complexe. En effet, il a été montré que des souches présentant une protéine de virulence InlA tronquée, donc attendue hypovirulente, étaient retrouvées dans les cas de listériose humaine mais aussi chez les ruminants principalement les bovins ce qui montre que même ces souches considérées hypovirulentes peuvent causer des listérioses (Annexe 5). La contribution de ces souches hypovirulentes à la réalité des cas cliniques au Canada reste donc à établir.

VII. Bibliographie

Aase, B., G. Sundheim, S. Langsrud and L. M. Rorvik (2000). "Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* **62**(1-2): 57-63.

Ackermann, M. (2015). "A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms." *Nat Rev Microbiol* **13**(8): 497.

AIRES, J. (2011). "Les systèmes d'efflux actifs bactériens: Caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ?".

Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov and T. Tolker-Nielsen (2006). "A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms." *Mol Microbiol* **59**(4): 1114-1128.

Allocati, N., M. Masulli, C. Di Ilio and V. De Laurenzi (2015). "Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria." *Cell Death Dis* **6**: e1609.

Álvarez-Ordóñez, A., D. Leong, B. Hickey, A. Beaufort and K. Jordan (2015). "The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document." *Food Res Int* **75**: 233-243.

An, D., T. Danhorn, C. Fuqua and M. R. Parsek (2006). "Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3828-3833.

ASPC (2018). "Maladies à déclaration obligatoire en direct."

Authority, E. F. S., E. C. f. D. Prevention and Control (2017). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016." *EFSA Journal* **15**(12): e05077.

Autio, T., T. Säteri, M. Fredriksson-Ahomaa, M. Rahkio, J. Lundén and H. Korkeala (2000). "*Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses." *J Food Prot* **63**(10): 1438-1442.

Autret, N., C. Raynaud, I. Dubail, P. Berche and A. Charbit (2003). "Identification of the agr locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence." *Infect Immun* **71**(8): 4463-4471.

- Awofisayo-Okuyelu, A., N. Q. Verlander, C. Amar, R. Elson, K. Grant and J. Harris (2016). "Factors influencing the time between onset of illness and specimen collection in the diagnosis of non-pregnancy associated listeriosis in England and Wales." *BMC Infect Dis* **16**(1): 311.
- Azevedo, N. F., R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A. R. Costa, M. Desvaux, G. Di Bonaventura, M. Hébraud, Z. Jaglic, M. Kačániová, S. Knøchel, A. Lourenço, F. Mergulhão, R. L. Meyer, G. Nychas, M. Simões, O. Tresse and C. Sternberg (2017). "Critical review on biofilm methods AU - Azeredo, Joana." *Crit Rev Microbiol* **43**(3): 313-351.
- Basler, M., B. Ho and J. Mekalanos (2013). "Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions." *Cell* **152**(4): 884-894.
- Bayles, K. W. (2007). "The biological role of death and lysis in biofilm development." *Nat Rev Microbiol* **5**(9): 721-726.
- Benoit, M. R., C. G. Conant, C. Ionescu-Zanetti, M. Schwartz and A. Matin (2010). "New device for high-throughput viability screening of flow biofilms." *Appl Environ Microbiol* **76**(13): 4136-4142.
- Bergholz, T. M., M. K. Shah, L. S. Burall, M. Rakic-Martinez and A. R. Datta (2018). "Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis." *J Microbiol Biotechnol* **102**(8): 3475-3485.
- Bierne, H., C. Sabet, N. Personnic and P. Cossart (2007). "Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*." *Microbes Infect* **9**(10): 1156-1166.
- Bierne, H., T. N. Tham, E. Batsche, A. Dumay, M. Leguillou, S. Kernéis-Golsteyn, B. Regnault, J. S. Seeler, C. Muchardt and J. Feunteun (2009). "Human BAHD1 promotes heterochromatic gene silencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33): 13826-13831.
- Borch, E., T. Nesbakken and H. Christensen (1996). "Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria." *Int J Food Microbiol* **30**(1-2): 9-25.
- Bore, E., M. Hébraud, I. Chafsey, C. Chambon, C. Skjæret, B. Moen, T. Møretro, Ø. Langsrud, K. Rudi and S. Langsrud (2007). "Adapted tolerance to benzalkonium chloride in

Escherichia coli K-12 studied by transcriptome and proteome analyses." *Microbiology* **153**(4): 935-946.

Borgeaud, S., L. C. Metzger, T. Scignari and M. Blokesch (2015). "The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer." *Science* **347**(6217): 63-67.

Borucki, M. K. and D. R. Call (2003). "*Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR." *J Clin Microbiol* **41**(12): 5537-5540.

Borucki, M. K., J. D. Peppin, D. White, F. Loge and D. R. Call (2003). "Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* **69**(12): 7336-7342.

Bremer, P. J., I. Monk and C. M. Osborne (2001). "Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp." *J Food Prot* **64**(9): 1369-1376.

Brosch, R., C. Buchrieser and J. Rocourt (1991). "Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis." *Res Microbiol* **142**(6): 667-675.

Brouwer, M. C. and D. van de Beek (2017). "MONALISA: a grim picture of listeriosis." *Lancet Infect Dis* **17**(5): 464-466.

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

Buckingham-Meyer, K., D. M. Goeres and M. A. Hamilton (2007). "Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests." *J Microbiol Methods* **70**(2): 236-244.

Buffet-Bataillon, S., P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet and A. Jolivet-Gougeon (2012). "Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review." *Int J Antimicrob Agents* **39**(5): 381-389.

Cabanes, D., O. Dussurget, P. Dehoux and P. Cossart (2004). "Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence." *Mol Microbiol* **51**(6): 1601-1614.

- Cabanes, D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul and P. Cossart (2002). "Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*." Trends Microbiol **10**(5): 238-245.
- Cabanes, D., S. Sousa, A. Cebria, M. Lecuit, F. García-del Portillo and P. Cossart (2005). "Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein." The EMBO journal **24**(15): 2827-2838.
- Call, D. R., M. K. Borucki and T. E. Besser (2003). "Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **41**(2): 632-639.
- Canada, H. (2012). "*Listeria monocytogenes* challenge testing of refrigerated ready-to-eat foods." Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch.
- Canada, S. (2011). "Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger".
- Canada., C. P. H. A. o. (2017). "FoodNet Canada ... annual report .".
- Cantinelli, T., V. Chenal-Francois, L. Diancourt, L. Frezal, A. Leclercq, T. Wirth, M. Lecuit and S. Brisse (2013). "'Epidemic Clones' of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups." J Clin Microbiol **51**(11): 3770-3779.
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer and R. Knight (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(Supplement 1): 4516-4522.
- Carpentier, B. and D. Chassaing (2004). "Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises." Int J Food Microbiol **97**(2): 111-122.
- Carpentier, B. and O. Cerf (2011). "Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises." Int J Food Microbiol **145**(1): 1-8.
- Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Connell and D. Alland (2007). "A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria." J Microbiol Methods **69**(2): 330-339.

Chan, Y. C., K. J. Boor and M. Wiedmann (2007). " σ^B -dependent and σ^B -independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth." *Appl Environ Microbiol***73**(19): 6019-6029.

Chao, L. and B. R. Levin (1981). "Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A***78**(10): 6324-6328.

Charlier, C., E. Perrodeau, A. Leclercq, B. Cazenave, B. Pilmis, B. Henry, A. Lopes, M. M. Maury, A. Moura, F. Goffinet, H. B. Dieye, P. Thouvenot, M. N. Ungeheuer, M. Tourdjman, V. Goulet, H. de Valk, O. Lortholary, P. Ravaud and M. Lecuit (2017). "Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study." *Lancet Infect Dis* **17**(5): 510-519.

Chasseignaux, E., M. T. Toquin, C. Ragimbeau, G. Salvat, P. Colin and G. Ermel (2001). "Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry-and pork-processing plants." *J Appl Microbiol***91**(5): 888-899.

Combrouse, T., I. Sadovskaya, C. Faille, O. Kol, Y. Guerardel and G. Midelet-Bourdin (2013). "Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions." *J Appl Microbiol* **114**(4): 1120-1131.

Control, C. f. D. and Prevention (2013). "Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011." *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **62**(22): 448.

Cordero, O. X., L.-A. Ventouras, E. F. DeLong and M. F. Polz (2012). "Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations." *Proc Natl Acad Sci U S A***109**(49): 20059-20064.

Cossart, P. and E. Veiga (2008). "Non-classical use of clathrin during bacterial infections." *Journal of microscopy* **231**(3): 524-528.

Costa, A., L. Bertolotti, L. Brito and T. Civera (2016). "Biofilm formation and disinfectant susceptibility of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates from Gorgonzola cheese processing plants." *Foodborne Pathog Dis Foodborne Pathog Dis***13**(11): 602-609.

- Cotter, P. D., C. G. Gahan and C. Hill (2001). "A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid." *Mol Microbiol***40**(2): 465-475.
- Cotter, P. D., L. A. Draper, E. M. Lawton, K. M. Daly, D. S. Groeger, P. G. Casey, R. P. Ross and C. Hill (2008). "Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*." *PLoS pathogens* **4**(9): e1000144.
- Cruz, C. D., A. R. Pitman, S. A. Harrow and G. C. Fletcher (2014). "*Listeria monocytogenes* associated with New Zealand seafood production and clinical cases: unique sequence types, truncated InlA, and attenuated invasiveness." *Appl Environ Microbiol* **80**(4): 1489-1497.
- Currie, A., J. M. Farber, C. Nadon, D. Sharma, Y. Whitfield, C. Gaulin, E. Galanis, S. Bekal, J. Flint and L. Tschetter (2015). "Multi-province listeriosis outbreak linked to contaminated deli meat consumed primarily in institutional settings, Canada, 2008." *Foodborne Pathog Dis Foodborne Pathog Dis***12**(8): 645-652.
- D'AMICO, D. J. and C. W. Donnelly (2008). "Enhanced detection of *Listeria spp.* in farmstead cheese processing environments through dual primary enrichment, PCR, and molecular subtyping." *J Food Prot* **71**(11): 2239-2248.
- Darwin, C. (2004). *On the origin of species*, 1859, Routledge.
- Das, T., P. K. Sharma, H. J. Busscher, H. C. van der Mei and B. P. Krom (2010). "Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation." *Appl Environ Microbiol***76**(10): 3405-3408.
- Dauphin, G., C. Ragimbeau and P. Malle (2001). "Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants." *Int J Food Microbiol***64**(1-2): 51-61.
- Davey, M. E. and G. A. O'toole (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." *Microbiology and molecular biology reviews* **64**(4): 847-867.
- de Noordhout, C. M., B. Devleeschauwer, F. J. Angulo, G. Verbeke, J. Haagsma, M. Kirk, A. Havelaar and N. Speybroeck "The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis* **14**(11): 1073-1082.

- de Noordhout, C. M., B. Devleeschauwer, F. J. Angulo, G. Verbeke, J. Haagsma, M. Kirk, A. Havelaar and N. Speybroeck (2014). "The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis* **14**(11): 1073-1082.
- den Boer, P. J. (1986). "The present status of the competitive exclusion principle." *Trends in ecology & evolution* **1**(1): 25-28.
- Di Bonaventura, G., R. Piccolomini, D. Paludi, V. D'Orio, A. Vergara, M. Conter and A. Ianieri (2008). "Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity." *J Appl Microbiol* **104**(6): 1552-1561.
- Diard, M., V. Garcia, L. Maier, M. N. Remus-Emsermann, R. R. Regoes, M. Ackermann and W.-D. Hardt (2013). "Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype." *Nature* **494**(7437): 353.
- Diggel, S. P., A. S. Griffin, G. S. Campbell and S. A. West (2007). "Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations." *Nature* **450**(7168): 411.
- Djordjevic, D., M. Wiedmann and L. A. McLandsborough (2002). "Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation." *Appl Environ Microbiol* **68**(6): 2950-2958.
- Doijad, S. P., S. B. Barbuddhe, S. Garg, K. V. Poharkar, D. R. Kalorey, N. V. Kurkure, D. B. Rawool and T. Chakraborty (2015). "Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources." *PloS one* **10**(9): e0137046-e0137046.
- Dong, Y.-H., A. R. Gusti, Q. Zhang, J.-L. Xu and L.-H. Zhang (2002). "Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species." *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 1754-1759.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerg Infect Dis* **8**(9): 881.
- Dumont, J. and L. Cotoni (1921). "Bacille semblable à celui du rouget du porc rencontré dans le LCR d'un méningitique." *Ann. Inst. Pasteur* **35**: 625-633.

- Dutta, V., D. Elhanafi and S. Kathariou (2013). "Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* **79**(19): 6067-6074.
- Dworkin, M. (2006). *The prokaryotes: vol. 4: bacteria: firmicutes, cyanobacteria*, Springer Science & Business Media.
- Ebner, R., R. Stephan, D. Althaus, S. Brisse, M. Maury and T. Tasara (2015). "Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2014 from different food matrices in Switzerland." *Food Control* **57**: 321-326.
- Elhanafi, D., V. Dutta and 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**(24): 8231-8238.
- Elias, S. and E. Banin (2012). "Multi-species biofilms: living with friendly neighbors." *FEMS microbiology reviews* **36**(5): 990-1004.
- Ericsson, H., H. Unnerstad, J. G. Mattsson, M.-L. Danielsson-Tham and W. Tham (2000). "Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the inlB gene." *Journal of medical microbiology* **49**(1): 73-80.
- Fagerlund, A., T. Møretro, E. Heir, R. Briandet and S. Langsrud (2017). "Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces." *Applied and environmental microbiology: AEM*. 01046-01017.
- Farber, J. M. and C. Addison (1994). "RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*." *Journal of Applied Bacteriology* **77**(3): 242-250.
- Farber, J. M., F. Pagotto and C. Scherf (2007). *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in meat products. Listeria, listeriosis, and food safety*, CRC Press: 521-588.
- Farber, J. M., G. K. Kozak and S. Duquette (2011). "Changing regulation: Canada's new thinking on *Listeria*." *Food Control* **22**(9): 1506-1509.
- Fenlon, D., J. Wilson and W. Donachie (1996). "The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing." *Journal of Applied Bacteriology* **81**(6): 641-650.

Ferreira, V., J. Barbosa, M. Stasiewicz, K. Vongkamjan, A. M. Switt, T. Hogg, P. Gibbs, P. Teixeira and M. Wiedmann (2011). "Diverse geno-and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal." *Appl Environ Microbiol* **77**(8): 2701-2715.

Ferreira, V., M. Wiedmann, P. Teixeira and M. J. Stasiewicz (2014). "*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health." *J Food Prot* **77**(1): 150-170.

Flemming, H.-C., T. R. Neu and D. J. Wozniak (2007). "The EPS matrix: the "house of biofilm cells"." *J Bacteriol* **189**(22): 7945-7947. Fox, E. M., K. Solomon, J. E. Moore, P. G. Wall and S. Fanning (2014). "Phylogenetic Profiles of In-House Microflora in Drains at a Food Production Facility: Comparison and Biocontrol Implications of *Listeria*-Positive and -Negative Bacterial Populations." *Appl Environ Microbiol* **80**(11): 3369-3374.

Fox, E. M., N. Leonard and K. Jordan (2011). "Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates." *Appl Environ Microbiol* **77**(18): 6559-6569.

Fox, E., K. Hunt, M. O'Brien and K. Jordan (2011). "*Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments." *Int J Food Microbiol* **145**: S39-S45.

Fox, E., T. O'MAHONY, M. Clancy, R. Dempsey, M. O'BRIEN and K. Jordan (2009). "*Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment." *J Food Prot* **72**(7): 1450-1456.

Fox, G. E., L. J. Magrum, W. E. Balch, R. S. Wolfe and C. R. Woese (1977). "Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(10): 4537-4541.

Fuhrman, J. A. (2009). "Microbial community structure and its functional implications." *Nature* **459**(7244): 193.

Garmyn, D., L. Gal, R. Briandet, M. Guilbaud, J. P. Lemaître, A. Hartmann and P. Piveteau (2011). "Evidence of autoinduction heterogeneity via expression of the Agr system of *Listeria monocytogenes* at the single-cell level." *Appl Environ Microbiol* **77**(17): 6286-6289.

Gause, G. F. (1932). "Experimental studies on the struggle for existence: I. Mixed population of two species of yeast." *Journal of experimental biology* **9**(4): 389-402.

George, S. M. and B. M. Lund (1992). "The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5." *Letters in applied microbiology* **15**(2): 49-52.

Ghoul, M. and S. Mitri (2016). "The ecology and evolution of microbial competition." *Trends Microbiol***24**(10): 833-845.

Ghoul, M., S. West, S. Diggle and A. Griffin (2014). "An experimental test of whether cheating is context dependent." *Journal of evolutionary biology* **27**(3): 551-556.

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

Giovannacci, I., C. Ragimbeau, S. Queguiner, G. Salvat, J.-L. Vendeuvre, V. Carlier and G. Ermel (1999). "*Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology." *Int J Food Microbiol***153**(2-3): 127-140.

Godreuil, S., M. Galimand, G. Gerbaud, C. Jacquet and P. Courvalin (2003). "Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**(2): 704-708.

Gonçalves-Tenório, A., B. Silva, V. Rodrigues, V. Cadavez and U. Gonzales-Barron (2018). "Prevalence of pathogens in poultry meat: a meta-analysis of European published surveys." *Foods* **7**(5): 69.

Gore, J., H. Youk and A. Van Oudenaarden (2009). "Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast." *Nature* **459**(7244): 253.

Gouin, E., M. Adib-Conquy, D. Balestrino, M. A. Nahori, V. Villiers, F. Colland, S. Dramsi, O. Dussurget and P. Cossart (2010). "The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I(Gouin, Adib-Conquy et al.)B kinase subunit IKK." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40): 17333-17338.

- Gouin, E., M. Adib-Conquy, D. Balestrino, M. A. Nahori, V. Villiers, F. Colland, S. Dramsi, O. Dussurget and P. Cossart (2010). "The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I{kappa}B kinase subunit IKK{alpha}." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(40): 17333-17338.
- Goulet, V., L. A. King, V. Vaillant and H. de Valk (2013). "What is the incubation period for listeriosis?" BMC Infect Dis **13**(1): 11.
- Graves, L. M. and B. Swaminathan (2001). "PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis." Int J Food Microbiol **65**.
- Gray, M. J., R. N. Zadoks, E. D. Fortes, B. Dogan, S. Cai, Y. Chen, V. N. Scott, D. E. Gombas, K. J. Boor and M. Wiedmann (2004). "*Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations." Appl Environ Microbiol **70**(10): 5833-5841.
- Gray, M. L. and A. H. Killinger (1966). "*Listeria monocytogenes* and listeric infections." Bacteriol Rev **30**.
- Griffin, A. S., S. A. West and A. Buckling (2004). "Cooperation and competition in pathogenic bacteria." Nature **430**(7003): 1024.
- Gudbjörnsdóttir, B., M.-L. Suihko, P. Gustavsson, G. Thorkelsson, S. Salo, A.-M. Sjöberg, O. Niclasen and S. Bredholt (2004). "The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries." Food Microbiology **21**(2): 217-225.
- Guilbaud, M., P. Piveteau, M. Desvaux, S. Brisse and R. Briandet (2015). "Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype." Appl Environ Microbiol **81**(5): 1813-1819.
- Guillier, L., V. Stahl, B. Hezard, E. Notz and R. Briandet (2008). "Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves." Int J Food Microbiol **128**(1): 51-57.
- Gupta, R., J. M. Lanter and C. R. Woese (1983). "Sequence of the 16S ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaebacterium." Science **221**(4611): 656-659.

- Gurtler, J. B., M. P. Doyle and J. L. Kornacki (2017). *Foodborne Pathogens: Virulence Factors and Host Susceptibility*, Springer.
- Haase, J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, L. m. M. S. Group and M. Achtman (2014). "The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale M ultilocus S equence T yping study." *Environ Microbiol* **16**(2): 405-416.
- Hamon, M. A., D. Ribet, F. Stavru and P. Cossart (2012). "Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*." *Trends Microbiol* **20**(8): 360-368.
- Hardin, G. (1960). "The competitive exclusion principle." *science* **131**(3409): 1292-1297.
- Harmsen, M., M. Lappann, S. Knochel and S. Molin (2010). "Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* **76**(7): 2271-2279.
- Harvey, J., K. P. Keenan and A. Gilmour (2007). "Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains." *Food Microbiol* **24**(4): 380-392.
- Heir, E., T. Møretør, A. Simensen and S. Langsrud (2018). "*Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments." *Int J Food Microbiol***275**: 46-55.
- Hellström, S., R. Laukkanen, K.-M. Siekkinen, J. Ranta, R. Majjala and H. Korkeala (2010). "*Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms." *J Food Prot* **73**(4): 641-648.
- Henri, C., B. Félix, L. Guillier, P. Leekitcharoenphon, D. Michelon, J.-F. Mariet, F. M. Aarestrup, M.-Y. Mistou, R. S. Hendriksen and S. Roussel (2016). "Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains as determined by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing." *Appl Environ Microbiol* **82**(18): 5720-5728.
- Herenda, D., P. Chambers, A. Ettriqui, P. Seneviratna and T. da Silva (2002). "Manual on meat inspection for developing countries. FAO Animal Production and Health Paper 119." Publishing and Multimedia Service, Information Division, FAO **19**.
- Hernandez-Milian, A. and A. Payeras-Cifre (2014). "What is new in listeriosis?" *BioMed research international* **2014**.

- Hibbing, M. E., C. Fuqua, M. R. Parsek and S. B. Peterson (2010). "Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle." *Nat Rev Microbio* **8**(1): 15.
- Hoelzer, K., R. Pouillot, S. Dennis, D. Gallagher and J. Kause (2015). Update on *Listeria monocytogenes*: reducing cross-contamination in food retail operations. *Advances in Microbial Food Safety*, Elsevier: 149-194.
- Hof, H. (2003). "History and epidemiology of listeriosis." *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**(3): 199-202.
- Holah, J., J. Bird and K. Hall (2004). "The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria spp.* and *Escherichia coli* strains." *J Appl Microbiol* **97**(1): 68-77.
- Islam, M., A. Husna, M. Islam and M. Khatun (2016). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in beef, chevon and chicken in Bangladesh." *American Journal of Food Science and Health* **2**(4): 39-44.
- Jacquet, C., M. Doumith, J. I. Gordon, P. M. Martin, P. Cossart and M. Lecuit (2004). "A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*." *The Journal of infectious diseases* **189**(11): 2094-2100.
- Jacquet, C., M. Doumith, J. I. Gordon, P. M. Martin, P. Cossart and M. Lecuit (2004). "A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*." *The Journal of infectious diseases* **189**(11): 2094-2100.
- Jakobsen, A. M., M. I. Bahl, T. Buschhardt, T. B. Hansen, W. A. Al-Soud, A. D. Brejnrod, S. J. Sorensen, T. Nesbakken and S. Aabo (2019). "Bacterial community analysis for investigating bacterial transfer from tonsils to the pig carcass." *Int J Food Microbiol* **295**: 8-18.
- Janakiraman, V., D. Englert, A. Jayaraman and H. Baskaran (2009). "Modeling growth and quorum sensing in biofilms grown in microfluidic chambers." *Ann Biomed Eng* **37**(6): 1206-1216.
- Jennings, M. C., K. P. Minbiole and W. M. Wuest (2015). "Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance." *ACS infectious diseases* **1**(7): 288-303.

- Jeong, D. K. and J. F. Frank (1994). "Growth of *Listeria monocytogenes* at 21 C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments." *LWT-Food Science and Technology* **27**(5): 415-424.
- Jiang, P., J. Li, F. Han, G. Duan, X. Lu, Y. Gu and W. Yu (2011). "Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101." *PloS one* **6**(4): e18514.
- Jiang, X., T. Yu, Y. Liang, S. Ji, X. Guo, J. Ma and L. Zhou (2016). "Efflux pump-mediated benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from retail food." *Int J Food Microbiol* **217**: 141-145.
- Junttila, J. R., S. Niemelä and J. Hirn (1988). "Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria." *Journal of Applied Bacteriology* **65**(4): 321-327.
- Kadam, S. R., H. M. den Besten, S. van der Veen, M. H. Zwietering, R. Moezelaar and T. Abee (2013). "Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin." *Int J Food Microbiol* **165**(3): 259-264.
- Kamper, J., R. Kahmann, M. Bolker, L. J. Ma, T. Brefort, B. J. Saville, F. Banuett, J. W. Kronstad, S. E. Gold, O. Muller, M. H. Perlin, H. A. Wosten, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, C. G. Reynaga-Pena, K. Snetselaar, M. McCann, J. Perez-Martin, M. Feldbrugge, C. W. Basse, G. Steinberg, J. I. Ibeas, W. Holloman, P. Guzman, M. Farman, J. E. Stajich, R. Sentandreu, J. M. Gonzalez-Prieto, J. C. Kennell, L. Molina, J. Schirawski, A. Mendoza-Mendoza, D. Greilinger, K. Munch, N. Rossel, M. Scherer, M. Vranes, O. Ladendorf, V. Vincon, U. Fuchs, B. Sandrock, S. Meng, E. C. Ho, M. J. Cahill, K. J. Boyce, J. Klose, S. J. Klosterman, H. J. Deelstra, L. Ortiz-Castellanos, W. Li, P. Sanchez-Alonso, P. H. Schreier, I. Hauser-Hahn, M. Vaupel, E. Koopmann, G. Friedrich, H. Voss, T. Schluter, J. Margolis, D. Platt, C. Swimmer, A. Gnirke, F. Chen, V. Vysotskaia, G. Mannhaupt, U. Guldener, M. Munsterkotter, D. Haase, M. Oesterheld, H. W. Mewes, E. W. Mauceli, D. DeCaprio, C. M. Wade, J. Butler, S. Young, D. B. Jaffe, S. Calvo, C. Nusbaum, J. Galagan and B. W. Birren (2006). "Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*." *Nature* **444**.
- Karatzas, K. A., L. P. Randall, M. Webber, L. J. Piddock, T. J. Humphrey, M. J. Woodward and N. G. Coldham (2008). "Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-

resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants." *Appl Environ Microbiol* **74**(5): 1508-1516.

Kathariou, S. (2002). "*Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective." *J Food Prot* **65**(11): 1811-1829.

Kerr, B., M. A. Riley, M. W. Feldman and B. J. Bohannan (2002). "Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors." *Nature* **418**(6894): 171.

Keto-Timonen, R., R. Tolvanen, J. Lunden and H. Korkeala (2007). "An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism." *J Food Prot* **70**(8): 1866-1873.

Kim, J., H. D. Park and S. Chung (2012). "Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation." *Molecules* **17**(8): 9818-9834.

Kim, M., M. Morrison and Z. Yu (2011). "Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes." *J Microbiol Methods* **84**(1): 81-87.

Kim, W., F. Racimo, J. Schluter, S. B. Levy and K. R. Foster (2014). "Importance of positioning for microbial evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(16): E1639-E1647.

Kinkel, L. L., D. C. Schlatter, K. Xiao and A. D. Baines (2013). "Sympatric inhibition and niche differentiation suggest alternative coevolutionary trajectories among Streptomycetes." *The Isme Journal* **8**: 249.

Knabel, S. J., A. Reimer, B. Verghese, M. Lok, J. Ziegler, J. Farber, F. Pagotto, M. Graham, C. A. Nadon and M. W. Gilmour (2012). "Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988–2010." *Journal of Clinical Microbiology: JCM*. 06185-06111.

Koreňová, J., K. ORAVCOVÁ, A. VĚGHOVÁ, R. KARPÍ KOVÁ and T. KUČHTA (2016). "Biofilm formation in various conditions is not a key factor of persistence potential of *Listeria monocytogenes* in food-processing environment." *Journal of Food & Nutrition Research* **55**(2).

Kosaka, T., T. Uchiyama, S.-i. Ishii, M. Enoki, H. Imachi, Y. Kamagata, A. Ohashi, H. Harada, H. Ikenaga and K. Watanabe (2006). "Reconstruction and regulation of the central catabolic

pathway in the thermophilic propionate-oxidizing syntroph *Pelotomaculum thermopropionicum*." *J Bacteriol* **188**(1): 202-210.

Kotte, O., B. Volkmer, J. L. Radzikowski and M. Heinemann (2014). "Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism." *Molecular systems biology* **10**(7): 736.

Kovacevic, J., C. Arguedas-Villa, A. Wozniak, T. Tasara and K. J. Allen (2013). "Examination of food chain-derived *Listeria monocytogenes* of different serotypes reveals considerable diversity in *inlA* genotypes, mutability, and adaptation to cold temperature." *Applied and environmental microbiology: AEM*. 03341-03312.

Kovacevic, J., J. Ziegler, E. Wałęcka-Zacharska, A. Reimer, D. D. Kitts and M. W. Gilmour (2016). "Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*." *Appl Environ Microbiol* **82**(3): 939-953.

Kümmerli, R., A. S. Griffin, S. A. West, A. Buckling and F. Harrison (2009). "Viscous medium promotes cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**(1672): 3531-3538.

Langsrud, S., B. Moen, T. Møretro, M. Løype and E. Heir (2016). "Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants." *Journal of applied microbiology* **120**(2): 366-378.

Langsrud, S., M. S. Sidhu, E. Heir and A. L. Holck (2003). "Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry." *International Biodeterioration & Biodegradation* **51**(4): 283-290.

Lariviere-Gauthier, G., A. Letellier, A. Kerouanton, S. Bekal, S. Quessy, S. Fournaise and P. Fravallo (2014). "Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec." *J Food Prot* **77**(12): 2121-2128.

Latorre, A. A., J. A. S. Van Kessel, J. S. Karns, M. J. Zurakowski, A. K. Pradhan, K. J. Boor, E. Adolph, S. Sukhnanand and Y. H. Schukken (2011). "Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system." *Appl Environ Microbiol* **77**(11): 3676-3684.

- Lecuit, M. (2005). "Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers." *Clinical Microbiology and Infection* **11**(6): 430-436.
- Lee, J. H., Y. S. Kim, T.-J. Choi, W. J. Lee and Y. T. Kim (2004). "Paracoccus haeundaensis sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5): 1699-1702.
- Lee, S., Y. Chen, L. Gorski, T. J. Ward, J. Osborne and S. Kathariou (2018). "*Listeria monocytogenes* Source Distribution Analysis Indicates Regional Heterogeneity and Ecological Niche Preference among Serotype 4b Clones." *mBio* **9**(2): e00396-00318.
- Leitão, E., A. Catarina Costa, C. Brito, L. Costa, R. Pombinho, D. Cabanes and S. Sousa (2014). "*Listeria monocytogenes* induces host DNA damage and delays the host cell cycle to promote infection." *Cell Cycle* **13**(6): 928-940.
- Lemon, K. P., D. E. Higgins and R. Kolter (2007). "Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation." *J Bacteriol* **189**(12): 4418-4424.
- Leong, D., A. Alvarez-Ordóñez and K. Jordan (2014). "Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland." *Front Microbiol* **5**: 436.
- Lindblad, M., H. Lindmark, S. T. Lambertz and R. Lindqvist (2007). "Microbiological baseline study of swine carcasses at Swedish slaughterhouses." *J Food Prot* **70**(8): 1790-1797.
- Lopez, V., D. Villatoro, S. Ortiz, P. Lopez, J. Navas, J. C. Davila and J. V. Martinez-Suarez (2008). "Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant." *Meat Sci* **78**(1-2): 130-134.
- Lotem, A., M. A. Fishman and L. Stone (1999). "Evolution of cooperation between individuals." *Nature* **400**(6741): 226.
- Lunden, J. M., M. K. Miettinen, T. J. Autio and H. J. Korkeala (2000). "Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times." *J Food Prot* **63**(9): 1204-1207.

- Lunden, J. M., T. J. Autio, A.-M. Sjöberg and H. J. Korkeala (2003). "Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants." *J Food Prot* **66**(11): 2062-2069.
- Luo, L., Z. Zhang, H. Wang, P. Wang, R. Lan, J. Deng, Y. Miao, Y. Wang, Y. Wang and J. Xu (2017). "A 12-month longitudinal study of *Listeria monocytogenes* contamination and persistence in pork retail markets in China." *Food Control* **76**: 66-73.
- MacIntyre, D. L., S. T. Miyata, M. Kitaoka and S. Pukatzki (2010). "The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(45): 19520-19524.
- MacLean, R. C. and I. Gudelj (2006). "Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast." *Nature* **441**(7092): 498.
- Madden, R. H., M. Hutchison, K. Jordan, V. Pennone, O. Gundogdu and N. Corcionivoschi (2018). "Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in premises and products of small food business operators in Northern Ireland." *Food control* **87**: 70-78.
- Mageswari, A., P. Subramanian, R. Srinivasan, S. Karthikeyan and K. M. Gothandam (2015). "Astaxanthin from psychrotrophic *Sphingomonas faeni* exhibits antagonism against food-spoilage bacteria at low temperatures." *Microbiol Res* **179**: 38-44.
- Mai-Prochnow, A., F. Evans, D. Dalisay-Saludes, S. Stelzer, S. Egan, S. James, J. S. Webb and S. Kjelleberg (2004). "Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*." *Appl Environ Microbiol* **70**(6): 3232-3238.
- Malet, J. K., P. Cossart and D. Ribet (2017). "Alteration of epithelial cell lysosomal integrity induced by bacterial cholesterol-dependent cytolysins." *Cellular microbiology* **19**(4): e12682.
- Mariani, C., N. Oulahal, J.-F. Chamba, F. Dubois-Brissonnet, E. Notz and R. Briandet (2011). "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening." *Food Control* **22**(8): 1357-1362.
- Marsh, E. J., H. Luo and H. Wang (2003). "A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities." *FEMS Microbiology Letters* **228**(2): 203-210.

- Martin, B., A. Perich, D. Gomez, J. Yanguela, A. Rodriguez, M. Garriga and T. Aymerich (2014). "Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants." *Food Microbiol* **44**: 119-127.
- Martínez-Suárez, J. V., S. Ortiz and V. López-Alonso (2016). "Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments." *Front Microbiol* **7**.
- Marx, C. J. (2009). "Getting in touch with your friends." *Science* **324**(5931): 1150-1151.
- Mata, M., F. Baquero and J. Perez-Diaz (2000). "A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*." *FEMS Microbiology Letters* **187**(2): 185-188.
- Maury, M. M., Y. H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. C. Rocha, S. Brisse and M. Lecuit (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." *Nat Genet* **48**(3): 308-313.
- Maury, M. M., Y.-H. Tsai, C. Charlier, M. Touchon, V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, A. Criscuolo, C. Gaultier, S. Roussel, A. Brisabois, O. Disson, E. P. C. Rocha, S. Brisse and M. Lecuit (2016). "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity." *Nature Genetics* **48**: 308.
- Mędrala, D., W. Dąbrowski, U. Czekajło-Kołodziej, E. Dackowska-Kozon, A. Koronkiewicz, E. Augustynowicz and M. Manzano (2003). "Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period." *Food Microbiology* **20**(6): 715-724.
- Meier, A. B., C. Guldemann, A. Markkula, A. Pöntinen, H. Korkeala and T. Tasara (2017). "Comparative phenotypic and genotypic analysis of Swiss and Finnish *Listeria monocytogenes* isolates with respect to benzalkonium chloride resistance." *Front Microbiol* **8**: 397.
- Meloni, D., F. Piras, A. Mureddu, F. Fois, S. G. Consolati, S. Lamon and R. Mazzette (2013). "*Listeria monocytogenes* in five Sardinian swine slaughterhouses: prevalence, serotype, and genotype characterization." *J Food Prot* **76**(11): 1863-1867.

- Meloni, D., S. G. Consolati, R. Mazza, A. Mureddu, F. Fois, F. Piras and R. Mazzette (2014). "Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants." *Meat science* **97**(4): 443-450.
- Mereghetti, L., R. Quentin, N. Marquet-Van Der Mee and A. Audurier (2000). "Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds." *Appl Environ Microbiol* **66**(11): 5083-5086.
- Meyer, M. T., V. Roy, W. E. Bentley and R. Ghodssi (2011). "Development and validation of a microfluidic reactor for biofilm monitoring via optical methods." *Journal of Micromechanics and Microengineering* **21**(5): 054023.
- Miettinen, M., A. Siitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K. Björkroth and H. Korkeala (1999). "Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout." *J Clin Microbiol* **37**(7): 2358-2360.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
- Milohanic, E., R. Jonquières, P. Cossart, P. Berche and J. L. Gaillard (2001). "The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor." *Mol Microbiol* **39**(5): 1212-1224.
- Miranda, T. A. (2017). Evaluation of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: comparison between persistent and sporadic strains, ISA/UL.
- Mitri, S. and K. Richard Foster (2013). "The genotypic view of social interactions in microbial communities." *Annu Rev Genet* **47**: 247-273.
- Monk, I. R., G. M. Cook, B. C. Monk and P. J. Bremer (2004). "Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: biological significance of rough colony isolates." *Appl Environ Microbiol* **70**(11): 6686-6694.
- Moons, P., C. W. Michiels and A. Aertsen (2009). "Bacterial interactions in biofilms." *Crit Rev Microbiol* (3): 157-168.
- Morales-Partera, A., F. Cardoso-Toset, I. Luque, R. Astorga, A. Maldonado, S. Herrera-León, M. Hernández, J. Gómez-Laguna and C. Tarradas (2018). "Prevalence and diversity of

Salmonella spp., Campylobacter spp., and *Listeria monocytogenes* in two free-range pig slaughterhouses." *Food Control* **92**: 208-215.

Møretro, T. and S. Langsrud (2004). "*Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments." *Biofilms* **1**(2): 107-121.

Moretro, T., B. C. T. Schirmer, E. Heir, A. Fagerlund, P. Hjemli and S. Langsrud (2017). "Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry." *Int J Food Microbiol* **241**: 215-224.

Morris, J. J. (2015). "Black Queen evolution: the role of leakiness in structuring microbial communities." *Trends Genet* **31** (8): 475-482.

Morris, J. J., R. E. Lenski and E. R. Zinser (2012). "The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss." *MBio* **3**(2): e00036-00012.

Moura, A., A. Criscuolo, H. Pouseele, M. M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, J. T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer and V. Enouf (2016). "Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*." *Nat Microbiol* **2**: 16185.

Moura, A., M. Tourdjman, A. Leclercq, E. Hamelin, E. Laurent, N. Fredriksen, D. Van Cauteren, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, N. Tessaud-Rita, M. M. Maury, A. Alexandru, A. Criscuolo, E. Quevillon, M. P. Donguy, V. Enouf, H. de Valk, S. Brisse and M. Lecuit (2017). "Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France." *Emerg Infect Dis* **23**(9): 1462-1470.

Moura, A., O. Disson, M. Lavina, P. Thouvenot, L. Huang, A. Leclercq, M. Fredriksson-Ahomaa, A. K. Eshwar, R. Stephan and M. Lecuit (2019). "Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*." *Infect Immun* **87**(4): e00758-00718.

Mowat, E., R. Rajendran, C. Williams, E. McCulloch, B. Jones, S. Lang and G. Ramage (2010). "Pseudomonas aeruginosa and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation." *FEMS Microbiol Lett* **313**(2): 96-102.

Muhterem-Uyar, M., M. Dalmaso, A. S. Bolocan, M. Hernandez, A. E. Kapetanidou, T. Kuchta, S. G. Manios, B. Melero, J. Minarovičová and A. I. Nicolau (2015). "Environmental

sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios." *Food Control* **51**: 94-107.

Müller, A., K. Rychli, M. Muhterem-Uyar, A. Zaiser, B. Stessl, C. M. Guinane, P. D. Cotter, M. Wagner and S. Schmitz-Esser (2013). "Tn6188-a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride." *PLoS One* **8**(10): e76835.

Muraoka, W., C. Gay, D. Knowles and M. Borucki (2003). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* subtypes in bulk milk of the Pacific Northwest." *J Food Prot* **66**(8): 1413-1419.

Murray, E. G. D., R. A. Webb and M. B. R. Swann (1926). "A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)." *J Pathol Bacteriol* **29** (4): 407-439.

Musthafa, K. S., V. Saroja, S. K. Pandian and A. V. Ravi (2011). "Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)." *J Biosci* **36** (1): 55-67.

Nadell, C. D. and B. L. Bassler (2011). "A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (34): 14181-14185.

Nadon, C. A., B. M. Bowen, M. Wiedmann and K. J. Boor (2002). "Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*." *Infect Immun* **70**(7): 3948-3952.

Nadon, C., I. Van Walle, P. Gerner-Smidt, J. Campos, I. Chinen, J. Concepcion-Acevedo, B. Gilpin, A. M. Smith, K. M. Kam and E. Perez (2017). "PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance." *Eurosurveillance* **22**(23).

Nesbakken, T., E. Nerbrink, O.-J. Røtterud and E. Borch (1994). "Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria spp.* on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter." *Int J Food Microbiol* **23**(2): 197-208.

Nesbakken, T., G. Kapperud and D. A. Caugant (1996). "Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry." *Int J Food Microbiol* **31**(1-3): 161-171.

Nightingale, K. K., K. Windham, K. E. Martin, M. Yeung and M. Wiedmann (2005). "Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations

in inlA, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells." *Appl Environ Microbiol* **71**(12): 8764-8772.

Nightingale, K. K., S. R. Milillo, R. A. Ivy, A. J. Ho, H. F. Oliver and M. Wiedmann (2007). "*Listeria monocytogenes* F2365 carries several authentic mutations potentially leading to truncated gene products, including inlB, and demonstrates atypical phenotypic characteristics." *J Food Prot* **70**.

Nightingale, K., R. Ivy, A. Ho, E. Fortes, B. Njaa, R. Peters and M. Wiedmann (2008). "inlA premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains." *Appl Environ Microbiol* **74**(21): 6570-6583.

Nightingale, K., Y. Schukken, C. Nightingale, E. Fortes, A. Ho, Z. Her, Y. Grohn, P. McDonough and M. Wiedmann (2004). "Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment." *Appl Environ Microbiol* **70**(8): 4458-4467.

Nilsson, R. E., T. Ross and J. P. Bowman (2011). "Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions." *Int J Food Microbiol* **150**(1): 14-24.

Norwood, D. and A. Gilmour (2001). "The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature." *J Appl Microbiol* **33**(4): 320-324.

Nowak, J., C. D. Cruz, M. Tempelaars, T. Abee, A. H. M. van Vliet, G. C. Fletcher, D. Hedderley, J. Palmer and S. Flint (2017). "Persistent *Listeria monocytogenes* strains isolated from mussel production facilities form more biofilm but are not linked to specific genetic markers." *Int J Food Microbiol* **256**: 45-53.

O'MSBRIEN, M. (2018). "Listeriosis."

Ojeniyi, B., J. Christensen and M. Bisgaard (2000). "Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark." *Epidemiol Infect* **125**(2): 303-308.

Orsi, R. H. and M. Wiedmann (2016). "Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009." *Appl Microbiol Biotechnol* **100**(12): 5273-5287.

Orsi, R. H., H. C. den Bakker and M. Wiedmann (2011). "*Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics." *International Journal of Medical Microbiology* **301**(2): 79-96.

Orsi, R. H., M. L. Borowsky, P. Lauer, S. K. Young, C. Nusbaum, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. A. Ivy, Q. Sun, L. M. Graves, B. Swaminathan and M. Wiedmann (2008). "Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment." *BMC Genomics* **9**: 539.

Ortiz, S., V. López and J. V. Martínez-Suárez (2014). "The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." *Int J Food Microbiol* **189**: 106-112.

Ortiz, S., V. López, D. Villatoro, P. López, J. C. Dávila and J. V. Martínez-Suárez (2010). "A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant." *Foodborne Pathog Dis Foodborne Pathog Dis* **7**(10): 1177-1184.

Ortiz, S., V. López-Alonso, P. Rodríguez and J. V. Martínez-Suárez (2016). "The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis." *Appl Environ Microbiol* **82**(1): 308-317.

Ottesen, A., P. Ramachandran, E. Reed, J. R. White, N. Hasan, P. Subramanian, G. Ryan, K. Jarvis, C. Grim, N. Daquiqan, D. Hanes, M. Allard, R. Colwell, E. Brown and Y. Chen (2016). "Enrichment dynamics of *Listeria monocytogenes* and the associated microbiome from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak." *BMC Microbiol* **16**(1): 275.

Painset, A., J. T. Björkman, K. Kiil, L. Guillier, J.-F. Mariet, B. Félix, C. Amar, O. Rotariu, S. Roussel and F. Perez-Reche (2019). "LiSEQ–whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe." *Microb Genom* **5**(2).

- Parish, M. E. and D. P. Higgins (1989). "Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems." J Food Prot 52 (3): 144-147.
- Paulsen, I., M. Brown, T. Littlejohn, B. Mitchell and R. Skurray (1996). "Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **93** (8): 3630-3635.
- Petkau, A. (2017). "SNVPhyl: a single nucleotide variant phylogenomics pipeline for microbial genomic epidemiology." 3 (6): e000116.
- Petran, R. L. and E. A. Zottola (1989). "A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A." J Food Science 54 (2): 458-460
- Pfeiffer, T., S. Schuster and S. Bonhoeffer (2001). "Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways." Science 292 (5516): 504-507.
- Piercey, M. J., T. C. Ells, A. J. Macintosh and L. T. Hansen (2017). "Variations in biofilm formation, desiccation resistance and Benzalkonium chloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada." Int J Food Microbiol **257**: 254-261.
- Piffaretti, J.-C., H. Kressebuch, M. Aeschbacher, J. Bille, E. Bannerman, J. M. Musser, R. K. Selander and J. Rocourt (1989). "Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3818-3822.
- Pilchová, T., M. Hernould, H. Prévost, K. Demnerová, J. Pazlarová and O. Tresse (2014). "Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*." Food Control **35** (1): 366-372.
- Pillich, H., M. Loose, K. P. Zimmer and T. Chakraborty (2012). "Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*." Cellular microbiology **14** (6): 949-964.
- Pirie, J. H. (1927). "A new disease of veld rodents 'tiger river disease'." Publ. S. Afr. Inst. Med. Res **3** (13): 163-187.
- Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart (2018). "*Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth." Microbiol Spectr **6** (6).
- Pizarro-Cerdá, J., A. Kühbacher and P. Cossart (2012). "Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view." Cold Spring Harb Perspect Med **2** (11): a010009.

- Prencipe, V. A., V. Rizzi, V. Acciari, L. Iannetti, A. Giovannini, A. Serraino, D. Calderone, A. Rossi, D. Morelli and L. Marino (2012). "*Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain." *Food Control* **25** (1): 150-158.
- Prokop, A., E. Gouin, V. Villiers, M.-A. Nahori, R. Vincentelli, M. Duval, P. Cossart and O. Dussurget (2017). "OrfX, a nucleomodulin required for *Listeria monocytogenes* virulence." *MBio* **8** (5): e01550-01517.
- Puga, C. H., E. Dahdouh, C. SanJose and B. Orgaz (2018). "*Listeria monocytogenes* Colonizes *Pseudomonas fluorescens* Biofilms and Induces Matrix Over-Production." *Front Microbiol* **9**: 1706.
- Puga, C., C. SanJose and B. Orgaz (2014). "Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms." *Listeria monocytogenes, Food Sources, Prevalence and Management Strategies*: 115-132.
- Quereda, J. J., O. Dussurget, M.-A. Nahori, A. Ghozlane, S. Volant, M.-A. Dillies, B. Regnault, S. Kennedy, S. Mondot and B. Villoing (2016). "Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113** (20): 5706-5711.
- Radoshevich, L. and P. Cossart (2018). "*Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis." *Nat Rev Microbiol* **16** (1): 32.
- Ragimbeau, C. (2002). Caractérisation des populations de *Listeria monocytogenes* dans la filière poisson fumé: étude de la variabilité génétique et influence de la matrice sur l'expression de la virulence, Lille 1.
- Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier and S. Brisse (2008). "A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution." *PLoS Pathogens* **4**(9): e1000146.
- Rajabian, T., B. Gavicherla, M. Heisig, S. Müller-Altrock, W. Goebel, S. D. Gray-Owen and K. Ireton (2009). "The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*." *Nat Cell Biol* **11**(10): 1212.

- Ralovich, B. (1984). What is the role of food-stuffs in transportation of *Listeria*. Microbial associations and interactions in food: proceedings of the 12th International IUMS-ICFMH Symposium, Budapest, Hungary, 12-15 July, 1983/edited by I. Kiss, T. Deak, K. Incze, Dordrecht: D. Reidel, 1984.
- Rasmussen, O. F., P. Skouboe, L. Dons, L. Rossen and J. E. Olsen (1995). "*Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes." *Microbiology* **141**(9): 2053-2061.
- Reiss, H., J. Potel and A. Krebs (1951). "Granulomatosis infantiseptica eine Allgemeininfektion bei Neugeborenen und Säuglingen mit miliaren Granulomen." *Z Gesamte Inn Med* **6**(15-16): 451-457.
- Rendueles, O. and J.-M. Ghigo (2012). "Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors." *FEMS Microbiol Rev* **36**(5): 972-989.
- Rendueles, O., L. Travier, P. Latour-Lambert, T. Fontaine, J. Magnus, E. Denamur and J.-M. Ghigo (2011). "Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides." *MBio* **2** (3): e00043-00011.
- Renier, S., C. Chagnot, J. Deschamps, N. Caccia, J. Szlavik, S. A. Joyce, M. Popowska, C. Hill, S. Knöchel and R. Briandet (2014). "Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition." *Environ Microbiol* **16** (4): 1176-1192.
- Ribeiro, V. B. and M. T. Destro (2014). "*Listeria monocytogenes* serotype 1/2b and 4b isolates from human clinical cases and foods show differences in tolerance to refrigeration and salt stress." *J Food Prot* **77** (9): 1519-1526.
- Ribet, D., M. Hamon, E. Gouin, M.-A. Nahori, F. Impens, H. Neyret-Kahn, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Dejean and P. Cossart (2010). "*Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection." *Nature* **464** (7292): 1192.
- Riedel, C. U., I. R. Monk, P. G. Casey, M. S. Waidmann, C. G. Gahan and C. Hill (2009). "AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*." *Mol Microbiol* **71** (5): 1177-1189.

- Rieu, A., R. Briandet, O. Habimana, D. Garmyn, J. Guzzo and P. Piveteau (2008). "*Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains." *Appl Environ Microbiol* **74** (14): 4491-4497.
- Rieu, A., S. Weidmann, D. Garmyn, P. Piveteau and J. Guzzo (2007). "Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern." *Appl Environ Microbiol* **73** (19): 6125-6133.
- Riley, M. A. (2011). Bacteriocin-mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. *Prokaryotic antimicrobial peptides*, Springer: 13-26.
- Riley, M. A. and D. M. Gordon (1999). "The ecological role of bacteriocins in bacterial competition." *Trends Microbiol* **7** (3): 129-133.
- Rodríguez-López, P., J. Rodríguez-Herrera, D. Vázquez-Sánchez and M. Lopez Cabo (2018). "Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol." *Foods* **7** (6): 85.
- Roetterud, O. and T. Nesbakken (1991). "*Listeria monocytogenes* in the meat industry-occurrence and preventive measures." *Norsk Veterinaertidsskrift* (Norway).
- Romanova, N., P. Wolffs, L. Brovko and M. Griffiths (2006). "Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride." *Appl Environ Microbiol* **72** (5): 3498-3503.
- Romero, D., M. F. Traxler, D. López and R. Kolter (2011). "Antibiotics as signal molecules." *Chem Rev* **111** (9): 5492-5505.
- Rørvik, L. M., D. A. Caugant and M. Yndestad (1995). "Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant." *Int J Food Microbiol* **25** (1): 19-27.
- Russell, A. B., S. B. Peterson and J. D. Mougous (2014). "Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose." *Nat Rev Microbiol* **12**(2): 137.
- Ryser, E. T. and E. H. Marth (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*, CRC press.

- Salama, P. J., P. K. B. Embarek, J. Bagaria and I. S. Fall (2018). "Learning from listeria: safer food for all." *The Lancet* **391** (10137): 2305-2306.
- Samba-Louaka, A., J. M. Pereira, M.-A. Nahori, V. Villiers, L. Deriano, M. A. Hamon and P. Cossart (2014). "*Listeria monocytogenes* dampens the DNA damage response." *PLoS pathogens* **10**(10): e1004470.
- Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M.-A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones and P. M. Griffin (2011). "Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens." *Emerg Infect Dis* **17**(1): 7.
- Schäfer, D. F., J. Steffens, J. Barbosa, J. Zeni, N. Paroul, E. Valduga, A. Junges, G. T. Backes and R. L. Cansian (2017). "Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse." *LWT* **86**: 393-398.
- Schlech III, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King and E. S. Nicholls (1983). "Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food." *N Engl J Med Overseas Ed* **308**(4): 203-206.
- Schluter, J., C. D. Nadell, B. L. Bassler and K. R. Foster (2015). "Adhesion as a weapon in microbial competition." *The ISME journal* **9** (1): 139.
- Schmid, B., J. Klumpp, E. Raimann, M. J. Loessner, R. Stephan and T. Tasara (2009). "Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions." *Appl Environ Microbiol* **75** (6): 1621-1627.
- Scholz, R. L. and E. P. Greenberg (2015). "Sociality in *Escherichia coli*: enterochelin is a private good at low cell density and can be shared at high cell density." *J Bacteriol* **197**(13): 2122-2128.
- Schuster, M., D. Joseph Sexton, S. P. Diggle and E. Peter Greenberg (2013). "Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application." *Annu Rev Microbiol* **67**: 43-63.
- Seeliger, H. (1988). "Listeriosis—history and actual developments." *Infection* **16**(2): S80-S84.
- Seeliger, H. and K. Höhne (1979). Chapter II serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods in microbiology*, Elsevier. **13**: 31-49.

Sela, S., S. Frank, E. Belausov and R. Pinto (2006). "A Mutation in the luxS gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation." *Appl Environ Microbiol* **72**(8): 5653-5658.

SELOSSE Marc-André, J. J. (2019)). "Symbiose et parasitisme." *Symbiose et parasitisme*.

Senczek, D., R. Stephan and F. Untermann (2000). "Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period." *Int J Food Microbiol* **62** (1-2): 155-159.

Shahamat, M., A. Seaman and M. Woodbine (1980). "Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations." *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* **246** (4): 506-511.

Simoes, M., L. C. Simões and M. J. Vieira (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies." *LWT-food Sci Technol* **43**(4): 573-583.

Stasiewicz, M. J., H. F. Oliver, M. Wiedmann and H. C. den Bakker (2015). "Whole-Genome Sequencing Allows for Improved Identification of Persistent *Listeria monocytogenes* in Food-Associated Environments." *Appl Environ Microbiol* **81**(17): 6024-6037.

Stepanovic, S., I. Cirkovic, L. Ranin and M. Svabic-Vlahovic (2004). "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface." *Lett Appl Microbiol* **38**(5): 428-432.

Stoller, A., M. J. Stevens, R. Stephan and C. Guldimann (2019). "Characteristics of *Listeria monocytogenes* Strains Persisting in a Meat Processing Facility over a 4-Year Period." *Pathogens* **8**(1): 32.

Strawn, L. (2014). "Ecology And Epidemiology Of *Salmonella* And *Listeria monocytogenes* In New York State Produce Production Environments."

Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter and R. V. Tauxe (2001). "PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States." *Emerg Infect Dis* **7**.

Tabata, A., H. Nagamune, T. Maeda, K. Murakami, Y. Miyake and H. Kourai (2003). "Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**(7): 2093-2099.

Takahashi, H., S. Miya, K. Igarashi, T. Suda, S. Kuramoto and B. Kimura (2009). "Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood." J Food Prot **72**(7): 1476-1480.

Tamburro, M., G. Ripabelli, M. Vitullo, T. J. Dallman, M. Pontello, C. F. L. Amar and M. L. Sammarco (2015). "Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride." Comparative immunology, microbiology and infectious diseases **40**: 31-39.

Tasara, T. and R. Stephan (2006). "Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications." J Food Prot **69** (6): 1473-1484.

Tezel, U. and S. G. Pavlostathis (2015). "Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology." Current opinion in biotechnology **33**: 296-304.

Thévenot, D., A. Dernburg and C. Vernozy-Rozand (2006). "An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products." J Appl Microbiol **101** (1): 7-17.

Thevenot, D., M. Delignette-Muller, S. Christieans and C. Vernozy-Rozand (2005). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products." Int J Food Microbiol **102** (1): 85-94.

Thomas, M. K., R. Murray, L. Flockhart, K. Pintar, A. Fazil, A. Nesbitt, B. Marshall, J. Tataryn and F. Pollari (2015). "Estimates of foodborne illness-related hospitalizations and deaths in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents." Foodborne Pathog Dis Foodborne Pathog Dis **12** (10): 820-827.

To, M. S., S. Favrin, N. Romanova and M. W. Griffiths (2002). "Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **68** (11): 5258-5264.

Tolker-Nielsen, T. and C. Sternberg (2014). "Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy." Methods Mol Biol **1149**: 615-629.

Tompkin, R. (2002). "Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment." J Food Prot **65** (4): 709-725.

Valle, J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert and J.-M. Ghigo (2006). "Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (33): 12558-12563.

Van den Elzen, A. and J. Snijders (1993). "Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*." *Vet Q* **15** (4): 143-145.

Van Der Veen, S., T. Abee, W. M. De Vos and M. H. Wells-Bennik (2009). "Genome-wide screen for *Listeria monocytogenes* genes important for growth at high temperatures." *FEMS Microbiol Lett* **295** (2): 195-203.

van der Veen, S., T. Hain, J. A. Wouters, H. Hossain, W. M. de Vos, T. Abee, T. Chakraborty and M. H. Wells-Bennik (2007). "The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response." *Microbiology* **153**(10): 3593-3607.

Van Stelten, A. and K. Nightingale (2008). "Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene *inlA*." *Appl Environ Microbiol* **74** (23): 7365-7375.

Van Stelten, A., A. Roberts, C. Manuel and K. Nightingale (2016). "*Listeria monocytogenes* isolates carrying virulence-attenuating mutations in internalin A are commonly isolated from ready-to-eat food processing plant and retail environments." *J Food Prot* **79** (10): 1733-1740.

Van Stelten, A., J. Simpson, T. Ward and K. Nightingale (2010). "Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases." *Appl Environ Microbiol* **76** (9): 2783-2790.

Van Stelten, A., J. Simpson, Y. Chen, V. Scott, R. Whiting, W. Ross and K. Nightingale (2011). "Significant shift in median guinea pig infectious dose shown by an outbreak-associated *Listeria monocytogenes* epidemic clone strain and a strain carrying a premature stop codon mutation in *inlA*." *Appl Environ Microbiol* **77** (7): 2479-2487.

Vazquez-Boland, J. A., E. Kryptou and M. Scortti (2017). "*Listeria* Placental Infection." *MBio* **8** (3).

Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland and J. Kreft (2001). "*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants." *Clin Microbiol Rev* **14** (3): 584-640.

Veerachamy, S., T. Yarlagadda, G. Manivasagam and P. K. Yarlagadda (2014). "Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review." *Proc Inst Mech Eng H* **228** (10): 1083-1099.

Vendeville, A., K. Winzer, K. Heurlier, C. M. Tang and K. R. Hardie (2005). "Making'sense'of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria." *Nat Rev Microbiol***3**(5): 383.

Verghese, B., M. Lok, J. Wen, V. Alessandria, Y. Chen, S. Kathariou and S. Knabel (2011). "comK prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence." *Appl Environ Microbiol***77**(10): 3279-3292.

Vines, A., M. Reeves, S. Hunter and B. Swaminathan (1992). "Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*." *Res Microbiol* **143**(3): 281-294.

Vogel, B. F., H. H. Huss, B. Ojeniyi, P. Ahrens and 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** (6): 2586-2595.

Vogel, B. F., L. V. Jørgensen, B. Ojeniyi, H. H. Huss and L. Gram (2001). "Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by random amplified polymorphic DNA analyses." *Int J Food Microbiol* **65** (1-2): 83-92.

Vulić, M. and R. Kolter (2001). "Evolutionary cheating in *Escherichia coli* stationary phase cultures." *Genetics* **158** (2): 519-526.

Wang, G., W. Qian, X. Zhang, H. Wang, K. Ye, Y. Bai and G. Zhou (2015). "Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China." *Food Control* **50**: 202-208.

- Wang, J., A. J. Ray, S. R. Hammons and H. F. Oliver (2015). "Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have inlA premature stop codons." *Foodborne Pathog Dis* **12** (2): 151-158.
- Ward, T. J., T. F. Ducey, T. Usgaard, K. A. Dunn and J. P. Bielawski (2008). "Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates." *Appl Environ Microbiol* **74** (24): 7629-7642.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., A. K. Karatzas, J. A. Wouters and T. Abee (2002). "Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure." *Appl Environ Microbiol* **68** (2): 456-463.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas and J. S. Mattick (2002). "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." *Science* **295** (5559): 1487-1487.
- Wirtanen, G. and S. Salo (2003). "Disinfection in food processing—efficacy testing of disinfectants." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **2** (2-4): 293-306.
- Wuenschel, M. D., S. Köhler, A. Bubert, U. Gerike and W. Goebel (1993). "The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity." *J Bacteriol* **175** (11): 3491-3501.
- Wulff, G., L. Gram, P. Ahrens and B. F. Vogel (2006). "One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter-and smokehouses." *Appl Environ Microbiol* **72** (6): 4313-4322.
- Xu, D., Y. Li, M. Shamim Hasan Zahid, S. Yamasaki, L. Shi, J.-r. Li and H. Yan (2014). "Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods." *Int J Food Microbiol* **190**: 24-30.
- Yang, B., Y. Wang and P.-Y. Qian (2016). "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis." *BMC bioinformatics* **17** (1): 135.
- Yang, L., K. B. Barken, M. E. Skindersoe, A. B. Christensen, M. Givskov and T. Tolker-Nielsen (2007). "Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*." *Microbiology* **153** (5): 1318-1328.

- Zameer, F., S. Gopal, G. Krohne and J. Kreft (2010). "Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EGD-e." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26** (6): 1143-1147.
- Zelezniak, A., S. Andrejev, O. Ponomarova, D. R. Mende, P. Bork and K. R. Patil (2015). "Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112** (20): 6449-6454.
- Zetzmann, M., M. Okshevsky, J. Endres, A. Sedlag, N. Caccia, M. Auchter, M. S. Waidmann, M. Desvaux, R. L. Meyer and C. U. Riedel (2015). "DNase-sensitive and-resistant modes of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*." *Front Microbiol* **6**.
- Zhou, Q., X. Feng, Q. Zhang, F. Feng, X. Yin, J. Shang, H. Qu and Q. Luo (2012). "Carbon catabolite control is important for *Listeria monocytogenes* biofilm formation in response to nutrient availability." *Curr Microbiol* **65** (1): 35-43.

VIII. Annexes

Annexe 1: Matériel supplémentaire: Article I

Supplementary Table S1. Sampling of slaughterhouses in Quebec, Canada, for the isolation of *Listeria monocytogenes*.

Operation areas and specific sites, machines and materials	Number of samples per visit, per slaughterhouse ¹	In regular contact with animal carcasses and meat	Category ²	Subjected to in-site cleaning and sanitation (with QAC ³)
Lairage				
Concrete slab of the Main entrance to the slaughterhouse (5 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe)	1	No	Environment	NA ⁴
Pen (n=1) for sick animals (1 pen; 5 samples; 1m ² each)	5	No	Environment	NA
Pens (n=9) for normal animals (9 pens; 5 samples per pen; 1m ² each)	45	No	Environment	NA
Hallway (5 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe) - Floor (1m ²) - Wall (1m ²)	1 1	No	Environment	NA
Slaughtering and bleeding And dehairing				
Floor (1m ²)	6	No	Environment	NA

Wall (3 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe)	2	No	Environment	NA
Ceiling (3 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe)	1	No	Environment	NA
Bleeding equipment (knife and sharpener)	1	Yes	Material	NA
Tables (3 tables 1m ² each with the same lab wipe)	3	Yes	Material	NA
Scalding tank (5 surfaces 1m ² each with the same lab wipe)	1	Yes	Machine	NA
Dehairing machine (5 surfaces 1m ² each with the same lab wipe)	2	Yes	Machine	NA
Brushing machine (5 surfaces 1m ² each with the same lab wipe)	2	Yes	Machine	NA
Evisceration				
Floor (1m ²)	6	No	Environment	High ⁵
Wall (3 surfaces 1m ² each, with the same lab wipe)	2	No	Environment	High
Ceiling (3 surfaces, 1m ² each, with the same lab wipe)	1	No	Environment	Low ⁶
Clipping machine	1	SC	Machine	Low
Sternal splitter	1	SC	Machine	Low
Visceral container	3	SC	Material	Low
Back splitter	1	SC	Machine	Low

Degreasing knife	1	SC	Machine	Low
Knives	1	SC	Material	Low
Gloves	1	SC	Material	Low
Sharpener	1	SC	Material	Low
Apron	1	SC	Material	Low
Hooks (10 hooks with the same lab wipe)	3	SC	Material	Low
Chilling and hanging				
Door (1m ²)	2	No	Environment	High
Floor (1m ²)	3	No	Environment	High
Wall (1m ²)	3	No	Environment	High
Cutting and deboning				
Floor (1m ²)	5	No	Environment	High
Wall (3 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe)	2	No	Environment	High
Ceiling (3 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe)	1	No	Environment	Low
Post	2	No	Environment	High
Fan	2	No	Environment	Low
Door (1m ²)	2	No	Environment	High
Conveyor belt 1 (top and bottom sides)	6	SC	Environment	High

Conveyor belt 2 (top and bottom sides)	6	SC	Environment	High
Conveyor belt 3 (top and bottom sides)	6	SC	Environment	High
Conveyor belt 4 (top and bottom sides)	6	SC	Environment	High
Conveyor belt 5 (top and bottom sides)	6	SC	Environment	High
Saws	1	SC	Machine	Low
Knives (3 knives per sample; total 9 knives: 3 samples)	3	SC	Material	Low
Sharpeners (3 sharpeners per sample; total 9 sharpeners: 3 samples)	3	SC	Material	Low
Shelves (3 surfaces X 1m ² each, with the same lab wipe)	3	SC	Material	Low

¹ This is the number of samples collected during one visit, per slaughterhouse. There was a total of four visits in four different slaughterhouses.

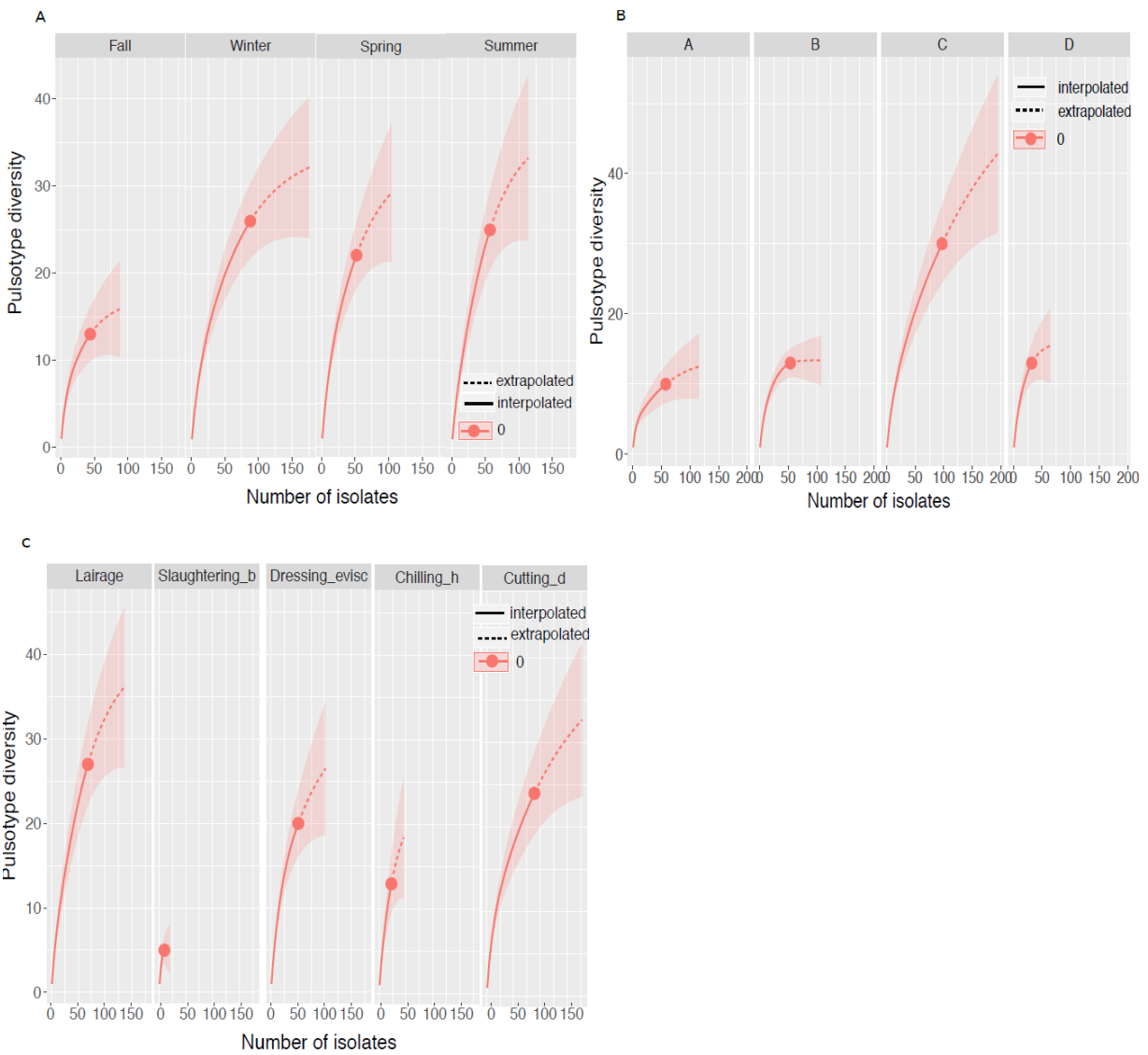
² Specific sampled sites, machines and materials were grouped into three categories, Environment, Material or Machine, for statistical analysis

³ QAC: Quaternary ammonium compounds

⁴ NA: Not applicable: QAC were not used in these operation areas

⁵ High: surfaces which are more exposed to QAC

⁶ Low: surfaces which are weakly exposed to QAC



Supplementary Figure 2: Strain diversity of *L. monocytogenes* isolated from four pork slaughterhouses at sixteen visits over one year. A strains diversity according to the seasons. B) Strain diversity according to the slaughterhouses (A, B, C, D). C) Strain diversity according to the sectors in the slaughterhouse

Annexe 2 : Matériel supplémentaire : Article III

Le matériel supplémentaire de cet article est disponible en ligne :

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00864/full#supplementary-material>

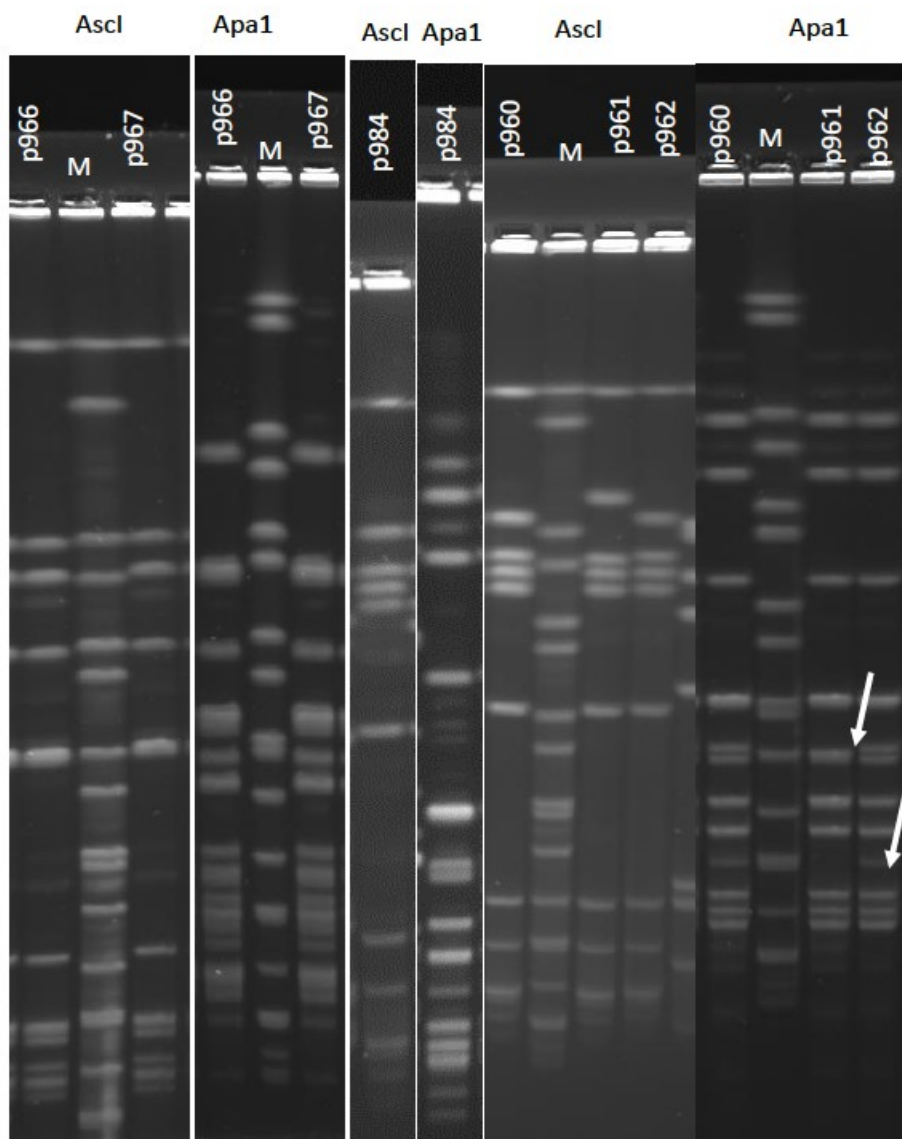
Video S1. Time lapse phase-contrast microscopy was performed across 24 h with 16 frames per seconds to show *Listeria monocytogenes* biofilm grown under BHI medium in microfluidic system. The video shows filaments detached from the chamber surface under the flow effect.

Video S2. Time lapse phase-contrast microscopy was performed across 24 h with 16 frames per seconds to show *Listeria monocytogenes* biofilm grown under BHI (the top section) and BHI/10 (The bottom section).

Video S3. Time lapse phase-contrast microscopy was performed across 18 h with 16 frames per seconds to show *Listeria monocytogenes* biofilm grown under BHI (in the top section) and BHI/10 (in the bottom section) supplemented with DNase I at the final concentration of 100 µg/ml.

Video S4. Time lapse phase-contrast microscopy was performed across 18 h with 16 frames per seconds to show *Listeria monocytogenes* biofilm grown under BHI/10 without DNase I treatment (in the top section) and BHI/10 (in the bottom section) supplemented with DNase I at the final concentration of 100 µg/ml.

Annexe 3: Matériel supplémentaire: Article III



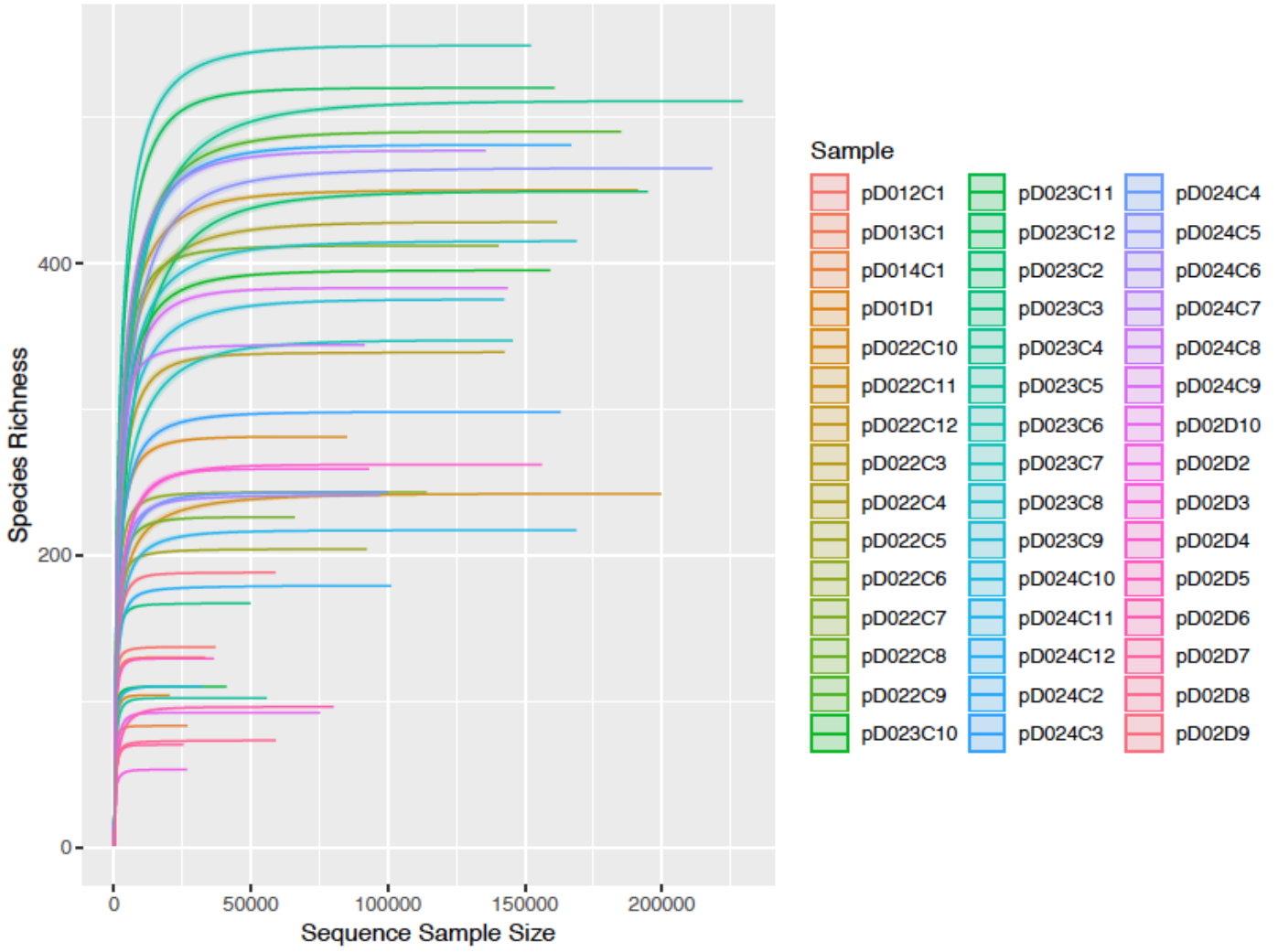
Supplementary Figure S1: Pulsed field gel electrophoresis profile of AsclI and ApaI restriction enzymes in *L. 20 monocytogenes* strains isolated from a slaughterhouse over a four weeks period.

Annexe 4: Matériel supplémentaire: Article IV

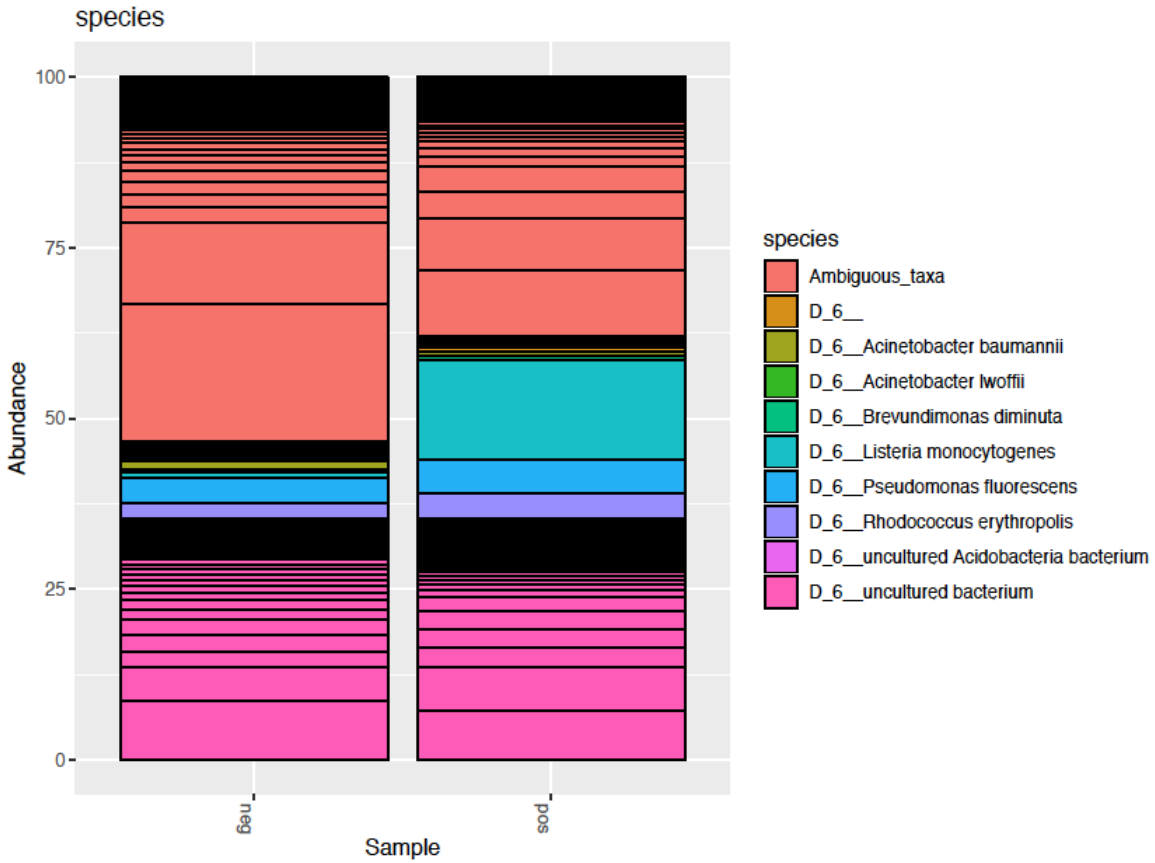
Supplementary table S1: Total number of samples collected and subjected to 16s sequencing from five conveyor surfaces in one pig slaughterhouse. Table shows total number of sequences, samples positive to *Listeria monocytogenes* and samples collected at each period.

SampleType	Number of sequences	PositiveToLmonocytogenes	sampling-period
pD01D1	20287	pos	sp1
pD02D10	75244	neg	sp1
pD02D2	26685	pos	sp1
pD02D3	93005	neg	sp1
pD02D4	156164	neg	sp1
pD02D5	36472	neg	sp1
pD02D6	80139	neg	sp1
pD02D7	25377	pos	sp1
pD02D8	59060	pos	sp1
pD02D9	58919	pos	sp1
pD012C1	36961	neg	sp2
pD022C10	84982	pos	sp2
pD022C11	199760	pos	sp2
pD022C12	191279	neg	sp2
pD022C3	142530	neg	sp2
pD022C4	161632	neg	sp2
pD022C5	92221	neg	sp2
pD022C6	114060	pos	sp2
pD022C7	140320	pos	sp2
pD022C8	65939	neg	sp2
pD022C9	184978	pos	sp2
pD013C1	33304	neg	sp3
pD023C10	159193	neg	sp3
pD023C11	41033	neg	sp3
pD023C12	160832	neg	sp3
pD023C2	194901	neg	sp3
pD023C3	49835	neg	sp3
pD023C4	229410	neg	sp3
pD023C5	55725	neg	sp3
pD023C6	152166	neg	sp3

pD023C7	145555	pos	sp3
pD023C8	168825	neg	sp3
pD023C9	142398	neg	sp3
pD014C1	26802	neg	sp4
pD024C10	32345	neg	sp4
pD024C11	168720	neg	sp4
pD024C12	101073	neg	sp4
pD024C2	166913	neg	sp4
pD024C3	163044	neg	sp4
pD024C4	99944	neg	sp4
pD024C5	218301	neg	sp4
pD024C6	96811	neg	sp4
pD024C7	135563	neg	sp4
pD024C8	91433	neg	sp4
pD024C9	143662	pos	sp4
control	19472	na	na



Supplementary figure S1: Rarefaction curve of OUTs in all samples collected from meat conveyor surfaces



Supplementary Figure 2: Relative frequency of different taxonomic profiles at species level (D₆; according to the silva database) identified from cutting-facility conveyors surfaces according to positive samples to *Listeria monocytogenes* culture-based method. The dark colour in the barplot represents the low abundances species.

Annexe 5: Article V

Characterisation of *InlA* truncation in *Listeria monocytogenes* isolates from farm animals and human cases in the province of Quebec.

Fravalo P*¹, Cherifi T¹, Neira K¹, Letellier A¹, Fairbrother J H², Bekal S³

1 Research Chair in Meat Safety, Veterinary Medicine Faculty, University of Montreal, Saint Hyacinthe Qc, Canada; 2 Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; 3 Provincial public health laboratory (LSPQ), Quebec, QC, Canada.

Article publié dans le journal of veterinary record, doi:10.1136/ vetreco-2016-000199

Contribution du candidat à la conception de l'article : J'ai participé activement au design à la réalisation des expérimentations et à l'interprétation des résultats.

Abstract:

The introduction of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) into the food production chain is a concern, with numerous grouped cases of listeriosis associated with milk or pork derived products have been documented. Management of this zoonotic pathogen considers all strains as an equal risk. Recently a new perspective for characterisation of strain virulence was introduced with the discovery of the unaltered sequence of *InlA* as a determinant of strain virulence; this has also been reported as an infrequent finding among so-called environmental strains, i.e. strains isolated from food or from surfaces in food industries. The aim of this study was to differentiate *L. monocytogenes* strains isolated from animal cases versus those from human cases, and to differentiate clinical strains from environmental ones using a *Caenorhabditis elegans* virulence testing model. In Quebec in 2013/2014, the surveillance of *L. monocytogenes* clinical isolates registered a total of 20 strains of animal origin and 16 PFGE-types isolated from human cases. The mixed PCR multiplex agglutination protocol used for genosertotyping clearly discriminated genogroup IVB strains from bovine and human origin. The presence of a premature stop codon SNP in the *inlA* gene sequence in clinical strains and the identical behavior of particular strains in the *C. elegans* model are discussed in this paper from the perspective of industrial management of *L. monocytogenes* risk.

Introduction:

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) is a great concern both for industrial and public health stakeholders. These bacteria cause listeriosis, a foodborne disease acquired through the consumption of contaminated ready-to-eat products, including milk or meat products. Pork meat has been associated with large scale outbreaks in the past (15) and is considered a risk factor, particularly for sensitive populations such as pregnant women, children, and the elderly. In the last few years, the increase in human cases (not associated with intensified surveillance), mainly for the elderly, has increased the concern surrounding management of *L. monocytogenes* in food in Canada and Europe (13). One critical question to answer is whether the virulence of *L. monocytogenes* has increased. The determinants of virulence have been studied and there is a large amount of data that allow for discrimination of strains from lineages III or IV from lineages I and II (3). Lineages I and II are considered to be the most worrisome because of their potential to cause outbreaks or sporadic listeriosis. Among such strains, discrimination based on pathogenic properties still represents a challenge. A few years ago, the very promising concept of virulence determination through *inlA* gene sequencing was introduced (5-6). Published studies revealed the presence of a premature stop codon for internalin A translation. Because this stop codon inactivated this determinant of the first step of pathogenicity in the digestive tract, a key determinant for virulence differentiation of strains appeared to have been discovered. In Quebec, human listeriosis surveillance works hand-in-hand with food surveillance. Few strains isolated from clinical cases in farms (animal primary productions) are available, so we took the opportunity that arose to test virulent strains isolated from animals or humans with clinical signs of listeriosis. After we performed the serovar determination and comparison according to strain origin, we wanted to confirm if the *inlA* sequences were complete in these strains and to test their behaviour in a *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) infection model, a very attractive but controversial model of pathogenicity testing for *L. monocytogenes* (11,12) (see discussion). No relationship between InlA integrity and behavior of a *L. monocytogenes* strain in *C. elegans* has actually been described. Some strains isolated during a previous study involving swine primary production (1) were added to the study's strain collection because only some of them showed stop codon in their *inlA* sequences and because these strains were (based on pulstotype comparison) frequently or not associated with clinical human cases. These

additional strains were expected to show opposite virulence potentials. The aim of this study was to analyse *inlA* sequences from strains isolated from clinical forms of human or animal listerioses in Quebec and to compare the behaviour of some selected strains in a *Caenorhabditis elegans* virulence model.

Materials and methods:

Strain collections: Strains were collected from *L. monocytogenes* surveillance in 2013/2014: 20 strains were obtained from animal disease surveillance (laboratory of the MAPAQ – Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Quebec), among which 13 were included in this study because they satisfied the required “clinical” criteria (i.e. isolated from organs after animal necropsy, excluding isolation from milk and silage); and 16 strains isolated from clinical cases in humans were provided by the LSPQ (public health surveillance). The collection was completed with 4 strains of swine origin isolated in a previous project (1). These strains showed a SNP-premature stop codon in the *inlA* sequence (Pulso1 and Pulso9 strains) or an integrated *inlA* sequence (Pulso4 and Pulso6 strains). Strains Pulso6 and Pulso9 showed 100% similarity between PFGE banding patterns (with strains recovered from clinical human cases; strains Pulso1 and Pulso4 have not previously been identified in clinical human surveillance). These added strains were expected to show opposite virulence potentials.

Serotyping: *L. monocytogenes* strains were serotyped based on a combination of multiplex PCR based geno-serogrouping, completed by detection of *flaA* (2) and agglutination against discriminatory O serum (OI, OVII, OVIII, Oxoid Thermofisher, Nepean, Ontario, Canada) (16).

***InlA* sequencing:** The *inlA* gene sequences were determined after overlapping amplification (3) using the Sanger method at the Centre d’Innovation Génome Québec (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer). *InlA* gene sequencing was extensively analysed and the occurrence and position of SNP before in silico translation of the sequences were compared. Sequences were aligned and screened for mutations causing a premature stop codon or amino acid deletion using ClustalX 2.1 software, with *inlA* *Listeria monocytogenes* EGD-e (NCBI: NC_003210.1) as reference.

***C. elegans* virulence model:** Bacterial strains (Figure 2) were cultured 24h at 37°C in BHI, acid shocked (0.1N HCl pH 4.5, one hour) then washed and suspended in PBS (concentration, see Figure 2) before being used in trials. Strain N2 worms, maintained for 5 days on Nematode Growing Medium plates and inoculated with *E. coli* OP50 feeding strain at 25°C, were harvested (non-synchronised culture), washed 3 times in PBS, then inoculated in 96 well plates in PBS and maintained for 5 more days at 30°C with daily addition of fresh bacteria.

Observation of worm viability (based on worm locomotion and/or pharyngeal pumping and assessed under an inverted phase contrast microscope according to Thomsen et al.) (12) allowed determination of a living worm count of 15 mature worms and 30 L1/L2 larvae in each of the tested conditions. The distribution of number of living worms counts (n=8) were compared to control conditions (Mann and Whitney test, SPSS Statistics v 17, Licenced U de Montreal, $\alpha=0.05$)

Results:

All 16 of the strains of human origin were considered clinical because they were isolated from hospitalized patients. From the 20 strains provided by MAPAQ, only 13 strains strictly associated with clinical listeriosis in animals were included. It should be noted that we excluded strains isolated from milk tanks and silage, all belonging to the 1/2a serovar. While serotyping revealed that the greater proportion of clinical strains (regardless of origin) belonged to the serovar 1/2a (18/29, 62%), there were still some strains (9 out of 29 with similar proportions from humans and animals, i.e. 5/16 and 4/13, respectively) that belonged to the IVB serogroup (a serogroup that contains 4b and 4a/ab serovars). Focusing on this IVB group, a clear distinction appeared where only 4b serovar strains were found in human surveillance while strains shown in ruminant clinical cases all belonged to 4a/4ab serovars (Table presented in Figure 1). No SNP occurred on the sequence coding for the InlA LPXTG domain. Moreover, *inlA* sequencing showed that a majority of strains had a complete sequence (table presented in Figure 1). But it should be noted that 2 out of the 16 strains isolated from clinical listeriosis cases had a premature stop codon; the mutations were expected to induce truncations of InlA at 700 and 762 aa positions, respectively. One of these – which showed the longest InlA size but lost LPXTG domain – was used in the *C. elegans* virulence model, as well as another strain presenting a

complete sequence (tables presented in Figure 1 and 2). Four more strains (different PFGE type) from porcine origin were added: some had been recurrently detected in production (and food) but had never been associated with human cases (table presented in Figure 2; Pulso1 and Pulso4 strains). The two others were kept because of their 100% homology with strains involved in clinical human cases (sporadically for strain Pulso 9 or recurrently for strain Pulso 6; table presented in Figure 2). After 5 days, unfed *C. elegans* worms were almost all dead. Using *E. coli* OP 50 as a control, viability was maintained at 74% after 5 days, both in larvae and in mature worm forms. By comparison, *L. monocytogenes* lowered the viability of the worms and significantly so for the larvae forms (Mann-Whitney, $p < 0.05$). No differences in virulence behavior were revealed using this model to compare the *L. monocytogenes* strains (Figure 3 and Figure 4). The strain that was expected to be the least virulent (Pulso1) showed the largest decrease in value for worm viability for both forms (50% and 55% respectively for larvae and mature worms) (table presented in Figure 2).

Discussion:

L. monocytogenes virulence determination is a current research concern and many authors have contributed to the advancement of this endeavour. A quite recent proposition (relevant when considering the capital role of InlA in pathogenicity) is that the truncation of InlA, induced by the presence of a premature stop codon in *inlA*, is associated with lower virulence properties (4). Moreover, a great proportion of truncated forms were shown in strains isolated from food or food-related environments but not in *L. monocytogenes* strains involved in clinical human cases (5). Discussion of the relevance of this virulence determinant arose when it was demonstrated that some truncated forms can express virulence in animal models (6, 7). Our analyses confirm that truncated forms can be found in clinical human cases in Quebec. The truncation positions, induced by SNP-stop codon, (700 and 762 aa) were previously reported (14). For the 700aa truncation position, the entire anchorage region (between 700 and 800 aa), including the determinant Proline in the LPXTG motif, was not translated. So, at least for the strain harboring the 700aa truncated InlA, pathogenicity was expected to be extremely low. The clinical origin of such strains led us to question the dose of ingested inoculum. In studies that demonstrated, in experimental conditions, a maintenance of virulence for strains harboring truncated InlA, high

doses of inoculum were used (6, 7). High dose ingestion of *L. monocytogenes* could be observed in outbreaks, giving an opportunity for a strain harboring *InlA* truncated form to cause disease. We suggest that *inlA* analysis alone is not sufficient to characterise the virulence potential of *L. monocytogenes* strains.

Looking for a complementary test that avoids labor intensive and ethically-questioned experimentations on mammal models, we considered the *C. elegans* model for comparing the virulence of our characterised strains. The *C. elegans* model was first proposed in 2006 and confirmed in 2007 (8; 12) when studies showed that the worm is as sensitive to pathogenic *Listeria monocytogenes* as humans. But Guha and others questioned the model in 2013 (9) after failing to obtain loss of viability of worms inoculated by *L. monocytogenes*. That same year, Neuhaus *et al.* (10) confirmed that primed strains (acid shocked) increase the lethality to the worms and ultimately confirmed the worm model as able to compare virulence for food derived strains (11). Our results, when incubating worms at 30°C with acid shocked *L. monocytogenes* (to promote *prfA* driven virulence factors in the pathogen), confirmed a decrease of viability of worms in contact with *L. monocytogenes* (in a lesser proportion than *Salmonella* Typhimurium). Contrary to the work of Karthikeyan *et al.* (11), the worms didn't show any morphological changes when they were submitted to our *L. monocytogenes* strain inoculations. The loss of viability was solely based on immobility and loss of pharyngeal pumping activity, in accordance with Neuhaus *et al.* (10). In our conditions, on both the mature form and the young larvae, *L. monocytogenes* showed differences in virulence regardless of origin (environmental or clinical) and in their *inlA* integrity.

Conclusion:

Using complete serotyping, differences in IVB geno-serogroup between clinical strains from bovine and human origins were shown, with serovar 4b found only in human clinical case strains. The virulence analysis tools used in this study (*ilnA* sequencing and *C. elegans* model) on both confirmed virulent and presumed less virulent strains could not univocally established the public health risk associated with *L. monocytogenes* strains. No swine clinical case strains were provided by the MAPAQ laboratory, but serovar 4b strains were previously found in the

collection of strains from healthy pigs in primary production (1). As calls for farm to fork strain traceability continue to be made, accurate surveillance is needed to enlarge the collection of strains in animal surveillance, particularly from swine production. It should be mentioned that we did receive all the collected *L. monocytogenes* strains isolated in the MAPAQ laboratory and we observed that they mainly originated from bovine clinical surveillance (where *L. monocytogenes* presents economical relevance).

Acknowledgment:

C. elegans were kindly provided by *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455 USA. This work was financially supported by CDEVQ.

References:

- Larivière-Gauthier G, Letellier A, Kérouanton A, Bekal S, Quessy S, Fournaise S, Fravallo P.. Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec. J Food Prot. 2014 Dec;77(12):2121-8.
- Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A.. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. J Microbiol Methods. 2010 Feb;80(2):134-7
- Ragon, M., Wirth T., Hollandt F., Lavenir R., Lecuit M., Le Monnier A., Brisse S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. 2008. PLoS Pathog. 9: e1000146.
- Nightingale KK, Ivy RA, Ho AJ, Fortes ED, Njaa BL, Peters RM, Wiedmann M. inlA premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. Appl Environ Microbiol. 2008 Nov;74(21):6570-83.
- Van Stelten A, Simpson JM, Ward TJ, Nightingale KK.. Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in inlA are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. Appl Environ Microbiol. 2010 May;76(9):2783-90.
- Van Stelten A, Simpson JM, Chen Y, Scott VN, Whiting RC, Ross WH, Nightingale KK.. Significant shift in median guinea pig infectious dose shown by an outbreak-associated *Listeria monocytogenes* epidemic clone strain and a strain carrying a premature stop codon mutation in inlA. Appl Environ Microbiol. 2011 Apr;77(7):2479-87.
- Holch A, Ingmer H, Licht TR, Gram L. *Listeria monocytogenes* strains encoding premature stop codons in inlA invade mice and guinea pig fetuses in orally dosed dams. J Med Microbiol. 2013 Dec;62(Pt 12):1799-806.
- Forrester S, Milillo SR, Hoose WA, Wiedmann M, Schwab U. Evaluation of the pathogenicity of *Listeria spp.* in *Caenorhabditis elegans*. Foodborne Pathog Dis. 2007 Spring;4(1):67-73.
- Guha S, Klees M, Wang X, Li J, Dong Y, Cao M.. Influence of planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* on *Caenorhabditis elegans*. Arch Microbiol. 2013 Jan;195(1):19-26. doi: 10.1007/s00203-012-0841-y. Epub 2012 Sep 9.

Neuhaus K, Satorhelyi P, Schauer K, Scherer S, Fuchs TM. Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces prfA, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. BMC Genomics. 2013 Apr 27;14:285

Karthikeyan R, Gunasekaran P, Rajendhran J. Molecular Serotyping and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk and Milk Products in Tamil Nadu, India. Foodborne Pathog Dis. 2015 Jun;12(6):522-8.

Thomsen LE, Slutz SS, Tan MW, Ingmer H.. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2006 Feb;72(2):1700-1.

Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. Infect Genet Evol. 2015 Oct;35:172-83. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.008. Epub 2015 Aug 5. Review.

14- Kovacevic J, Arguedas-Villa C, Wozniak A, Tasara T, Allen KJ. 2013. Examination of food chain-derived *Listeria monocytogenes* strains of different serotypes reveals considerable diversity in inlA genotypes, mutability, and adaptation to cold temperatures. Appl Environ Microbiol 79:1915–1922.

de Valk H, Vaillant V, Jacquet C, Rocourt J, Le Querrec F, Stainer F, Quelquejeu N, Pierre O, Pierre V, Desenclos JC, Goulet V. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999-February 2000.. Am J Epidemiol. 2001 Nov 15;154(10):944-50.

Burall LS, Simpson AC, Datta AR. Evaluation of a serotyping scheme using a combination of an antibody-based serogrouping method and a multiplex PCR assay for identifying the major serotypes of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 2011;74(3):403-9.

Figure 1. Characterisation of *L. monocytogenes* strains of clinical origin.

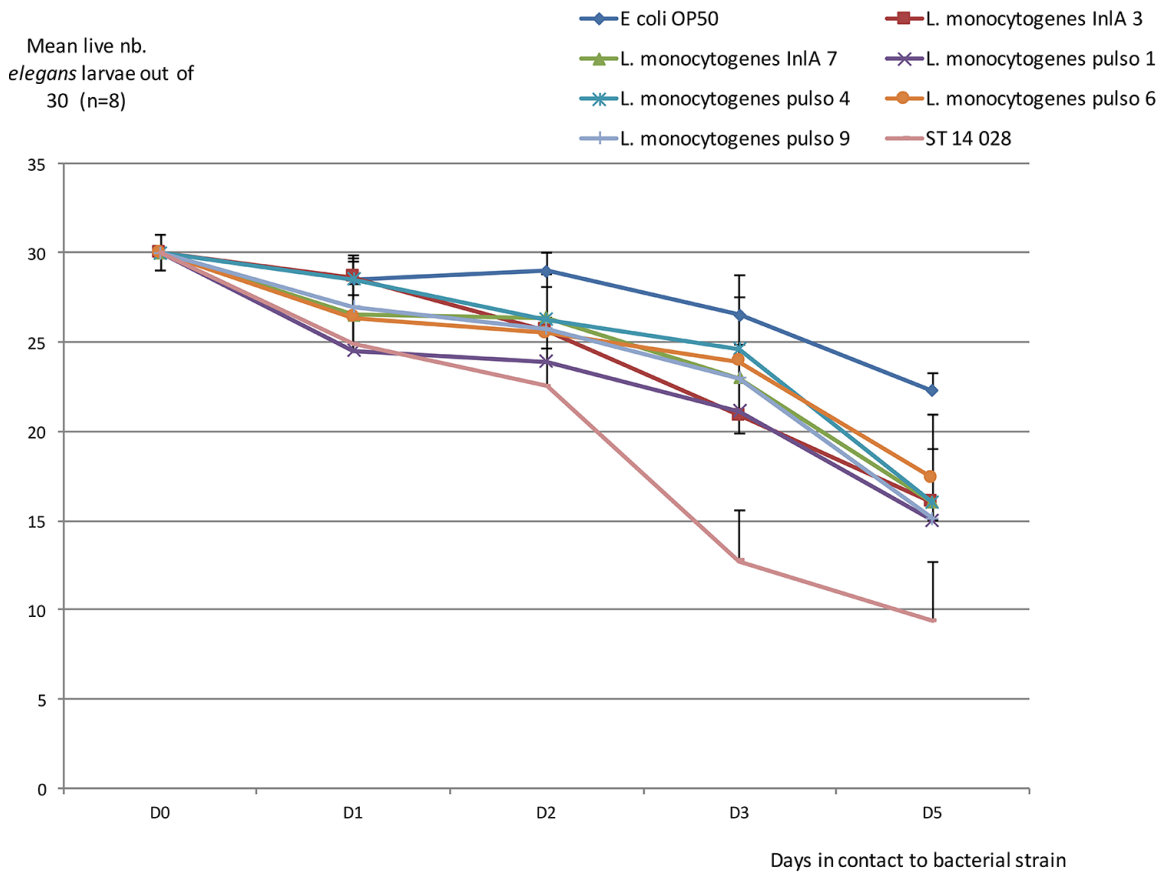
Strain origin	Reference	Age of patient	Isolated from	Geno-serogroup	serotype	<i>inlA</i> sequence
Bovine	SHY 13-3735	Calf	Cerebral Trunk	IVB	4ab (4e)	Dele aa
Bovine	STF 13-5405	Adult	Cerebral Trunk	IVB	4ab (4e)	Complete
Bovine	SHY 14-895	nr	nr	IIA	1/2a	Complete
Ovine	STF 15-130	nr	nr	IIA	1/2a	Complete
Bovine	STF 13-5780	nr	nr	IIA	1/2a	Complete
Bovine	STF 13-4520	Aborted foetuse	Invasive multi-organ	IIA	1/2a	Complete
Bovine	STF 14-742	nr	nr	IIA	1/2a	Complete
Caprine	STF 14-2030	Young goat	Invasive multi-organ	IIA	1/2a	Complete
Bovine	STF 14-1682	Calf	Invasive multi-organ	IIA	1/2a	Complete
Ovine	SHY 14-4826	Lamb	Tron cerebral	IVB	4ab (4e)	Complete
Ovine	STF 14-2033	Lamb	Invasive multi-organ	IIA	1/2a	Complete
Bovine	SHY 15-117	nr	Liver	IVB	4ab (4e)	Dele aa
Bovine	SHY 14-4645	Aborted foetuse	Invasive multi-organ	IIA	1/2a	Complete
Swine	Pulso 1	na	na	IIB	1/2b	PSC (700) - Ref. (1)
Swine	Pulso 4	na	na	IVB	4b	Complete - Ref. (1)
Swine	Pulso 6	na	na	IVB	4b	Dele aa - Ref. (1)
Swine	Pulso 9	na	na	IIB	1/2b	PSC (700) - Ref. (1)
Human	ID133477	93	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID133460	77	nr	IIA	1/2a	PSC (762)
Human	ID133117	90	nr	IVB	4b, (4e)	Complete
Human	ID132843	85	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID132717	72	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID132686	73	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID132415	65	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID132372	69	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID131406	78	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID131393	80	Cerebrospinal fluid	IVB	4b, (4e)	Complete
Human	ID131197	75	blood	IVB	4b, (4e)	Complete
Human	ID131001	73	blood	IIB	1/2b	Complete
Human	ID130591	83	nr	IIA	1/2a	Complete
Human	ID130390	74	blood	IVB	4b, (4e)	PSC (700)
Human	ID130364	73	blood	IIA	1/2a	Complete
Human	ID129727	81	blood	IVB	4b, (4e)	Complete

Legend Figure 1: Characterisation of *L. monocytogenes* strains of clinical origin. PSC, premature stop codon, (aa position). Dele aa: deletion of first amino-acids in the protein. na: not applicable; nr: not recorded. **Bold**: retained for *C. elegans* testing.

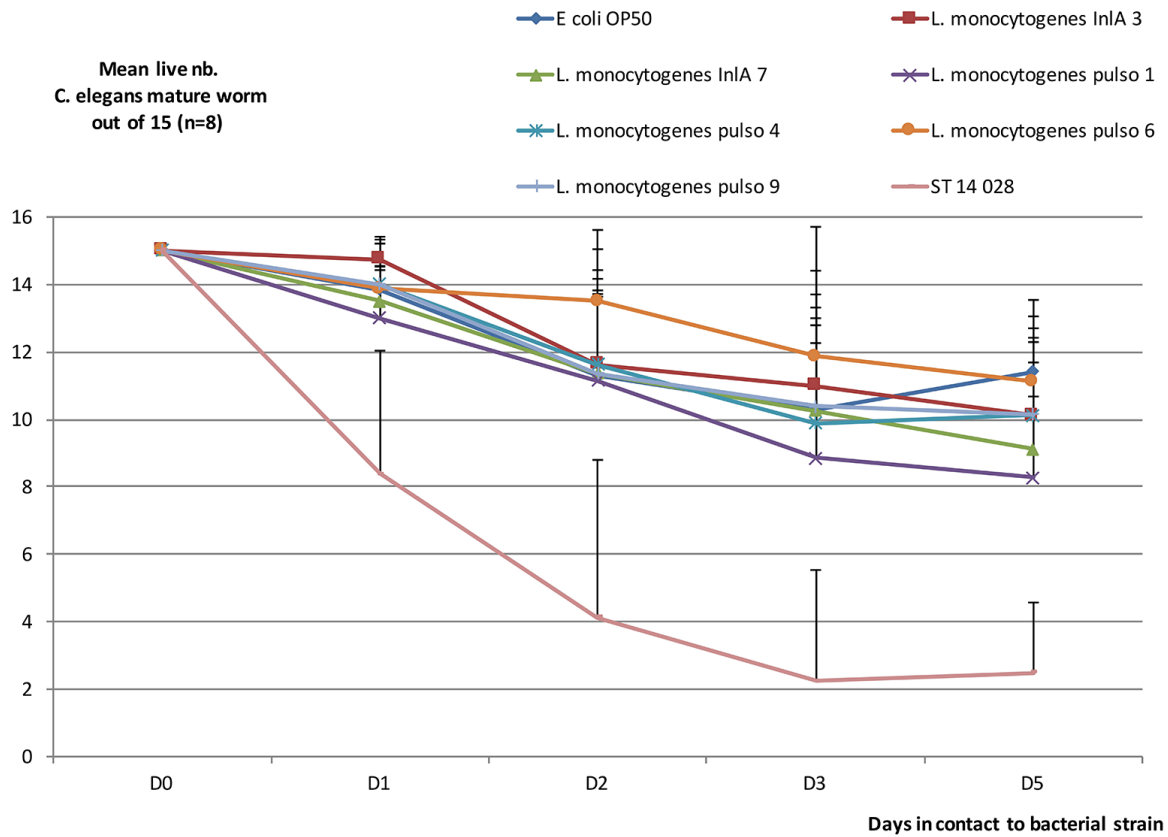
Figure 2: *L. monocytogenes* virulence on *C. elegans* model

Condition	Concentration (UFC/mL)	serovar	<i>InlA</i>	Mean viability n=8 (+/- SD)			
				Larvae (living worms; n=30)		Mature (living worms; n=15)	
	Daily 100µL			D0	D5	D0	D5
E coli OP50	6.0.10 ⁶			30	22.3 (1.6)	15	11.4(1.3)
<i>L. monocytogenes InlA 3 h s</i>	6.0.10 ⁹	1/2 b	Comp.	30	16.0 (4.9)	15	10.1(2.2)
<i>L. monocytogenes InlA 7 h s</i>	1.6.10 ⁹	4b	PSC 700	30	16.0 (3.9)	15	9.2 (1.6)
<i>L. monocytogenes pulso 1 s</i>	4.0.10 ⁹	1/2 b	PSC 700	30	15.0 (4)	15	8.3 (3.4)
<i>L. monocytogenes pulso 4 s</i>	4.9. 10 ⁹	4b	Comp.	30	16.0 (5.0)	15	10.1 (2.3)
<i>L. monocytogenes pulso 6 h s</i>	4.3.10 ⁹	4b	Comp.#	30	17.4 (4.2)	15	11.1(2.4)
<i>L. monocytogenes pulso 9 h s</i>	5.0.10 ⁹	1/2b	PSC 700	30	15.1 (4.2)	15	10.1(2.9)
S Typhimurium 14 028	1.2.10 ⁷			30	9.4 (3.3)	15	2.5 (2.1)
No bacteria				30	2.3 (1.8)	15	0 (0.2)

Legend Figure 2: *L. monocytogenes* virulence on *C. elegans* model isolated in human (h) or swine (s). h s: strains from animal origin related to human cases (identical PFGE profile). Comp: complete InIA; PSC 700: truncated InIA due to the presence of a 700 aa position premature stop codon. Comp.# complete but with substitution of first amino acids.



Legend Figure 3: Evolution of mean live nb. *C. elegans* larvae out of 30 (n=8). Mean (n=8) number of live *C. elegans* larvae out of 30 after 1 to 5 days in contact with bacterial strain (see Figure 2). Barre: SD.



Legend Figure 4: Evolution of mean nb. of live mature *C. elegans* out of 15 (n=8). Mean (n=8) number of live *C. elegans* mature out of 15 after 1 to 5 days in contact with bacterial strain (see Figure 2). Barre: SD.