

Université de Montréal

**Détection et caractérisation génétique de *Listeria monocytogenes* dans une usine
d'abattage/découpe de porcs au Québec**

par Guillaume Larivière-Gauthier

**Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire**

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en sciences vétérinaires
option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Décembre 2012

© Guillaume Larivière-Gauthier, 2012

Résumé

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) est un pathogène majeur en santé publique comme les épisodes de 2008 dans les fromages et les charcuteries l'ont démontré. Au Canada, il n'y a pas de surveillance réglementaire de ce microorganisme dans les étapes précédant la transformation de produits prêts-à-manger. Ainsi, la présence et la circulation de ce microorganisme dans ces environnements est peu documentée. Pour décrire ces phénomènes, nous avons effectué un échantillonnage dans une usine d'abattage et de découpe de porcs au Québec, principalement dans les parcs d'attente, et dans l'environnement de l'abattage et de découpe : les échantillonnages ont été effectués après lavage et désinfection sur une période de 2 ans. Un nombre de 874 échantillons a été récoltés. Le protocole de détection utilisé était inspiré de la méthode MFHPB-30 de Santé Canada. Les sérotypes ont été obtenus par PCR et les isolats caractérisés par un géotypage RFLP-PFGE en utilisant les enzymes de restriction *Apa*I et *Asc*I. Nous avons détecté la présence de *Listeria monocytogenes* dans toutes ces étapes de la production. De ces échantillons positifs, 4 sérotypes (principalement 1/2b) ont émergé. Les patrons PFGE ont démontré la présence d'une variété de géotypes dans les zones d'attente et d'abattage de l'usine et la présence d'un type majeur dans l'environnement de la zone de découpe (le type 1 représentant 96.1% des souches à cette étape). De plus, nous avons démontré des liens entre les souches retrouvés au début de la production, en attente, et les souches retrouvées dans la zone de découpe. Ces résultats suggèrent que *Listeria monocytogenes* entre dans l'usine avec les animaux, contamine les étapes suivantes de la production et que certaines souches peuvent être sélectionnées et leur croissance favorisée dans

l'environnement, devenant majoritaires, persistantes et préoccupantes en regards de la santé publique.

Mots-clés : *Listeria monocytogenes*, PFGE, porc, abattoir, environnement, découpe, parcs d'attente

Abstract

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) is a major public health concern as it was illustrated by the 2008 episodes in cheese and ready-to-eat meat. In Canada, there is currently no surveillance policy of this microorganism in the production steps preceding transformation of ready-to-eat products. The presence and the circulation of this microorganism in these environments is not well documented either. To describe these parameters, we sampled a Quebec slaughtering and cutting plant in the lairage pens and on representative areas of the slaughter process and cutting rooms after washing and disinfection, during a two-year period. A total of 874 samples were collected. *Listeria* detection followed the MFHPB-30 Health Canada standard method, serotype confirmation was obtained by PCR and isolates were characterized by Apa1 and Asc1 RFLP-PFGE genotyping. We reported detection of *Listeria monocytogenes* in all stages of production. Among the positive samples, 4 different serovars (mainly 1/2b) emerged. PFGE patterns showed presence of a variety of different genotypes in the lairage and slaughtering areas of the plant and the presence of a major type in the environment of the cutting room (type 1 representing 96.1% of the strains at this step). Furthermore, strains found at the lairage pens were related to strains in the cutting room. These results suggest that *Listeria monocytogenes* can enter the plant with the animals, contaminate further production steps and that some strains can be selected and their growth promoted in the environment. Hence, becoming predominant, persistent and a food safety issue.

Keywords : *Listeria monocytogenes*, PFGE, pork, slaughterhouse, environment, cutting room, lairage pens

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Introduction.....	1
Recensement de la littérature.....	5
Historique :.....	6
Les listérioses :.....	9
Caractéristiques de <i>Listeria monocytogenes</i> :.....	13
Méthodes de détection :.....	15
Typage phénotypique et génotypique de <i>Listeria monocytogenes</i> :.....	21
Méthodes phénotypiques :.....	21
Méthodes génotypiques :.....	23
Phylogénie de <i>Listeria monocytogenes</i> :.....	30
Clones épidémiques :.....	31
Lignée I :.....	32
Lignée II :.....	33
Facteurs de virulence :.....	36
Survie de <i>Listeria monocytogenes</i> dans l'environnement de production alimentaire :.....	44
Température :.....	44
Biofilms :.....	45
Persistance / Récurrence :.....	49
Règlementation :.....	52
<i>Listeria monocytogenes</i> en production alimentaire :.....	55

Dans l'environnement :	55
Chez les animaux:	56
À l'abattage:	58
Étapes de réfrigération, découpe et transformation :	61
Problématique générale :	65
Méthodologie et Résultats.....	66
Abstract	68
Introduction.....	69
Materials and methods	71
Results.....	73
Discussion	76
Conclusion	81
Discussion générale	86
Conclusion	99
Bibliographie.....	xiii
ANNEXE I.....	xxix
ANNEXE II	xxx

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques phénotypiques permettant l'identification des espèces du genre <i>Listeria</i>	14
Tableau II. Comparaison des milieux disponibles pour la détection de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
Tableau III. Combinaison des antigènes en lien avec les sérotypes de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
Tableau IV. Protéines associées à la virulence de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
Table V. <i>Listeria monocytogenes</i> detection, serotyping and pulsotyping in the lairage pens environment.	82
Table VI. <i>Listeria monocytogenes</i> detection in the slaughtering, evisceration, chilling and cutting steps in all three combined visits.	83
Table VII. <i>Listeria monocytogenes</i> serotyping and pulsotyping in the slaughtering, evisceration, chilling and cutting areas.	85

Liste des figures

Figure 1. <i>Listeria</i> sur milieu Palcam agar et culture mixte sur ALOA agar.....	19
Figure 2. Rôle de l'activateur transcriptionnel PfrA dans l'activation des principaux facteurs de virulence à l'intérieur du corps humain	36
Figure 3. Mécanismes d'internalisation de <i>Listeria monocytogenes</i> par la voie InlA (A) et InlB (B).....	38
Figure 4. Mécanisme de régulation de la mobilité de <i>Listeria monocytogenes</i>	47
Figure 5. Dendrogram of the combined <i>AscI</i> and <i>Apal</i> PFGE type in relation to their serogroup.....	84

Liste des sigles et abréviations

ARN : Acide ribonucléique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALOA : Agar *Listeria* Ottaviani & Agosti

AFLP : Amplified fragment length polymorphism

Aw : Activité de l'eau

CAMP : Christie Atkins Munch-Petersen

CDC : Center for Disease Control

CFIA : Canadian Food Inspection Agency

EPS : Exopolysaccharides

FDA : Food and Drug Administration

FSIS : Food Safety and Inspection Service

ISO : Organisation internationale de normalisation

LIPi : *Listeria* Pathogenicity éisland

LL : Listeriolysine

L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*

MLEE : Multi-Locus Enzyme Electrophoresis

MAPAQ : Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec

MLST : Multilocus Sequence Typing

MLVA : Multiple Loci VNTR Analysis

PALCAM : Polymyxin acriflavin lithium-chloride ceftazidime esculin mannitol

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

PLC : Phospholipase C

QAC : Quaternary Ammonium Compounds

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SNP : Single-nucleotide Polymorphism

Spp. : Espèce

TIA : Toxi-infection alimentaire

USDA : United States Department of Agriculture

UFC : Unité formant une colonie

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

Ce mémoire est dédié à tous les amateurs de bacon

Remerciements

Merci à ma directrice de recherche, Dre Ann Letellier, de m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire tout d'abord comme stagiaire et ensuite comme étudiant.

Merci à mes codirecteurs, Dr Sylvain Quessy et plus particulièrement au Dr Philippe Fravalo pour son support et son aide tout au long du projet.

Merci à mes collègues et amis de la Chaire de recherche en salubrité des viandes pour votre aide et vos conseils.

Merci aux membres de mon comité-conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci au Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), à la Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) et au Ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ) pour leur contribution financière au projet.

Merci à mes parents pour leurs encouragements et leur support constant tout au long de mes études.

Merci à mes amis Alexis, Christine, Laurent et Sophie pour leurs encouragements.

Introduction

Listeria monocytogenes est un pathogène d'importance majeure en santé publique parce qu'il génère un très haut taux de mortalité chez les populations susceptibles telles que les personnes âgées, les gens immunosupprimés ainsi que les nouveaux-nés et les femmes enceintes. La listériose est principalement causée par la consommation de produits alimentaires contaminés, particulièrement les produits prêt-à-manger carnés et les fromages de lait cru. Son contrôle est donc capital dans l'industrie alimentaire. Cette bactérie a fréquemment été isolée de produits de porc cru mais aussi de charcuteries d'origine porcine. Des éclosions ont régulièrement été associées à la consommation de ce type de produits contaminés. Par exemple en 2008, une éclosion qui a été liée à des produits de viande froide contaminés a frappé le Canada causant 57 cas et 22 décès (Weatherill, 2011). Cet évènement a confirmé l'importance d'un contrôle strict de ce pathogène et a mené à une modification des politiques de Santé Canada pour la surveillance de ce microorganisme. Ainsi, non seulement la surveillance des produits prêt-à-manger est obligatoire, mais aussi celle de l'environnement de la production en usine alimentaire. Il n'y a cependant pas de politique quand à la surveillance et au contrôle de *Listeria monocytogenes* dans les étapes précédentes de la production porcine c'est-à-dire dans le secteur cru où se situent entre autres les étapes d'attente, d'abattage et de découpe et peu d'information est disponible sur sa présence à ces étapes.

Comme *Listeria monocytogenes* est ubiquitaire dans l'environnement, les routes qu'elle emprunte pour entrer dans l'usine ne sont pas précisément connues. L'une des principales théories est que ce pathogène peut y être introduit par des animaux vivants qui sont porteurs sains. Cependant les résultats disponibles dans la littérature restent ambigus sur cette hypothèse. En effet, la littérature rapporte une grande variabilité pour la présence de *Listeria*

monocytogenes dans les fèces, les intestins et les amygdales de porcs sains à la ferme avec des niveaux de prévalence variant de 0% à 61% (Ryser et Marth, 2007). Ainsi, dans les cas où les porcs sont fortement contaminés, il semble que ceux-ci pourraient effectivement être responsables de la contamination de l'environnement lors de l'attente ou durant les opérations de préparation de la carcasse (Ryser et Marth, 2007). À la suite de l'entrée dans l'usine, quelques études ont suggéré que cette contamination est amplifiée dans les étapes de ressuyage et de découpe (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006). Dans ces environnements, certaines souches sont fréquemment retrouvées. Ceci pourrait être expliqué par l'existence de souches récurrentes qui sont adaptées au porc, qui sont introduites et peuvent éventuellement croître dans ces environnements particulièrement frais (Chasseignaux, Gerault *et al.*, 2002). Cependant, des auteurs ont aussi émis l'hypothèse de l'existence de souches spécifiques résidentes qui sont difficiles à éliminer lors des étapes de nettoyage et de désinfection et qui peuvent devenir persistantes pour des périodes allant de quelques mois à plusieurs années (Ortiz, Lopez *et al.*, 2010, Carpentier et Cerf, 2011). À cause de cette contamination environnementale, suite aux étapes de refroidissement et de découpe, il a été démontré que la viande de porc crue est significativement plus contaminée (Kanuganti, Wesley *et al.*, 2002, Gamboa-Marín, Buitrago M *et al.*, 2012). Ces produits contaminés peuvent ensuite être utilisés dans la production de produits prêt-à-manger de type charcuterie. Il a été démontré qu'ils constituent une source potentiellement importante d'introduction de nouvelles souches de *Listeria monocytogenes* dans un environnement où sa maîtrise devient alors critique (Chasseignaux, Toquin *et al.*, 2001, Thevenot, Delignette-Muller *et al.*, 2006).

Les objectifs de cette étude étaient premièrement d'évaluer pour la première fois au Canada, la présence de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement d'une usine d'abattage et de découpe de porcs et deuxièmement, d'évaluer la distribution, circulation et l'évolution de ces souches à travers les différentes étapes de la production à l'aide de méthodes de typage moléculaire. Les résultats de cette étude ont permis d'avoir un meilleur aperçu de l'état de la situation quant à la présence de *Listeria monocytogenes* à travers les étapes de la production post-mortem, sur la circulation de ce pathogène à travers les divers étapes, et l'évolution de la contamination tant au niveau du nombre que de la diversité génétique de ce pathogène d'importance en santé publique.

Recensement de la littérature

Historique :

Le genre *Listeria* fait partie de la famille des *Listeriaceae*. Ce genre fait partie de l'ordre des Bacillales et de l'embranchement des Firmicutes. On compte huit espèces de *Listeria* dont *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* et deux espèces plus récemment découvertes *L. marthii* et *L. rocourtiae* (Sukhadeo, Torsten *et al.*, 2008, Graves, Helsel *et al.*, 2010, Leclercq, Clermont *et al.*, 2010). *Listeria monocytogenes* est le seul pathogène majeur de ce genre pour l'homme. Cependant, de rares cas d'infections humaines par *Listeria ivanovii*, plutôt considéré comme un pathogène des ruminants, ont été rapportés. *Listeria monocytogenes* a été décrit pour la première fois en 1926 par Murray et coll. chez des rongeurs de laboratoire atteints de monocytose et avait été nommé *Bacterium monocytogenes* (Murray, Webb *et al.*, 1926, Ryser et Marth, 2007). L'année suivante, Pirie a aussi isolé cette bactérie, mais cette fois chez une gerbille d'Afrique du Sud. Il a décidé de nommer cette bactérie *Listerella hepatolytica* en l'honneur de Lord Joseph Lister, le pionnier de l'antisepsie en chirurgie (Pirie, 1927). Après avoir découvert qu'il s'agissait en fait de la même bactérie, les deux groupes ont fusionné les noms pour obtenir *Listerella monocytogenes*. Cette bactérie est par la suite devenue *Listeria monocytogenes* en 1940 en raison de confusion taxonomique avec un myxomycète du même nom (Pirie, 1940). Au départ, et pendant les 50 années qui ont suivi sa découverte, *Listeria monocytogenes* était principalement considérée comme une bactérie retrouvée dans la terre et chez les animaux. Comme ce pathogène est ubiquitaire, on considérait au départ que la source d'infection était par contact direct soit par l'environnement ou par exposition occupationnelle (Farber et Losos, 1988). Cependant, en Allemagne de l'Est dès 1949 et jusqu'en 1957, on décrivit la première éclosion de listériose. Dès cette époque, l'équipe de Potel et coll. réussit à isoler la bactérie du lait d'une vache

atteinte de mammite et des enfants morts nés de femmes ayant consommé le lait cru provenant de cette vache. Il fait ainsi pour la première fois le lien entre la listériose périnatale et la consommation d'aliment contaminé par la mère (Ryser et Marth, 2007). Malgré ces informations, ce n'est seulement qu'en 1981 qu'un lien a officiellement été établi entre la transmission de *Listeria monocytogenes* à l'homme et la consommation d'aliments contaminés. En effet, à ce moment, une enquête portant sur une épidémie de listériose périnatale en Nouvelle-Écosse a permis d'établir un lien direct entre la maladie et la consommation par des femmes enceintes, de salade de chou contaminée par le microorganisme, décrivant pour la première fois la possibilité de la contamination par les légumes (Schlech, Lavigne *et al.*, 1983). Dans les années suivantes et suite à d'autres éclosions importantes, la transmission de *Listeria monocytogenes* a été liée à la consommation de plusieurs autres types de produits. Ainsi, en 1985, une première éclosion liée au fromage est décrite à Los Angeles suite à la contamination de fromages frais contaminés par du lait cru (Linnan, Mascola *et al.*, 1988). C'est aussi à cette époque que le lien entre la consommation de produits de viande prêt-à-manger et la listériose a été tracé. En effet, c'est en 1991 qu'on fait le lien entre une éclosion ayant causé 366 cas au Royaume-Uni entre 1987 et 1989 et la consommation de pâtés (McLauchlin, Hall *et al.*, 1991). Ainsi avec le temps, l'hypothèse de la transmission de *Listeria monocytogenes* via la nourriture contaminée est devenue de plus en plus validée pour finalement être aujourd'hui acceptée comme la source la plus importante de transmission de ce microorganisme (Ryser et Marth, 2007). Plus récemment, une importante éclosion aux États-Unis qui a été responsable de 147 cas, a été causée par des cantaloups contaminés alors que jusqu'à maintenant les fruits avaient rarement été liés à la listériose (Ryser et Marth, 2007, Anonyme, 2011a). Ainsi, malgré notre connaissance des voies de transmission de ce

microorganisme aux humains, celui-ci reste tout de même un pathogène important en santé publique, tout comme l'a démontré une importante écloison de 2008 au Canada. Cette écloison liée à des viandes froides contaminées, a causé 52 cas et 27 morts (Weatherill, 2011). Elle démontre l'importance de poursuivre la recherche pour mieux comprendre les voies de contaminations des produits en usine et l'écologie de ce microorganisme dans le milieu de la production alimentaire afin d'en permettre un meilleur contrôle.

Les listérioses :

La listériose est le nom donné à la maladie associée à l'infection par *Listeria*. Cette maladie est principalement causée par *Listeria monocytogenes* et affecte principalement les populations à risque telles que les personnes âgées, les immunodéficients ou les femmes enceintes et les nouveaux-nés. Cette infection possède deux formes; soit la forme non-invasive et la forme invasive.

La principale voie de contamination de *Listeria monocytogenes* est la voie orale, principalement par la consommation de produits alimentaires contaminés. Toutefois d'autres voies sont aussi possibles telles que la transmission directe par contact avec la peau, principalement chez les vétérinaires travaillant avec des animaux contaminés, par exposition de la cornée et la transmission verticale au fœtus (Michael, Mariela *et al.*, 2008). La dose orale infectieuse de *Listeria monocytogenes* n'est pas connue précisément et semble varier selon la souche et la susceptibilité de l'hôte (Wagner et McLauchlin, 2008). On rapporte cependant des doses infectieuses à moins de 1000 cellules (Schmid-Hempel et Frank, 2007). La période d'incubation pour une infection invasive est variable, mais semble se situer entre 11 et 70 jours avec une moyenne de 31 jours (Center for Food Safety and Applied Nutrition (U.S.)). Les infections non-invasives quant à elles, produisent des symptômes plus rapidement soit entre un minimum de 11 heures et un maximum de 7 jours avec une moyenne de 18 heures.

Au Québec, *Listeria monocytogenes* compte pour 6,5% des toxi-infections alimentaires rapportées et confirmées d'après le rapport 2010-2011 du MAPAQ. Ce qui fait de ce

microorganisme le 4e pathogène le plus fréquemment incriminé dans les toxi-infections alimentaires (TIA) (MAPAQ, 2012). Cependant, puisque le temps d'incubation de ce pathogène peut être très long (jusqu'à 70 jours), il peut être très difficile d'associer les cas humains à la consommation de produits contaminés. De plus, il est important de prendre en compte que les manifestations de la listériose sont très variables. Ainsi, les cas tardifs et moins graves qui peuvent ne pas mener à une hospitalisation peuvent donc être associés à une sous-déclaration des cas. La proportion de ces cas non déclarés par rapport à ceux qui le sont n'est cependant pas connue (Anonyme, 2003b). Malgré une incidence faible, soit 4,2 cas par 1 000 000 habitants au Canada en 2007, cette pathologie présente un fort taux de morbidité et de mortalité. Le réseau FoodNet rapporte aux États-Unis que 89,5 % des cas ont menés à une hospitalisation (Michael, Mariela *et al.*, 2008) alors que 12,8 % des cas qui ont été rapportés ont mené à des décès. Ceci fait de ce microorganisme le pathogène alimentaire générant le plus haut taux de létalité (Foodnet, 2010). Le taux de létalité rapporté à travers le monde se situe entre 20 et 30%. On a noté une augmentation du nombre de cas par habitant au Canada et dans plusieurs pays de l'Union européenne tels que la France et le Royaume-Uni ces dernières années. Cependant, les causes de ces augmentations ne sont toujours pas connues. Des hypothèses telles que le vieillissement de la population et les modifications des habitudes alimentaires, comme l'augmentation de la consommation d'aliments réduits en sel ont été émises pour expliquer ce phénomène (Goulet, Hedberg *et al.*, 2008, Anonyme, 2011b).

Les femmes enceintes, leurs nourrissons (23 % des cas) et les gens immunosupprimés (65 % des cas) sont les plus fréquemment touchés par la listériose. La population immunosupprimée comprend les gens atteints du SIDA, les transplantés, les gens subissant des thérapies

immunosuppressives et les gens âgés (Dongyou, 2008a). La bactérie peut causer deux types de manifestations soit une forme non-invasive et une forme invasive (Dongyou, 2008a). Dans population en santé, elle cause le plus souvent la forme non invasive de la listériose qui est responsable d'une infection gastro-intestinale. Les symptômes principaux sont des vomissements, des nausées, des crampes, de la diarrhée ou de la constipation, des maux de tête sévères, et de la fièvre. D'après des études sur la population en santé, entre 1 et 5 % des gens peuvent être porteurs asymptomatiques de différentes espèces de *Listeria* au niveau gastro-intestinal, avec les niveaux les plus élevés retrouvés chez les travailleurs des usines d'abattage (Grif, Patscheider *et al.*, 2003, Sauders, Pettit *et al.*, 2005, Ryser et Marth, 2007). Dans les populations à risque et dans de très rares cas dans la population en santé, la bactérie peut atteindre la circulation sanguine et provoquer la forme invasive de la listériose. Celle-ci peut provoquer des septicémies, des méningo-encéphalites et des encéphalites qui peuvent comme il a été expliqué précédemment, provoquer la mort chez de nombreux sujets atteints. Chez les femmes enceintes, les manifestations de la listériose sont plus faibles. L'infection peut être asymptomatique, ressembler à une grippe, mais dans de rares cas, elle peut aussi attaquer le système nerveux central. En effet, chez les femmes enceintes, l'infection affecte plutôt le fœtus. *Listeria monocytogenes* a la capacité de franchir la barrière hémato-placentaire pour causer l'infection chez le fœtus. Une infection au début de la grossesse peut causer un avortement spontané, alors que dans les dernières semaines elle peut provoquer la naissance d'un enfant mort né ou la mort du bébé dans les heures suivant l'accouchement. Le taux de mortalité chez les nourrissons infectés lors de la grossesse varie entre 20-30 % (Goldfine, Shen *et al.*, 2007, Ryser et Marth, 2007).

Les données disponibles sur la virulence de *Listeria monocytogenes* démontrent que malgré une rare incidence dans la population, cette bactérie est un pathogène potentiellement mortel dans les populations à risque, nécessitant un contrôle en industrie alimentaire.

Caractéristiques de *Listeria monocytogenes* :

Les *Listeria* sont de petits bacilles à Gram positif, anaérobie facultatif, non sporulé, catalase positive et oxydase positive. Ces bactéries possèdent des flagelles qui sont péritriches et qui permettent la mobilité à des températures entre 20 et 30°C. Ils sont cependant non mobiles à des températures au-dessus de 37°C. Sous microscope, ce microorganisme peut être retrouvé sous la forme d'un bâtonnet et peut parfois être arrangé en courtes chaînettes ou en forme de V ou de Y. Cependant, les cellules peuvent parfois avoir une forme coccoïde semblable à celle des *Streptococcus* (Ryser et Marth, 2007). Sa température optimale de croissance se situe entre 30-37°C. C'est un microorganisme psychrophile qui possède aussi la capacité de croître à des températures de réfrigération, c'est-à-dire entre 4 et 10°C. Certaines études ont même démontré des croissances à des températures allant même sous le point de congélation (-0,15°C) pour certaines souches (Walker, Archer *et al.*, 1990, Wagner et McLauchlin, 2008). C'est une bactérie qui est très résistante au sel et peut croître à des concentrations allant jusqu'à 10% de NaCl. Elle se développe à des pH allant de 4,3 à 9,6 et dans des milieux ayant jusqu'à 0,9 d'activité de l'eau (A_w). Les différentes espèces de *Listeria* produisent des niveaux d'hémolyse variables et cette caractéristique peut être utilisée dans l'identification de *Listeria* au niveau de l'espèce. En effet, *Listeria monocytogenes* et *Listeria seeligeri* produisent de faibles zones d'hémolyse alors que *Listeria ivanovii* produit une grande zone bien définie et que les autres espèces ne sont pas hémolytiques. Le test de CAMP qui mesure l'amplification de l'hémolyse en présence de certaines bactéries, notamment *Straphylococcus aureus*, est encore utilisé dans les méthodes de références pour caractériser les différentes espèces de ce genre. D'autres tests biochimiques, tels que la fermentation de différents sucres,

sont cependant nécessaires pour une identification complète au niveau du genre (Tableau I) (Ryser et Marth, 2007, Franco Pagotto, 2011, Hitchins et Jinneman, 2011).

Tableau I. Caractéristiques phénotypiques permettant l'identification des espèces du genre *Listeria*.

Espèces	Production d'acide à partir				Test de CAMP	
	β -Hémolyse	Mannitol	Rhamnose	Xylose	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	+	-
<i>L. grayi</i>	-	+	V	-	-	-

+: Positif, -: Négatif, V: Variable
Adapté de (Wagner et McLauchlin, 2008)

Méthodes de détection :

La méthode d'enrichissement à froid a longtemps été la méthode standard pour l'isolement de *Listeria monocytogenes*. Cette méthode consiste à incuber l'échantillon à des températures de réfrigération de façon à utiliser la capacité des *Listeria* à croître à 4°C. Cette méthode demande beaucoup de temps puisqu'elle requiert une incubation jusqu'à 8 semaines (Hayes, Graves *et al.*, 1991). Aujourd'hui, deux bouillons d'enrichissement sont principalement utilisés pour la détection de *Listeria monocytogenes*; les bouillons UVM (Université du Vermont) et FRASER. Ces bouillons contiennent tous deux de l'acriflavine et de l'acide nalidixique qui permettent une sélection du genre *Listeria*. L'acriflavine inhibe la croissance des bactéries à Gram positif alors que l'acide nalidixique inhibe celle des bactéries à Gram négatif. Les deux bouillons contiennent aussi un niveau élevé de chlorure de sodium et le bouillon FRASER contient en plus du chlorure de lithium. En plus de ces fonctions sélectives, le bouillon FRASER permet la détection de l'hydrolyse de l'esculine qui est une caractéristique commune à toutes les espèces de *Listeria*. Ce milieu contient du citrate d'ammonium ferrique qui devient noir en présence de bactéries dégradant l'esculine, ce qui permet une sélection visuelle des échantillons contenant potentiellement des *Listeria* (Lisa, 2008). La plupart des protocoles de détection de *Listeria* recommandent un enrichissement qui se déroule en deux étapes. Ceci permet une meilleure détection des *Listeria monocytogenes* souvent présentes en faible quantité, mais aussi une récupération des souches ayant subi un stress. Lors de la première étape, le bouillon utilisé contient la moitié des suppléments sélectifs de la formulation dans les méthodes de Santé Canada, ISO et USDA-FSIS (Anonyme, 2004, Lisa, 2008, Anonyme, 2009, Franco Pagotto, 2011). Alors que la méthode de la FDA utilise, un pré-enrichissement sans supplément (Hitchins et Jinneman, 2011). Dans les méthodes

utilisant deux étapes d'enrichissement, les bouillons obtenus aux deux étapes doivent être inoculés sur géloses puisque l'on sait que certaines espèces de *Listeria* tel que *Listeria innocua* sont souvent retrouvées en plus grandes quantités dans les échantillons et pourraient avoir une croissance plus rapide dans les bouillons utilisés dans ces techniques (Cornu, Kalmokoff *et al.*, 2002). Cette croissance plus rapide est possiblement due à une meilleure résistance à l'acriflavine ou à la production d'inhibiteurs de croissance inter-espèces (Cornu, Kalmokoff *et al.*, 2002). Ainsi, même si une plus grande variété de souches de *Listeria monocytogenes* peut parfois être retrouvée lors du deuxième enrichissement dans les échantillons faiblement contaminés ou ayant une forte présence de flore de compétition, une croissance plus élevée des espèces contaminantes tel que *Listeria innocua* est possible. Ceci peut avoir comme effet de masquer la présence de *Listeria monocytogenes* qui est souvent retrouvée en très faible quantité et mener à de faux négatifs (Lisa, 2008, Gnanou Besse, Barre *et al.*, 2010). L'inoculation des deux bouillons sur gélose permet donc d'éviter ces risques tout en obtenant la plus grande variété possible d'isolats.

Suite à l'enrichissement en bouillon, plusieurs milieux en gélose sont disponibles pour l'isolement différentiel et sélectif de *Listeria monocytogenes*. Ces milieux se divisent en deux catégories les milieux traditionnels utilisant l'esculine comme indicateur de la présence de *Listeria* et les milieux de développement plus récents qui contiennent des indicateurs chromogéniques. Les milieux traditionnels qui sont principalement utilisés sont les géloses PALCAM et Oxford. Ces milieux utilisent la capacité des bactéries du genre *Listeria* à hydrolyser l'esculine à l'aide de la β -d-glucosidase comme test différentiel. Cette réaction produit des colonies grises au contour noir à cause de la présence de fer dans le milieu. La

gélose PALCAM (Polymyxin, Acriflavine, Lithium chloride, Ceftazidime, Aesculin, Mannitol) contient en plus du mannitol, lequel n'est pas fermenté par la plupart des espèces de *Listeria* et permet donc de les différencier des autres bactéries contaminantes telles que les *Enterococcus* et les *Staphylococcus*. En effet, ces dernières, en utilisant le mannitol, produisent une acidification du milieu, ce qui fait virer l'indicateur de pH (rouge de phénol) du rouge au jaune. Ces milieux doivent être incubés 48h et ne permettent pas de faire la différence entre les espèces de *Listeria* potentiellement pathogènes (*L. mono*, *L. ivanovii*) et non pathogènes (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*). Les milieux chromogéniques qui ont été développés plus récemment, tels que la gélose ALOA Agar, sont très intéressants, car ils permettent une détection rapide et précise des colonies de *Listeria* pathogène comme *Listeria monocytogenes* (Tableau II). Ce milieu produit des colonies bleues pour toutes les espèces de *Listeria* en réponse au clivage d'une molécule chromogène (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-glucopyranoside) par la β -d-glucosidase. Cette gélose contient aussi du phosphatidyle inositol qui est hydrolysé par la phospholipase C qui est présente seulement chez les espèces pathogènes de *Listeria*, ce qui forme un halo opaque autour de la colonie (Lisa, 2008, Wagner et McLauchlin, 2008). Ces milieux permettent d'identifier des colonies typiques après seulement 24h d'incubation et permet une économie importante de temps sans réduire l'efficacité (Reissbrodt, 2004). Les méthodes officielles canadiennes recommandent l'utilisation d'un milieu Oxford Agar en conjugaison avec un autre milieu. Les milieux approuvés sont ALOA Agar, A.L. Agar, BBL CHROMagar *Listeria*, Chromogénique *Listeria* Agar Plate, lithium chloride-phenylethanol-moxalactam medium, modified Oxford Agar, PALCAM Agar ou RAPID'L.Mono (Tableau II). Pour ce qui est de la méthode ISO, depuis l'amendement de 2004, on demande l'utilisation obligatoire de la gélose ALOA en

conjugaison avec un milieu PALCAM ou Oxford pour la détection et l'utilisation de la gélose ALOA pour le dénombrement.

Tableau II. Comparaison des milieux disponibles pour la détection de *Listeria monocytogenes*.

Milieu de détection	Substrat pour la détection de:			Couleur de la colonie	
	B-d-Glucosidase	PI-PLC	Fermentation des sucres	<i>Listeria</i> spp. Non-pathogène	<i>L. mono.</i> <i>L. ivanovii</i>
PALCAM			Mannitol		
Oxord LPM MOX	Esculine	-	-	Grise avec un halo brun-noir	Grise avec un halo brun-noir
Harlequin Listeria		-	-	Noire	Noire
BCM Listeria monocytogenes (Biosynth)	CHE-β-d-glucopyranoside	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-myo-inositol-1-phosphate (X-IP)	-	Blanche	Bleue-Turquoise
Rapid'L. mono (Bio-Rad)	-	X-IP	Xylose	Blanche	<i>L. mono.</i> : bleu-turquoise <i>L. ivanovii</i> : bleu vert avec un halo jaune
LIMONO-Ident-Agar (Heipha)	-	X-IP	-	Blanche	
ALOA (AES, Biolife)					
CHROMagar Listeria (CHROMagarBBL)	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-d-glucopyranoside	L-α-Phosphatidyl-inositol	-	Bleue-Turquoise	Bleue-turquoise, entouré d'un précipité blanc
CHROMagar Listeria (BD)					
OCLA (Oxoid)					

Adapté de (Reissbrodt, 2004)

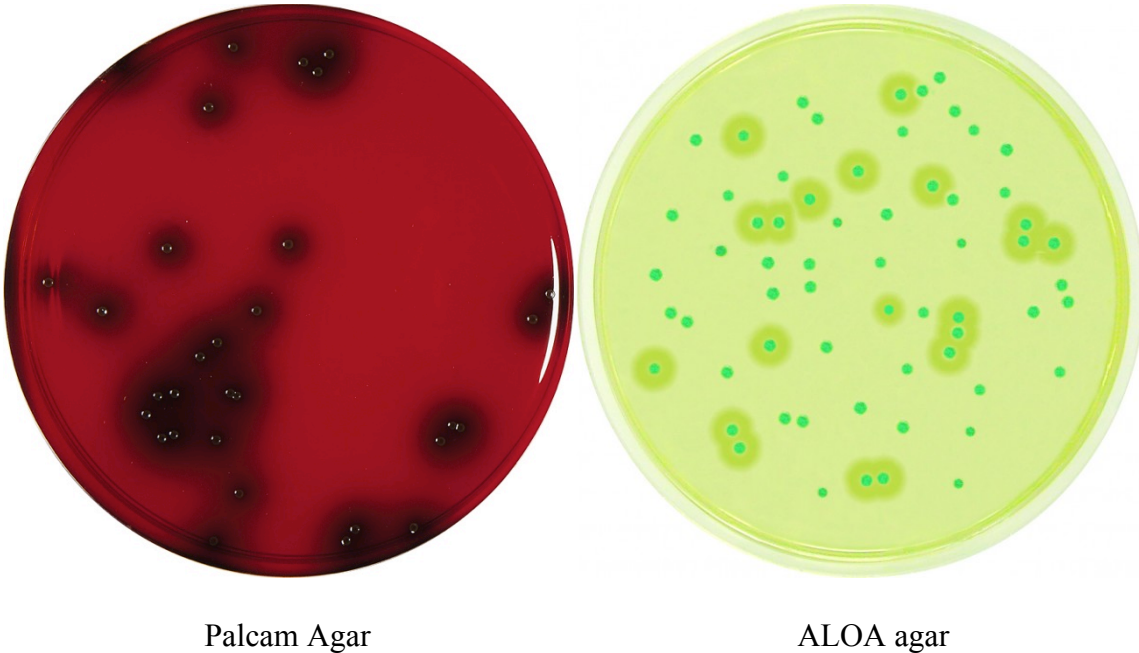


Figure 1. *Listeria* sur milieu Palcam agar (colonies noires ou grises) et culture mixte sur ALOA agar (*Listeria monocytogenes* : colonies bleues avec halo, autres *Listeria* : colonies bleues sans halo).

L'apparition des milieux chromogéniques pour la détection de *Listeria monocytogenes* a permis une véritable révolution dans la détection de *Listeria monocytogenes*. En effet, il a été démontré que l'utilisation de l'ALOA permet une meilleure récupération des *Listeria monocytogenes* dans les échantillons à population mixte (Greenwood, Willis *et al.*, 2005). Avant l'invention du milieu ALOA, on utilisait de préférence le milieu PALCAM pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans les échantillons qui étaient soupçonnés d'être contaminés par une forte diversité bactérienne. Ceci provoquait beaucoup de bruit de fond et rendait difficile l'isolement des *Listeria*, comme par exemple dans les échantillons de matières fécales ou les échantillons environnementaux. Le milieu PALCAM permet aussi une meilleure distinction entre les *Listeria* et les autres souches présentes dans l'échantillon grâce à son

indicateur de pH. Cependant, comme il a été illustré précédemment (Figure 1), ce milieu ne permet pas de faire la différence entre les espèces pathogène ou non-pathogène. Sur les milieux traditionnels, les colonies de *Listeria spp.* doivent donc être repiquées et identifiées par la suite. Dans les échantillons où *Listeria monocytogenes* est présent en faible proportion comparé aux autres espèces, on risque donc d'obtenir des faux négatifs (Bauwens, Vercammen *et al.*, 2003). L'apparition du milieu ALOA a donc permis une meilleure évaluation de la prévalence de ce pathogène dans les échantillons, entre autres dans les matières fécales des animaux comme le suggèrent les disparités de résultats entre les études utilisant ces milieux et les milieux traditionnels dans un contexte apparemment similaire (Wesley, Larsen *et al.*, 2008, Boscher, Houard *et al.*, 2012). Ceci rend difficile les comparaisons de situation puisque les rares études nord-américaines qui ont été effectuées sur le sujet qui nous préoccupe n'utilisent pas les milieux chromogènes.

Typage phénotypique et génotypique de *Listeria monocytogenes* :

Après avoir complété les étapes permettant l'isolement de la souche, un sous-typage peut être effectué pour mieux caractériser la bactérie. Plusieurs méthodes de sous-typage ont été mises au point pour *Listeria monocytogenes* et se divisent en deux catégories, soient; les méthodes phénotypiques qui caractérisent les propriétés exprimées par les isolats, et les méthodes génotypiques qui différencient ces isolats au niveau du matériel génétique.

Méthodes phénotypiques :

L'une des méthodes phénotypiques les plus couramment utilisée est le sérotypage. Le sérotypage classique de *Listeria monocytogenes* est basé sur la reconnaissance spécifiques d'antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) exprimés à la surface de la cellule bactérienne par des anticorps (Seeliger et Hohne, 1979, Pichel, Brengi *et al.*, 2012). Pour les antigènes somatiques, 15 sous-types ont été identifiés (I-XV) alors que les antigènes flagellaires se divisent en 4 sous-types (A-D). Le sérotype est composé d'une combinaison unique d'antigènes flagellaires et somatiques (Tableau III).

Tableau III. Combinaison des antigènes en lien avec les sérotypes de *Listeria monocytogenes*.

Sérotipe	Antigènes O	Antigènes H	Lignée
1/2a	I, II	A, B	II
1/2b	I, II	A, B, C	I
1/2c	I, II	B, D	II
3a	II, IV	A, B	II
3b	II, IV	A, B, C	I
3c	II, IV	B, D	II
4a	(V), VII, IX	A, B, C	III
4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C	I
4b	V, VI	A, B, C	I ou III
4c	V, VII	A, B, C	III
4d	(V), VI, VIII	A, B, C	I
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C	I
7	XII, XIII	A, B, C	I

Les antigènes entre parenthèses ne sont pas présents chez tous les isolats.

Adapté de (Gorski, 2008)

Depuis les dernières années, des méthodes de sérotypage moléculaire par PCR ont cependant été mises au point (Kerouanton, Marault *et al.*, 2010). Treize sérotypes différents sont retrouvés chez *Listeria monocytogenes* et de ceux-ci, un faible nombre de sérotypes de *Listeria monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 4b) est responsable de 95 % des cas humains. À cause de cette faible diversité des sérotypes dans les cas humains, comparé à d'autres méthodes, le sérotypage est souvent trop faiblement discriminant. Lorsqu'utilisé seul, il n'est donc pas un outil efficace de typage des souches dans le contexte d'une enquête épidémiologique visant à retracer la source d'une toxi-infection. Il a aussi été démontré qu'il existe une forte corrélation entre les méthodes de sous-typage moléculaire et le sérotipe (Nadon, Woodward *et al.*, 2001, Yi et Stephen, 2008).

Le typage phagique est une autre méthode qui peut être utilisée pour sous-typier les différentes souches de *Listeria monocytogenes*. Cette méthode permet le typage rapide d'une grande quantité de souches. Dans une étude, une équipe a ainsi typé 16 000 souches en 1 an. Cette technique est cependant difficile à standardiser à cause de la variabilité expérimentale et biologique des phages (Rocourt, Audurier *et al.*, 1985, Loessner et Busse, 1990, Capita, Alonso-Calleja *et al.*, 2002).

La méthode de MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis) peut aussi être utilisée. Celle-ci différencie les souches en comparant la mobilité électrophorétique de différentes enzymes et leur activité. Des mutations causant des modifications d'acides aminés dans les enzymes peuvent causer des variations dans la vitesse de migration. Cette méthode est très discriminante, mais est difficile à standardiser entre les laboratoires. Elle a fréquemment été utilisée dans les enquêtes épidémiologiques dans les années 90, mais est présentement délaissée pour les méthodes génotypiques (Bibb, Schwartz *et al.*, 1989, Wiedmann, 2002).

Méthodes génotypiques :

La méthode de génotypage la plus utilisée et qui est devenue un standard pour sous-typier différentes souches de *Listeria monocytogenes* est le RFLP-PFGE (Restriction Fragment Length Polymorphism-Pulsed Field Gel Electrophoresis). Cette méthode est considérée comme l'une des plus discriminantes pour cette espèce et est utilisée comme outil principal dans les enquêtes épidémiologiques ayant pour but de déterminer les sources de contamination lors d'éclousions (Fugett, Schoonmaker-Bopp *et al.*, 2007, Lopez-Canovas, Riveron *et al.*, 2009).

Cette méthode consiste à digérer l'ADN génomique de la bactérie à l'aide d'enzymes de macrorestriction. Ces enzymes sont sélectionnés pour générer entre 10 et 20 longs fragments d'ADN d'une taille de 20 kb et plus (Herschleb, Ananiev *et al.*, 2007). Ces fragments sont trop longs pour migrer sur un gel d'agarose standard et doivent donc être analysés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Cette technique consiste à faire migrer les fragments d'ADN dans un champ électrique à direction variable ce qui permet de faciliter la migration et la séparation des différents fragments de haut poids moléculaire. Les profils obtenus peuvent ensuite être comparés pour obtenir des informations sur la similitude entre les souches retrouvées. Ils peuvent ainsi être utilisés comme outil de traçabilité permettant de déterminer la provenance des différentes souches lors d'éclotions (Yi et Stephen, 2008). Une base de données internationale nommée Pulsenet a été mise en place par le Center for Disease Control aux États-Unis (CDC). Cet organisme a aussi mis au point des protocoles standardisés permettant de comparer les résultats obtenus entre différents laboratoires (Graves et Swaminathan, 2001).

Le profil des plasmides contenus dans la souche a aussi été étudié comme méthode de sous-typage. Cependant, cette méthode n'est pas très efficace puisque toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ne contiennent pas de plasmide et leur présence n'est pas nécessairement stable (van den Elzen et Snijders, 1993, Yi et Stephen, 2008). Une étude a récemment mis en évidence pour la première fois, la présence d'un plasmide possédant des gènes semblable à des internalines et possiblement associé à la virulence (den Bakker, Bowen *et al.*, 2012). Cette technique pourrait donc être intéressante pour caractériser la virulence de différentes souches.

La technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) quant à elle, a été décrite pour la première fois en 1993 par Zabeau et Vos. Cette technique consiste à digérer l'ADN bactérien purifié à l'aide de deux enzymes de restriction pour ensuite lier aux extrémités des fragments deux adaptateurs spécifiques à ces sites de restriction. Des amorces PCR complémentaires à ces adaptateurs sont ensuite utilisées pour amplifier les fragments les ayant liés. Les amplicons obtenus sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel ou à l'aide d'un séquenceur (Zabeau et Vos, 1993, Vos, Hogers *et al.*, 1995). Les études sur cette technique ont démontré qu'il était possible d'avoir un niveau de discrimination semblable à celui du PFGE, et ce en moins de temps. Certaines étapes de cette technique, telle que la purification de l'ADN, sont cependant exigeantes techniquement et de la variabilité dans les étapes de digestion et de ligation peuvent mener à des variations dans les patrons obtenus (Autio, Sateri *et al.*, 2000, Yi et Stephen, 2008, Parisi, Latorre *et al.*, 2010). Malgré tout cette technique a été utilisée avec succès dans certaines études afin de faire le lien entre des cas de toxi-infection alimentaire bactérienne et leur source (Dawson, Evans *et al.*, 2006, Little, Pires *et al.*, 2010).

La technique de ribotypage consiste à digérer l'ADN total bactérien à l'aide d'une enzyme de restriction à site de coupure fréquente ce qui permet d'obtenir de petits fragments. L'ADN digéré est ensuite transféré sur une membrane suite à une migration sur gel d'électrophorèse. Des sondes provenant de l'opéron ribosomal sont ensuite utilisées pour identifier les fragments appartenant à l'ADN ribosomal. On obtient ainsi des profils qui peuvent être analysés. Cette technique a une bonne reproductivité inter et intra-laboratoires. Cependant, les études ont démontré que cette technique n'est pas très discriminante chez *Listeria monocytogenes* et que

des ribotypes identiques peuvent être retrouvés dans des groupes clonaux différents (Yi et Stephen, 2008).

Le MLST (Multi-Locus Sequence Typing) a été mis au point en 1998 par Maiden et coll. (Maiden, Bygraves *et al.*, 1998). Cette technique consiste à sélectionner des gènes de ménage (entre 6 et 14) suivi du séquençage d'un fragment interne. Chaque nouvelle séquence pour un gène est considérée comme un nouvel allèle et est identifiée par un nouveau numéro. L'addition des identifiants de chaque allèle permet d'obtenir un code qui identifie l'isolat. Comme les gènes de ménage évoluent lentement, cette technique est utile pour étudier la structure évolutive des populations bactériennes. Cependant, elle peut difficilement discriminer deux souches très fortement apparentées. L'un des avantages principaux de cette technique est qu'elle est basée sur le séquençage. Ainsi les résultats obtenus sont plus faciles à comparer et moins ambigus que les résultats basés sur la visualisation des fragments d'ADN comme le PFGE. Des méthodes utilisant différents gènes de ménage ont été mises au point pour typer *Listeria monocytogenes* avec différents niveaux de discrimination (Salcedo, Arreaza *et al.*, 2003, Meinersmann, Phillips *et al.*, 2004). Le MVLST (Multi-Locus Virulence Sequence Typing) qui a été mis au point par Zhang et coll. en 2004 est une technique qui utilise la même méthode que le MLST standard, mais cible uniquement les séquences de gènes de virulence et de gènes associés à la virulence plutôt que les gènes de ménage pour typer les souches (Zhang, Jayarao *et al.*, 2004). Cette technique semble très discriminante avec un index de Simpson de 0.99 et contrairement aux autres méthodes, peut être utilisée pour donner à elle seule de l'information sur le clone épidémique, le sérotype et la lignée d'une souche (Chen, Zhang *et al.*, 2007).

Le MLVA (Multi-Locus Variable number of tandem repeat Analysis) est une méthode basée sur le typage des éléments génétiques répétés. Pour cette technique, des amorces sont créées pour cibler les répétitions en tandem (RT) présentes dans le génome bactérien. La taille et le nombre de répétitions de chaque loci est alors analysé par électrophorèse capillaire et la combinaison de ces répétitions définit un type (Miya, Takahashi *et al.*, 2012). Cette technique est le deuxième outil génotypique majeur qui a été sélectionné par Pulsenet et un protocole standardisé pour *Listeria monocytogenes* est présentement en validation (Hyytia-Trees, Smole *et al.*, 2006). Les étapes principales de cette méthode sont faciles à standardiser et à automatiser, ce qui peut en faire une technique à haut débit. De plus, cette technique donne des informations sur la phylogénie des souches puisque les RTs sont affectés par des événements évolutifs tels que les mutations et les recombinaisons. Ainsi, cette technique peut donner de l'information sur la parenté génétique de différentes souches (Yi et Stephen, 2008).

Un polymorphisme nucléotidique (SNP) est un marqueur génétique qui, comme son nom l'indique, repose sur une variation d'un seul nucléotide à un site précis. Ces marqueurs possèdent normalement deux allèles dont l'une est fréquente et l'autre rare avec une fréquence d'au moins 1%. La détection directe de ces variations a émergé dans les dernières années comme une méthode de sous-typage très intéressante. Deux principales familles de méthodes ont été mises au point pour le typage SNP. Premièrement il y a les méthodes basées sur l'hybridation directe. Dans ces méthodes, deux sondes sont utilisées, soit une pour chaque allèle. Puisque, sous les conditions optimisées, seule la sonde parfaitement appariée est stable alors que l'autre sonde est instable, il est possible de déterminer quelle allèle est présente chez

la souche étudiée. La deuxième grande famille de technique est basée sur l'extension des amorces. Dans cette méthode, une amorce en amont d'un seul nucléotide ou qui chevauche le SNP est utilisée et c'est l'extension du fragment par l'ADN polymérase qui est évaluée. Dans le cas d'une amorce adjacente, une extension d'un nucléotide par l'ajout de dNTPs spécifiques permet le typage. Alors que dans le cas d'une amorce chevauchante, l'extension ne pourra être effectuée que si l'appariement est parfait. Pour le moment, ces techniques sont cependant assez coûteuses lorsqu'elles sont comparées aux méthodes traditionnelles comme le PFGE et le MLST (Sobrino, Brion *et al.*, 2005, Yi et Stephen, 2008).

Le High resolution melt (HRM) est une méthode qui a été développée en 2003 et qui est basée sur la PCR en temps réel. Cette technique permet d'analyser les variations dans les séquences d'acides nucléiques. Pour ce faire, on mesure le changement de fluorescence causé par le relargage d'un colorant intercalé dans l'ADN d'un produit PCR par la dissociation des deux brins à mesure que la température augmente. Sachant que les différentes séquences auront des températures de dissociation différentes, la courbe de dénaturation formée de la variation de la fluorescence par rapport à la température permet d'identifier les différents génotypes (Gundry, Vandersteen *et al.*, 2003). En 2012 l'équipe de Jin et coll. a mis au point un protocole basé sur la dissociation du gène *ssrA* qui permet l'identification des six espèces les plus fréquentes de *Listeria* (Jin, Luo *et al.*, 2012). Alors qu'en 2011 Pietzka et coll. ont démontré qu'il était possible de sous-typier les souches de *Listeria monocytogenes* et d'identifier les serotypes les plus importants en utilisant le gène *inlB*. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée avec succès lors d'une épidémie en Autriche, en Allemagne et en République tchèque entre 2009 et 2010. Elle y a permis l'identification rapide de deux clones épidémiques. Cette technique possède

l'avantage d'être rapide, peu compliqué et peu coûteuse (Pietzka, Stöger *et al.*, 2011). Cependant, il n'existe cependant pour le moment aucun protocole standardisé ciblant des gènes permettant un sous-typage aussi précis que le PFGE.

Malgré toutes ces nouvelles techniques, le PFGE reste la technique de référence puisque les méthodes standardisées sont bien implantées, qu'il a bien été démontré que cette technique est très discriminante. Elle est donc efficace comme outil dans les études épidémiologiques.

Phylogénie de *Listeria monocytogenes*:

Ce microorganisme peut être divisé en 4 lignées qui ont été identifiées par diverses techniques telles que MLEE et plus récemment par séquençage (Piffaretti, Kressebuch *et al.*, 1989, Rasmussen, Skouboe *et al.*, 1995, Ward, Ducey *et al.*, 2008). Ces quatre lignées contiennent les 13 sérotypes connus de *Listeria monocytogenes*. Les 13 sérotypes sont nommés comme suit : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, et 7 (Wagner et McLauchlin, 2008). La lignée I contient les sérotypes 1/2b, 3b, 3c et 4b et la lignée II le 1/2a, 1/2c et 3a (Tableau III). Ces deux lignées sont les plus importantes du point de vue de la santé publique puisqu'elles contiennent les sérotypes 1/2a, 1/2b, 4b fréquemment associés à des cas humains (McLauchlin, Mitchell *et al.*, 2004). En effet, dans la très grande majorité des cas au Canada (90%), ce sont ces sérotypes qui sont mis en cause (Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007, Clark, Farber *et al.*, 2010). C'est le sérotype 4b qui est le plus fréquemment lié à des éclosions de listériose. Cependant des éclosions liées aux sérotypes 1/2b et 1/2a ont aussi été rapportées (Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007). Les lignées III et IV quant à elles ont été identifiées plus récemment et contiennent toutes deux des souches de sérotypes 4a, 4b et 4c, mais sont principalement associées aux ruminants (Rasmussen, Skouboe *et al.*, 1995, Ward, Ducey *et al.*, 2008, Orsi, Bakker *et al.*, 2011). Des souches de la lignée III ont été isolées dans des cas sporadiques chez les humains, mais n'ont jamais été rapportées comme responsables d'éclosions. L'hypothèse que ces souches puissent occuper des niches écologiques différentes que celles des souches plus fréquemment retrouvées et qu'elles puissent infecter les humains par des sources autres que les aliments a été émise (Gerner-Smidt et Scheutz, 2006, Roberts, Nightingale *et al.*, 2006). Cependant, une étude récente laisse plutôt penser que certaines souches de la lignée III, comme celles du sérotype 4a, pourraient avoir subi une évolution

réductive, soit une perte de gènes, ce qui aurait mené à une perte de certains facteurs de virulence et une atténuation de leur virulence (Hain, Ghai *et al.*, 2012).

Clones épidémiques :

Les études épidémiologiques ont démontré que toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ne sont pas égales quant à la fréquence d'isolement dans les épidémies et que certaines souches retrouvées fréquemment lors de ces événements étaient fortement apparentées. Ainsi, le concept de clone épidémique a été développé pour décrire des souches provenant d'épidémies sans relations temporelles et géographiques, mais qui pourraient avoir des ancêtres communs. Jusqu'à aujourd'hui, au moins 5 clones épidémiques ont clairement été identifiés. Le clone épidémique I a été le premier à être identifié et son implication dans plusieurs épidémies tant en Amérique qu'en Europe a été démontrée. À cause du manque de standardisation dans les méthodes génotypiques, aucune définition exacte d'un clone épidémique n'est disponible (Chenal-Francisque, Lopez *et al.*, 2011). Cependant, il semble que chacun de ceux-ci possède des caractéristiques génétiques communes. Par exemple, chez le clone I, qui a été le plus étudié, l'ADN génomique est résistant à la digestion par l'enzyme de restriction *Sau3AI* ce qui suggère une méthylation de certains sites de restriction, ces souches possèdent aussi des profils RFLP distincts des autres souches du sérotype 4b et possèdent plusieurs gènes et groupes de gènes normalement absents chez les souches de ce sérotype (Ying, Robin *et al.*, 2008). Les autres clones épidémiques ont été découverts plus récemment; on possède moins d'information sur leurs caractéristiques. On sait cependant que les clones II, IV et V sont aussi du sérotype 4b, comme le clone I, alors que le clone III est du sérotype 1/2a. Récemment des chercheurs canadiens ont aussi mis en évidence la présence d'une du sérotype 1/2a qui a été largement présent dans les cas humains lors des 20 dernières

années. Cette souche a entre autres été responsable des éclosions liées aux fromages et aux viandes froides en 2008. D'après ces auteurs cette souche pourrait être considérée comme un nouveau clone épidémique (Knabel, Reimer *et al.*, 2012).

Lignée I :

Comme il a été expliqué précédemment, la lignée I est l'une des plus importantes puisqu'elle contient les souches de certains des sérotypes les plus fréquemment associés à des cas cliniques chez l'humain. En effet, même s'il a été démontré que la lignée I est moins représentée dans l'environnement de la production alimentaire que certaines autres, il semble que celle-ci soit responsable d'un plus grand nombre de cas humains. Cette présence marquée dans les cas humains n'est pas due à une surexposition, puisque ces souches sont moins fréquentes dans l'environnement. Elle est plutôt expliquée par le fait que certaines des souches de cette lignée sont plus pathogènes. En effet, ce sont les souches du sérotype 4b qui sont considérées comme les souches les plus virulentes et qui sont le plus souvent responsables d'éclosions (Hong, Doumith *et al.*, 2007). De plus, quatre des cinq clones épidémiques qui ont été identifiés par MLST et qui ont été responsable de plusieurs éclosions en Amérique du Nord sont du sérotype 4b (Ying, Robin *et al.*, 2008). Les autres sérotypes de cette lignée peuvent être associés à des cas humains, mais beaucoup plus rarement (Ying, Robin *et al.*, 2008). Cependant, il est intéressant de prendre en note, que dans certaines régions du monde, tel que le nord de l'Europe, il semble que ce soit le sérotype 1/2a, faisant partie de la lignée I, qui soit le plus fréquemment retrouvé dans les cas humains (Parihar, Lopez-Valladares *et al.*, 2008). Une souche particulièrement virulente de ce pulsotype a été responsable d'une éclosion au Canada en 2008 (Gilmour, Graham *et al.*, 2010). Le clone épidémique III fait entre autre partie de ce sérotype. Récemment, l'équipe de Knabel et coll. a mis en lumière la possible

présence d'un nouveau clone épidémique de sérotype 1/2a au Canada (Knabel, Reimer *et al.*, 2012). Cette sur-représentation des souches de la lignée I dans les cas humains pourrait être due entre autres, à la présence d'une internaline A complète chez toutes les souches alors que chez celles de la lignée II, on a retrouvé fréquemment un codon stop prématuré dans ce gène. Des études ont permis de retrouver ce phénotype chez plus de 30% des souches de cette lignée alors qu'elle était absente chez les souches de lignée I (Jacquet, Doumith *et al.*, 2004, Nightingale, Windham *et al.*, 2005). La présence de cette mutation mène à la production d'une internaline A tronquée et qui est sécrétée ou même à l'arrêt complet de la production (Chen, Ross *et al.*, 2011). Comme il sera discuté plus en profondeur plus loin, l'internaline A est un des facteurs de virulence principal de *Listeria monocytogenes* et permet à la bactérie de pénétrer à l'intérieur des cellules de l'intestin pour débiter son cycle intracellulaire. Il a été démontré que lors d'une contamination de cochons d'Inde par voie orale, les souches possédant cette mutation étant associé à une forte réduction de la virulence (Nightingale, Ivy *et al.*, 2008). De plus, récemment il a été démontré que certaines souches de la lignée I possède un facteur de virulence supplémentaire; la listeriolysine S est responsable d'une augmentation de la virulence chez l'homme (Cotter, Draper *et al.*, 2008).

Lignée II :

La plupart des études qui ont été mené sur le sujet concluent que les souches de la lignée II sont les plus fréquemment isolées tant dans l'environnement de l'usine que sur les produits alimentaires (Thevenot, Delignette-Muller *et al.*, 2005, Chen, Zhang *et al.*, 2009, Orsi, Bakker *et al.*, 2011, Zhu, Feng *et al.*, 2012). Cependant, dans certains cas, des auteurs ont plutôt rapporté la présence majoritaire de souches de la lignée I (Olsen, Patrick *et al.*, 2005, Chen,

Chen *et al.*, 2010, Orsi, Bakker *et al.*, 2011). La théorie qui est la plus fréquemment acceptée pour expliquer la sur-représentation de la lignée II dans l'environnement de l'usine et dans les produits alimentaires est que ces souches sont mieux adaptées à la croissance et à la persistance dans ces environnements. On rapporte dans la littérature une souche de cette lignée ayant causé des cas sporadiques en 1998, qui semble avoir persisté dans une usine pendant plus de 12 ans (Olsen, Patrick *et al.*, 2005). Plusieurs études ont démontré qu'il existe des différences entre les différentes lignées quant à leur variabilité génétique. En effet, lorsqu'elles sont comparées aux souches de la lignée I, il semble que les souches de la lignée II soient moins stables génétiquement. Ainsi, ces souches seraient plus susceptibles à la recombinaison. De plus, la grande variété d'environnements où ces souches sont retrouvés les expose à une variété de pression sélective de l'environnement, ce qui pourrait expliquer la meilleure capacité à survivre et à s'adapter aux stress de l'environnement tel que la dessiccation (den Bakker, Didelot *et al.*, 2008, Orsi, Sun *et al.*, 2008). D'autres auteurs ont aussi émis l'hypothèse que les bouillons de culture contenant de l'acide nalidixique et de l'acriflavine utilisés lors de l'enrichissement pour la détection de *Listeria monocytogenes*, favoriseraient les souches de lignée II, ce qui biaiserait les résultats. Ces milieux de culture permettraient une meilleure croissance des souches de la lignée II, empêchant par le même fait la croissance des souches de la lignée I (Bruhn, Vogel *et al.*, 2005). Ainsi, les souches de lignées I seraient sous-détectées par les méthodes bactériologiques classiques.

Il semble que la virulence et la capacité des souches de *Listeria monocytogenes* à survivre dans les environnements hostiles sont donc des caractéristiques qui sont très variables entre les différentes lignées, mais aussi entre les différentes souches de ce microorganisme à l'intérieur

d'une même lignée. Des auteurs ont d'ailleurs mis en évidence la présence de certaines souches qui pourraient être faiblement ou non-pathogènes (Roche, Velge *et al.*, 2001, Tompkin, 2002). À part ces exceptions, il semble que cette espèce soit associée à des souches ayant la capacité d'engendrer la listériose à différents niveaux de pathogénicité.

Facteurs de virulence :

Trois îlots de pathogénicité sont présents chez les *Listeria*. Les principaux facteurs de virulence de *Listeria monocytogenes* sont encodés sur un îlot de pathogénicité nommé LIPI-1 et sont sous le contrôle d'une protéine régulatrice nommée facteur de régulation positive A (PfrA). C'est un activateur transcriptionnel qui est dépendant de la température. En effet, à une température sous 37°C, l'ARNm du gène *pfrA* forme une structure secondaire qui masque la région de liaison ribosomale. Ainsi, lors de l'infection dans le corps humain à 37°C, cette structure se défait, le ribosome peut s'attacher et la protéine PfrA peut être exprimée ce qui permet l'expression des différents facteurs de virulence (Hamon, Bierne *et al.*, 2006).

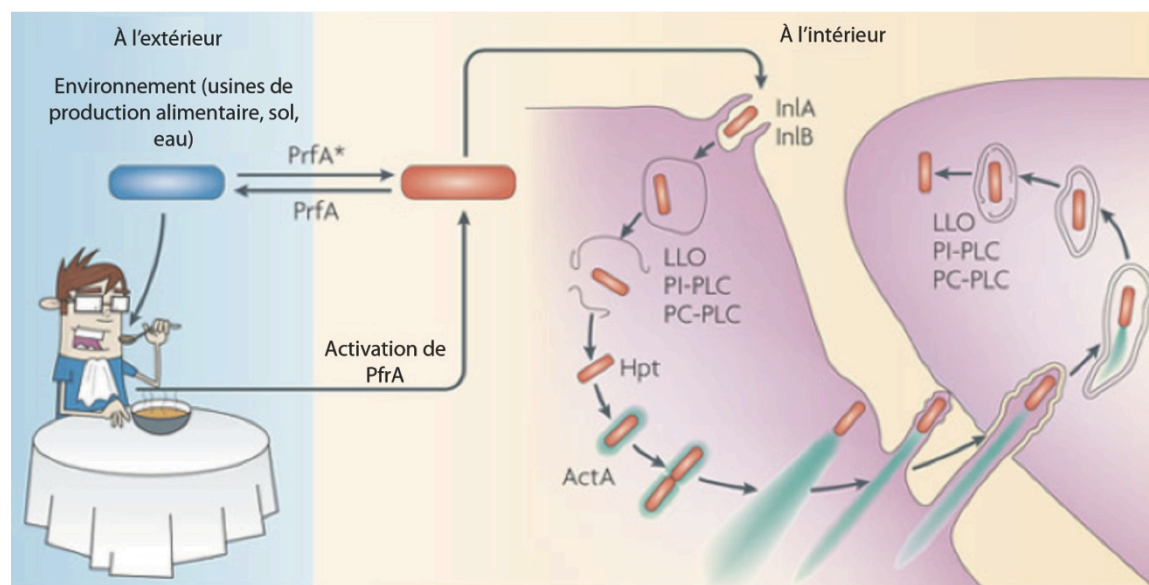


Figure 2. Rôle de l'activateur transcriptionnel PfrA dans l'activation des principaux facteurs de virulence à l'intérieur du corps humain (tous les facteurs cités dans la partie droite de la figure sont sous contrôle positif de PfrA).

Adapté de (Freitag, Port *et al.*, 2009)

Listeria monocytogenes est un microorganisme pathogène intracellulaire facultatif et peut survivre et se multiplier dans un grand nombre de types de cellules tels que les macrophages dans lesquels elle pénètre par phagocytose, mais aussi dans les cellules épithéliales dans lesquelles elle pénètre de façon active. Lors de l'infection, la bactérie adhère à la cellule à l'aide de trois protéines retrouvées à sa surfaces soit Ami (Milohanic, Jonquieres *et al.*, 2001), FbpA (Gilot, Andre *et al.*, 1999) et IAP (Pandiripally, Westbrook *et al.*, 1999) (Tableau IV). Elle pénètre ensuite la cellule à l'aide d'internalines telles que les internaline A (InlA) et internaline B (InlB). Elles permettent respectivement de pénétrer dans les cellules possédant le récepteur E-cadherine (cellules épithéliales) et dans les hépatocytes qui ont comme récepteur MET, le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes. L'interaction entre les internalines et leur récepteurs déclenchent le recrutement de protéines intracellulaires eucaryotes qui provoquent l'internalisation tel les caveolines, les clathrines et l'actine (Figure 3) (Bonazzi, Lecuit *et al.*, 2009, Pizarro-Cerdá, Bonazzi *et al.*, 2010).

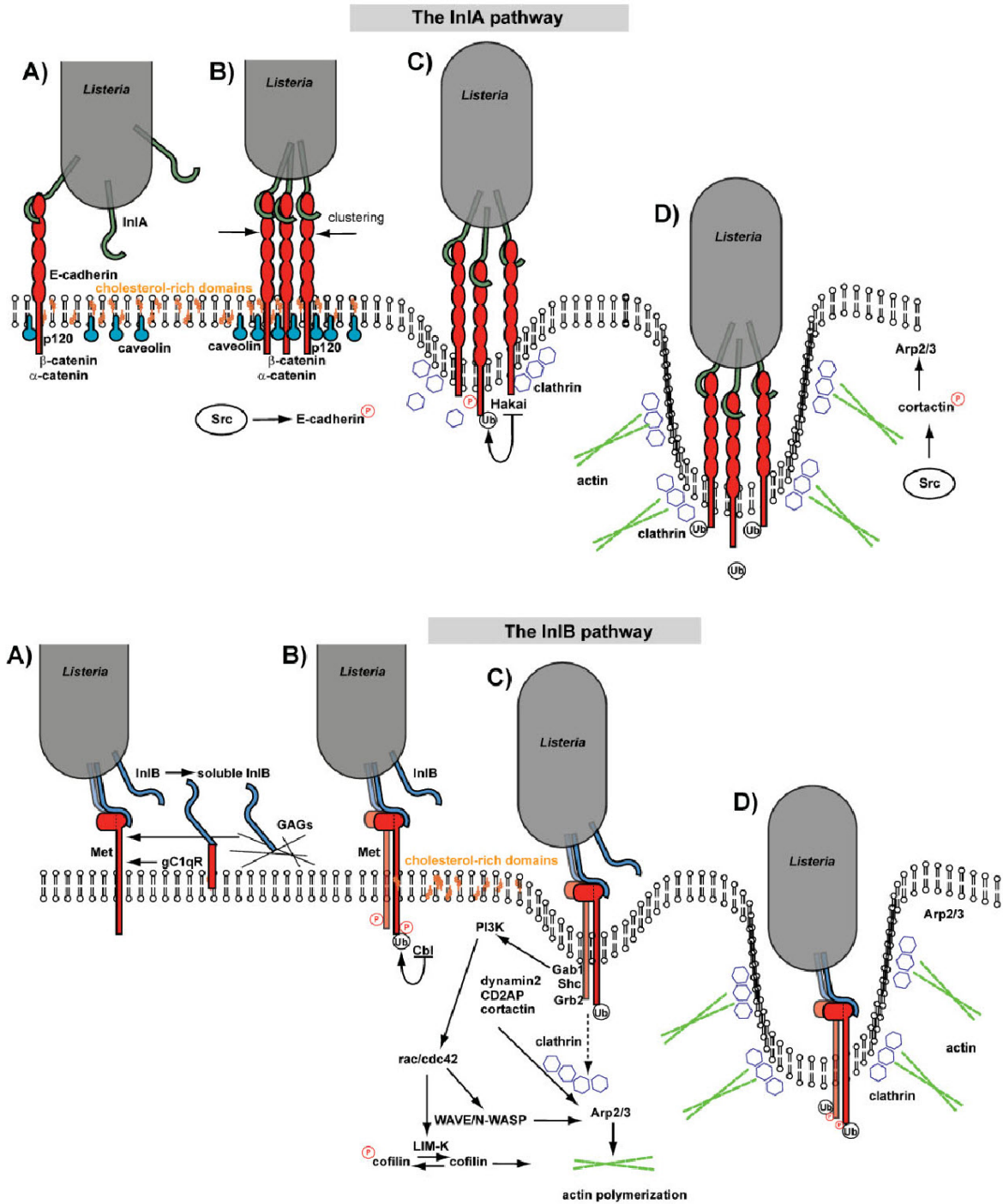


Figure 3. Mécanismes d'intérialisation de *Listeria monocytogenes* par la voie InIA (A) et InIB (B).

Adapté de (Pizarro-Cerdá, Bonazzi *et al.*, 2010)

Suite à l'entrée de la bactérie dans la cellule, la listériolysine O (LLO) une cytolysine qui forme des pores, (Schnupf et Portnoy, 2007) en conjugaison avec deux phospholipases C (PI-PLC et PC-PLC) (Smith, Marquis *et al.*, 1995) permettent à la bactérie de détruire le phagosome formé lors de l'invasion. La listériolysine O est une toxine hémolytique de la famille des toxines formatrices de pores, activée par le thiol et dépendante du cholestérol (CDTX) qui est encodée sur le gène *hly*. Les monomères de cette toxine peuvent se lier au cholestérol de la cellule et s'oligomériser pour former des pores d'une taille de 35 nm. Comme cette toxine a une activité optimum à un pH de 5.5, son activité est forte dans les vacuoles alors qu'elle perd son activité dans le cytosol (Schuerch, Wilson-Kubalek *et al.*, 2005). Les deux phospholipases agissent en conjugaison avec la LLO. La PI-PLC encodée par le gène *plcA* est hautement spécifique pour le phosphatidylinositol et est active à des pH acides, alors que la PC-PLC qui est encodée par *plcB* est capable d'hydrolyser un plus large spectre de substrats tel que les phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, et sphingomyéline, alors qu'elle n'agit pas sur le phosphatidylinositol. De plus, la PC-PLC doit être activée par une métalloprotéase Mpl qui, par son activité protéolytique transforme la pro-PC-PLC en sa forme active et semble surtout associée à la destruction de la vacuole secondaire. La bactérie se retrouve ensuite libre dans le cytosol de la cellule et peut utiliser les nutriments qu'elle contient pour se répliquer. Dans ce milieu, *Listeria monocytogenes* exprime certains facteurs de virulence qui permettent de profiter au maximum des nutriments disponibles à l'intérieur du cytosol. Par exemple, Hpt qui est un transporteur d'hexose-phosphate est un homologue d'une translocase des mammifères et qui permet d'alimenter la croissance rapide de cette bactérie à l'intérieur de la cellule. Hpt est le premier facteur de virulence qui a été identifié

comme spécifiquement associé à la réplication dans la phase intracellulaire du pathogène (Chico-Calero, Suárez *et al.*, 2002, Goldfine, Shen *et al.*, 2007, Schnupf et Portnoy, 2007). La bactérie peut ensuite se propager de cellule en cellule sans passer par le milieu extracellulaire en utilisant le cytosquelette d'actine de la cellule évitant ainsi le système immunitaire de l'hôte. En effet, la protéine ActA retrouvée de façon polarisée à la surface de la cellule bactérienne provoque la polymérisation de l'actine intracellulaire en forme de « queue de comète » ce qui permet le déplacement de la bactérie d'une cellule à l'autre (Suarez, Gonzalez-Zorn *et al.*, 2001). Cette protéine a une distribution polaire sur la cellule et elle se retrouve en grande quantité sur la partie conservée de la bactérie suite à la division (Rafelski et Theriot, 2005). Le complexe Arp2/3 s'attache directement à ActA et initie la polymérisation de l'actine par son activité de nucléation qui est significativement activée par ActA. Les filaments qui sont créés poussent vers la surface de la bactérie, ce qui produit une force motrice et qui permet à la bactérie de se déplacer à 1.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ dans le cytoplasme et lui permettre de rejoindre l'intérieur d'une cellule eucaryote adjacente (Figure 2). Des protéines cellulaires sont aussi recrutées dans la structure de la queue telle que les protéines de coiffe qui empêchent la polymérisation des plus vieux filaments, l' α -actinine qui forme des liens entre les filaments et l'ADF/cofiline qui permet un désassemblage de ceux-ci (Michael, Mariela *et al.*, 2008). La vacuole secondaire formée des membranes des deux cellules lors du déplacement (Figure 2) est ensuite détruite par la LLO et la phosphatidylcholine phospholipase C comme il a été expliqué précédemment. La bactérie peut alors atteindre la circulation sanguine et se disséminer dans plusieurs organes tels que le foie, la rate, le placenta et dans les cas les plus extrêmes elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le cerveau et causer une méningite (Goldfine, Shen *et al.*, 2007).

L'îlot de pathogénicité 2 (LIPI-2), qui code des phosphocholinestérases permettant une utilisation efficace des phospholipides dans les érythrocytes des ruminants, n'est présent quant à lui que chez *Listeria ivanovii* (Wagner et McLauchlin, 2008). Comme il a été mentionné précédemment, certaines souches de *Listeria monocytogenes* possèdent un facteur de virulence supplémentaire. En 2008, une nouvelle hémolysine nommée lystériolysine S (LLS), encodée sur un gène présent sur l'îlot de pathogénicité LIPI-3, a été identifiée. Des études bio-informatiques semblent démontrer que LLS fait partie d'une famille de peptides de virulence modifiés qui contient entre autres la Streptolysine S. Il a été démontré que ce peptide joue un rôle dans la survie du pathogène dans les polymorphonucléaires humains et contribue à la virulence chez les souris (Cotter, Draper *et al.*, 2008).

Tableau IV. Protéines associées à la virulence de *Listeria monocytogenes*.

Régulation	
PrfA	Régulateur central de la virulence
SigmaB	Facteur de transcription général du stress
VirS/VirR	Signal de transduction à deux composantes répondant à la présence d'antibiotiques agissant sur la paroi cellulaire
CheY/CheA	Abolir la réponse au gradient d'oxygène et réduit le nombre de flagelles
AgrA/AgrC	La délétion de AgrA cause une réduction de la virulence chez la souris, mais n'affecte pas l'invasion et la multiplication <i>in vitro</i>
Stp	Régulation de EF-Tu et contrôle de la survie bactérienne dans l'hôte
DegU	Régulateur pléiotropique participant à l'expression de la mobilité à basse température et à la virulence chez les souris
Adhésion et invasion	
FbpA	Protéine liant la fibronectine et requise pour la colonisation du foie et de l'intestin de la souris. Protéine chaperon ou escorte de InlB et LLO
Ami	Amidase autolytique requise pour l'adhésion cellulaire
InlA	Entrée dans les cellules exprimant le récepteur E-cadherine
SrtA	Établit l'encrage de InlA à la surface bactérienne
InlB	Entrée dans les cellules exprimant les récepteurs gC1qR, HGF-SF ou Met et les glycosaminoglycanes
InlC ou Irp	La délétion de InlC réduit la virulence chez les souris, mais n'affecte pas la réplication <i>in vitro</i> dans les lignées cellulaires testées
InlC2, D, E, F	L'entrée dans la cellule n'est pas affectée chez les mutants n'ayant pas ces gènes et pourrait donc être associée à d'autres aspects de l'infection
InlG, H, E	Les mutants démontrent une réduction de la virulence <i>in vivo</i> sans affecter l'entrée dans les cellules épithéliales ou la multiplication intracellulaire
InlI et InlJ	La délétion de InlJ réduit la virulence chez les souris infectées exprimant la E-cadherine humaine
P60 (Iap)	Requise dans l'invasion des phagocytes 3T6 de la souris et impliquée dans la division cellulaire
LpeA	Favorise l'entrée dans les phagocytes non professionnels (cellules épithéliales et hépatocytes), mais pas dans les macrophages
Auto	Requise pour l'entrée dans les cellules eucaryotes non phagocytaires, un mutant démontre une virulence réduite après inoculation i.v et orale, indépendante de PrfA
Vip	Requis pour l'entrée dans certaines cellules de mammifères
IspC	Autolysine et vise la réponse immunitaire humorale
Lyse des vacuoles	
LLO	Requise pour la lyse de la membrane du phagosome
LLS	Seconde hémolysine/cytotoxine
SvpA	Favorise la fuite des bactéries hors du phagosome des macrophages

PI-PLC	Participe à la lyse de la vacuole
PC-PLC	Activée par le clivage de Mpl ou une protéase cellulaire, requise pour la lyse de la vacuole à double membrane
Mpl	Requise pour la maturation de PC-PLC
Multiplication intracellulaire	
Hpt	Augmente la prolifération intracytosolique
Lp1A1	Requise pour la croissance dans le cytosol Dissémination de cellule à cellule
ActA	Protéine de surface nécessaire à l'assemblage de l'actine
Autres fonctions	
HtrA	Participe à la réponse au stress (pH bas et pénicilline G)
Bsh	Participe à la phase hépatique et intestinale de la listériose
Hfq	Requise pour la tolérance au stress osmotique et à l'éthanol et important pour la survie dans des conditions limitées en acides aminés.
ClpC	Protéine de stress qui favorise la fuite rapide du phagosome des macrophages
ClpE	Participe à la division cellulaire et requise pour la survie prolongée à 42°C
ClpP	Participe à la protéolyse et est requise pour la croissance sous stress
Frm	Protéine semblable à la ferritine
L2537	Biogenèse de l'acide teichoïque
MogR	Répression de l'expression de la flagelline
SOD	Superoxide Dismutase

Adapté de (Roche, Velge *et al.*, 2008)

Survie de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement de production alimentaire :

Température :

Comme il a été mentionné précédemment, *Listeria monocytogenes* possède la capacité de croître à des températures de réfrigération entre 2 et 4°C, ce qui en fait un microorganisme pathogène très difficile à contrôler dans un environnement de production alimentaire. Plusieurs changements s'opèrent dans la cellule bactérienne pour s'adapter aux changements de température. En effet, on remarque tout d'abord un changement de la membrane cellulaire de façon à lui conserver une fluidité optimale, ce qui est important pour l'activité enzymatique et le transport transmembranaire. On voit ainsi une réduction de la longueur des chaînes d'acides gras, avec une augmentation des chaînes C15:0 aux dépens des chaînes C17:0 (Annous, Becker *et al.*, 1997). Les changements de température ont aussi un effet sur l'expression de protéines. En effet, plusieurs protéines telles que les protéines de froid choc (CSP) et protéines d'acclimatation au froid (CAP) sont produites. Le rôle de ces protéines n'est pas encore bien connu, mais elles pourraient être des protéines chaperonnes qui lient l'ADN et l'ARN et aident ainsi les processus de réplication, de transcription et de traduction à basses températures (Schmid, Klumpp *et al.*, 2009). La croissance de *Listeria monocytogenes* à basses températures est aussi stimulée en présence de certaines solutions cryoprotectrices compatibles telles que la glycine bêtaïne et la carnitine. Ces produits sont transportés dans la cellule par des systèmes qui sont surexprimés à basse température telle que les systèmes de transport glycine bêtaïne transporteur I (BetL), glycine bêtaïne transporteur II (Gbu) et le carnitine transporteur (OpuC) (Angelidis et Smith, 2003). Ces produits solubles agiraient en stabilisant les protéines et en augmentant le volume d'eau libre dans le cytosol (Ko, Smith *et*

al., 1994). Il semble qu'au moins une partie de l'adaptation au stress soit contrôlée par le facteur Sigma alternatif B (Chaturongakul et Boor, 2006). Les facteurs Sigma sont des facteurs d'initiation de transcription bactérienne qui permet la liaison de l'ARN polymérase à des promoteurs. Ainsi, la présence de facteurs Sigmas spécifiques permet d'initier la transcription rapide de gènes lors de changements dans les conditions environnementales (Chan et Wiedmann, 2008). Chez *Listeria monocytogenes*, le facteur Sigma B a été identifié comme un facteur important de la réponse au stress qui contrôle l'adaptation de *Listeria* à une large gamme de conditions environnementales parfois adverses. Ainsi il a été démontré qu'en condition acide, de stress osmotique, de stress oxydatif, de manque de carbone et de basse température, l'activité et la transcription des gènes associés à ce facteur sont augmentées (Chan et Wiedmann, 2008). Dans le cas de la réponse au froid, il a été démontré que l'absence de ce facteur nuisait à l'accumulation des cryoprotecteurs carnitine et bétaïne et que ces bactéries avaient ainsi une croissance moins rapide à une température de 8°C (Gandhi et Chikindas, 2007).

Biofilms :

La capacité de *Listeria monocytogenes* à former des biofilms est l'une des caractéristiques très importantes de ce microbe ayant un impact important dans l'industrie alimentaire. En effet, ceux-ci peuvent se former sur une grande variété de surfaces dans les usines de production alimentaire telles que les surfaces d'acier inoxydable ou de plastique qui entre dans la composition des les équipements et les convoyeurs (Stepanović, Ćirković *et al.*, 2004). Un biofilm se forme lorsqu'une bactérie s'attache et colonise un environnement en produisant une matrice tridimensionnelle composé de substances polymériques extracellulaires (exopolysaccharydes), d'ADN extracellulaire et des peptidoglycanes (Harmsen, Lappann *et*

al., 2010). L'adhésion de *Listeria monocytogenes* au substrat a été attribuée à plusieurs facteurs tels que la présence de flagelles, les interactions hydrophiles et la synthèse de polysaccharides (EPS) (Ryser et Marth, 2007). Plusieurs études ont démontré l'importance de la mobilité flagellaire dans l'adhésion de cette bactérie et la formation de biofilms (Lemon, Higgins *et al.*, 2007, Todhanakasem et Young, 2008). En effet, celle-ci propulse la pathogène vers la surface contrant ainsi la répulsion des forces électrostatiques, et permet l'attachement à la surface (Ryser et Marth, 2007). Comme il a été expliqué précédemment, *Listeria monocytogenes* ne produit pas de flagelles à des températures supérieures à 37°C. Plusieurs intervenants entrent en jeu dans la régulation de la production des flagelles. En effet, la transcription des gènes de mobilité flagellaire est sous le contrôle de l'activité commune du répresseur MogR et de l'anti-répresseur GmaR et du régulateur de réponse DegU. Le répresseur MogR est produit de façon constitutive par la cellule et peut lier la région promotrice du gène de GmaR (*fliN-gmaR*) et tous les promoteurs des gènes liés à la mobilité flagellaire. L'anti-répresseur GmaR quant à lui interfère avec la liaison de MogR à ces sites par interaction protéine-protéine, mais il peut aussi défaire la liaison MogR-ADN. GmaR n'est cependant pas stable à des températures de plus de 37°C. Le régulateur de réponse DegU quant à lui est exprimé de façon constitutive et indépendamment de la température et se lie en amont de la région promotrice de GmaR (*p_{fliN-gmaR}*) pour promouvoir la transcription. À une température de 37°C, MogR inhibe la transcription des gènes liés à la mobilité. Aussi, les activités opposées de ce répresseur et de l'activateur DegU sur le promoteur *p_{fliN-gmaR}* ont comme résultat une transcription très faible de *fliN-gmaR*. Cependant, toutes les protéines GmaR produites à 37°C ne peuvent interagir avec MogR et sont rapidement dégradées (Figure 4). Lorsque la température descend sous 37°C, GmaR subi un changement de conformation,

n'est plus dégradé et peut alors interagir avec MogR (Figure 4). GmaR retire MogR alors du promoteur *fliN-gmaR* ce qui augmente la transcription de *gmaR*. Ceci augmente le niveau de GmaR et permet l'anti-répression de tous les promoteurs des gènes de mobilité et la transcription des gènes de mobilité flagellaire (Figure 4). Lorsque la température remonte au-dessus de 37°C, le complexe MogR:GmaR est déstabilisé par un changement conformationnel chez GmaR. MogR est donc libéré et retourne lier les divers promoteurs (Kamp et Higgins, 2011).

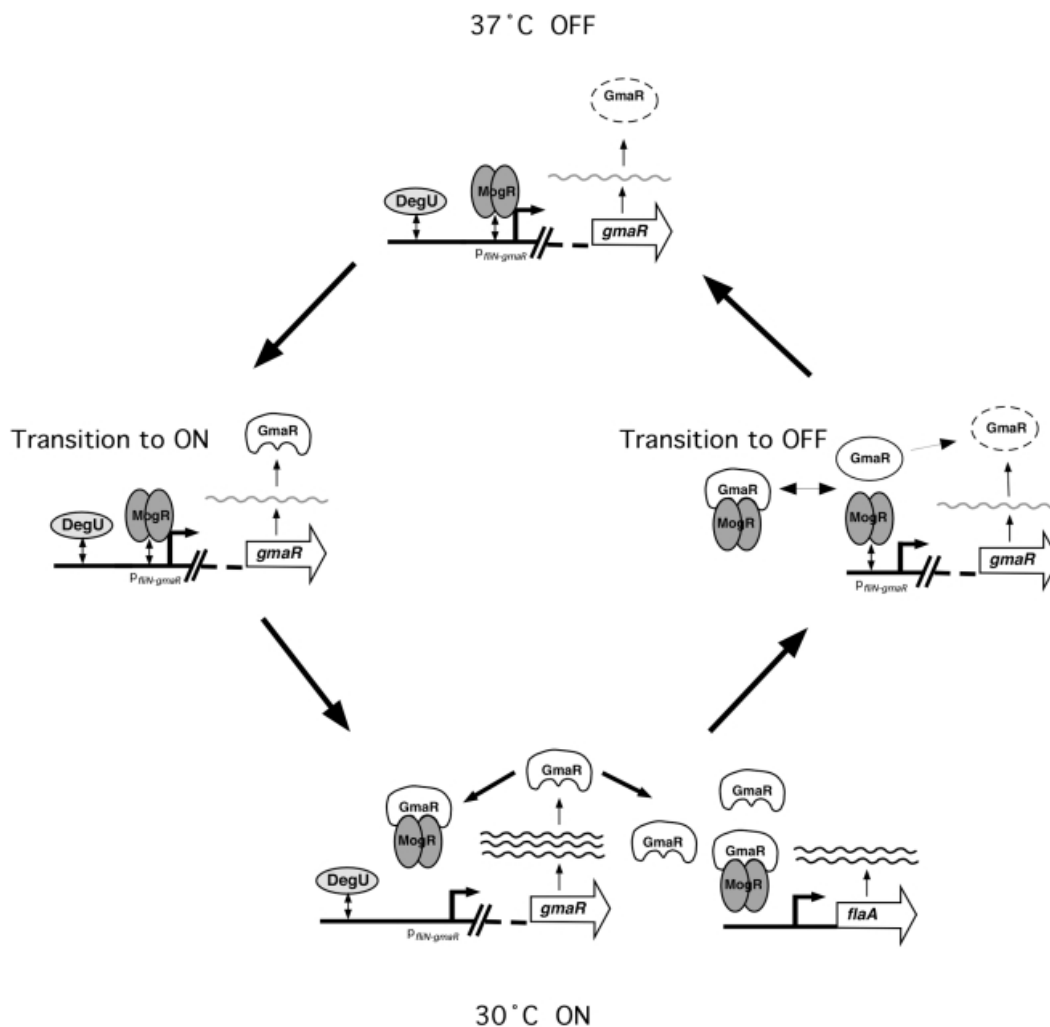


Figure 4. Mécanisme de régulation de la mobilité de *Listeria monocytogenes*.

Adapté de (Kamp et Higgins, 2011)

Comme il a été mentionné précédemment, la mobilité flagellaire favorise l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces dans l'usine. Ainsi, aux faibles températures retrouvées dans les usines alimentaires, ce mécanisme est impliqué dans la formation de biofilms. Il a cependant été démontré que malgré cette bonne adhésion, la complexité des biofilms formés à 4°C est faible, ne comprenant qu'une faible quantité d'EPS et quelques groupes de cellules bactériennes (Di Bonaventura, Piccolomini *et al.*, 2008). Ces auteurs suggèrent que cette faible complexité pourrait être due à la plus lente croissance des cellules à de faibles températures. Les cellules organisées en biofilms démontrent un patron d'expression spécifique de leurs gènes et des caractéristiques spécifiques de vitesse de croissance. En effet, il a été démontré qu'au froid, des gènes associés au métabolisme du carbone, à la réponse au stress, à la régulation du quorum sensing, à la réparation de l'ADN et à la multiplication cellulaire, étaient activés alors que l'on notait une diminution de la production de la flagelline qui est principalement utile dans les premiers stades de la formation des biofilms (Donlan et Costerton, 2002). Sous cette forme de biofilm, les cellules bactériennes sont beaucoup plus résistantes à la dessiccation, mais aussi aux produits de lavage et de désinfection, que les cellules planctoniques (Harmsen, Lappann *et al.*, 2010, Hansen et Vogel, 2011). Certains auteurs ont lié la capacité à former des biofilms et la lignée des souches. En effet, d'après les études de Djordjevic et coll., les souches de lignées I produisent en moyenne plus de biofilms que celles de la lignée II (Djordjevic, Wiedmann *et al.*, 2002). Des résultats contraires ont cependant été obtenus par d'autres groupes (Norwood et Gilmour, 1999, Borucki, Peppin *et al.*, 2003b). Certains auteurs ont aussi lié la meilleure performance de certaines souches dans la formation de biofilms à la persistance dans les usines de production alimentaire (Borucki,

Peppin *et al.*, 2003a). Ainsi, il existe un risque de contamination du produit ou d'une recontamination de l'environnement à partir de ces biofilms, et ce, même après le protocole de lavage et de désinfection (Borucki, Peppin *et al.*, 2003b, Stepanović, Ćirković *et al.*, 2004, Pan, Breidt *et al.*, 2006a, Hansen et Vogel, 2011).

Persistence / Récurrence :

Les souches de *Listeria monocytogenes* qui sont isolées à plusieurs occasions successives dans une entreprise agroalimentaire peuvent être qualifiées de persistantes ou récurrentes. La définition de ce qu'est une souche persistante est assez polémique et très importante pour le développement des politiques de surveillance. La majorité des auteurs s'entendent pour dire qu'une souche persistante est une souche qui peut s'établir dans l'environnement et y survivre sur une longue période de temps. Les structures de type biofilm interviennent alors dans ce phénomène de persistance (Carpentier et Cerf, 2011). Ainsi, si l'on tient pour acquis que la contamination des produits est principalement causée par ces souches présentes dans l'environnement, il est conséquent de mettre les efforts de surveillance à la fin de la chaîne de production et sur le produit. Cependant, si cette contamination est plutôt causée par des souches qui sont amenées en continu dans l'environnement et qui ne sont pas persistantes, mais récurrentes, il sera plus important de contrôler *Listeria monocytogenes* dans les étapes en amont. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la nature des souches persistantes dans l'environnement de la production alimentaire et aux caractéristiques qui les différencient des souches qui sont transitoires dans cet environnement. En effet, certains auteurs ont avancé que ces souches auraient des avantages évolutifs par rapport aux autres. Ainsi, elles pourraient être plus tolérantes et résistantes aux produits utilisés lors du processus de lavage et de désinfection tels les composés ammoniums quaternaires (QAC). Il a été démontré que suite à une

exposition sublétales aux QAC, *Listeria monocytogenes* peut s'adapter et ainsi augmenter sa tolérance à une exposition future (Lunden, Autio *et al.*, 2003). Il semble que cette adaptation soit au moins en partie due à la surexpression d'une pompe à efflux (Mdr1) (Romanova, Wolffs *et al.*, 2006). Les mécanismes de résistance naturelle ne sont pas encore bien compris et plusieurs systèmes pourraient être en jeu, tel que la modification de la composition de la membrane ou la présence de pompes à efflux (Romanova, Favrin *et al.*, 2002, Romanova, Wolffs *et al.*, 2006, Carpentier et Cerf, 2011). Ces souches résidentes pourraient aussi être plus résistantes aux stress présents dans l'environnement de l'usine et elles pourraient plus facilement s'attacher sur les surfaces et ainsi former des biofilms plus difficiles à déloger (Borucki, Peppin *et al.*, 2003b, Lunden, Autio *et al.*, 2003, Adriaio, Vieira *et al.*, 2008). Certains auteurs tels que Carpentier et Cerf, soutiennent plutôt que la persistance des souches est due à l'installation de celles-ci dans des sites appelés refuges. Il s'agirait des sites difficiles à atteindre lors du protocole de lavage et de désinfection, par exemple des fissures ou de petits espaces où l'infiltration d'eau est possible. En effet, la présence de *Listeria monocytogenes* sur des sites difficiles ou impossibles à bien nettoyer ou sur des équipements à la conception déficiente a été rapportée (Carpentier et Cerf, 2011). Ainsi, ces souches persistantes ne seraient pas différentes des autres, mais seraient seulement protégées par ces sites pour être redistribuées par aérosols ou par contact lors du fonctionnement de l'usine et ainsi recoloniser les surfaces et ce, jusqu'au prochain cycle de lavage et de désinfection (Carpentier et Cerf, 2011). La présence d'une microflore particulière dans l'environnement de l'usine pourrait elle aussi participer à l'établissement de souches persistantes dans l'usine. En effet, il a été proposé que la présence d'une souche accompagnatrice pourrait protéger *Listeria monocytogenes* de la dessiccation et de la désinfection par la production d'exopolysaccharides (Carpentier et Cerf,

2011). Des études *in vitro* ont en effet démontré une augmentation de la densité de l'attachement chez les *Listeria monocytogenes* en co-culture avec certaines autres bactéries retrouvées dans l'environnement de la production alimentaire tel que *Kocuria varians*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Comamonas testosteroni* et *Flavobacterium* spp.(Bremer, Monk *et al.*, 2001, Carpentier et Chassaing, 2004). D'autres recherches ont plutôt démontré une baisse de la densité lors de co-culture avec certaines autres souches bactériennes qui pourrait être due à la pour les nutriments (Norwood et Gilmour, 2001, Carpentier et Chassaing, 2004). En fait, le rôle de la flore accompagnatrice dans la persistance n'est pas encore clair chez *Listera* et nécessiterait plus de recherche. Finalement, même si les résultats disponibles dans la littérature démontrent toute l'importance des efforts du point de vue réglementaire pour déloger les souches persistantes, ces efforts doivent aussi s'accompagner de mesures en amont pour mieux comprendre puis limiter l'apport de souches récurrentes.

Règlementation :

Le très haut taux de létalité dans les populations à risque et les récentes éclosions associées à *Listeria monocytogenes*, ont poussé les gouvernements à adopter des mesures sévères à certaines étapes de la production pour réduire l'exposition du consommateur à ce microorganisme. La réglementation face à *Listeria monocytogenes* cible particulièrement l'industrie du prêt-à-manger qui représente un secteur à forts risques. En effet, les aliments prêt-à-manger sont par définition des aliments qui ne nécessitent pas de préparation avant la consommation sauf le rinçage, le chauffage ou la décongélation, qui n'ont pas ou peu d'effet décontaminant du produit. De plus, *Listeria monocytogenes* peut croître à des températures de réfrigération. Ainsi les produit prêt-à-manger qui permettent la croissance de ce microorganisme tel que certaines viandes froides, peuvent atteindre des doses infectieuses importantes avant d'être consommé sans aucune cuisson ou traitement (Anonyme, 2011b).

Deux grandes lignes de pensées sont présentes dans le monde quant à la réglementation sur *Listeria monocytogenes* dans les produits prêt-à-manger. En effet, certains pays, tel que les États-Unis ont privilégié une approche de tolérance zéro face à *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêt-à-manger. Dans ce pays, on considère que la présence de *Listeria monocytogenes* dans 25g d'aliments prêt-à-manger rend cet aliment impropre à la consommation (Anonyme, 2003a). Sachant que ce microorganisme est ubiquitaire, cet objectif semble très difficile à atteindre. C'est probablement pourquoi cette réglementation est contestée par l'industrie. Des auteurs ont même émis l'hypothèse que ce type de réglementation a pour effet de réduire l'effort de l'échantillonnage des industriels (Tompkin,

2002). De plus, il semble que les risques de développer une listériose suite à la consommation d'un aliment contaminé sont très faibles dans la population en santé. Des études ont démontré que de faibles quantités de *Listeria monocytogenes* sont consommées sans conséquences sur la santé par la population (Ryser et Marth, 2007). Face à ces données, d'autres régions du monde dont l'Europe ont plutôt adopté une approche basée sur l'analyse du risque qui permet la présence de 100 UFC/g de produit à la date limite de consommation avec certaines exceptions, telles que les produits destinés aux hôpitaux et aux nouveau-nés (Anonyme, 2005).

Depuis 2011, suite à l'importante éclosion canadienne de 2008 liée aux viandes froides contaminées, la réglementation nationale en ce qui a trait à *Listeria monocytogenes* dans les produits prêt-à-manger a été modifiée. Dans cette nouvelle version, de nouveaux critères semblables à ceux du Codex alimentarius (Palumbo, Borucki *et al.*, 2003, Anonyme, 2007) ont été définis quant à la limite acceptable pour la présence de ce microorganisme. Ainsi, la loi canadienne sépare les aliments en trois catégories ; la catégorie 1 qui contient les aliments permettant la croissance de *Listeria monocytogenes* (ex. : viandes froides de charcuterie, fromages à pâte molle, saucisses hot dog, pâtés), la catégorie 2A qui contient les aliments ne permettant qu'une croissance limitée qui ne dépasse pas 100 UFC/g pendant la durée de vie du produit (ex. : saumon fumé à froid/gravlax réfrigérés, les fruits et légumes fraîchement coupés) et finalement la catégorie 2B qui ne permet pas la croissance de *Listeria monocytogenes* (ex. : la crème glacée, le fromage à pâte dure, le salami sec, le poisson salé à sec, des variétés de prosciutto). Comme les aliments de la catégorie 1 sont les plus à risque, la loi exige une absence du microorganisme dans 25g d'aliment alors que pour les aliments des catégories 2A et 2B, une dose de moins de 100 UFC/g est acceptable à la date limite de

consommation. Les aliments destinés à une population à risque comme les nouveau-nés et les individus immunosupprimés sont quant à eux automatiquement classés dans la catégorie 1. En plus de cette classification, un arbre de décision a été mis au point pour guider les industriels quant aux mesures à prendre en cas de présence de *Listeria* spp. sur les surfaces en contact avec les aliments. Comme Santé Canada considère que l'échantillonnage de l'environnement est plus efficace que l'échantillonnage du produit pour déceler la contamination, les produits ne sont obligatoirement testés qu'en cas de détection de *Listeria* spp. sur des surfaces en contact avec le produit. De plus, un échantillonnage des surfaces qui ne sont pas en contact avec le produit est maintenant obligatoire. Lors d'un événement de détection de *Listeria* spp. sur ces surfaces, l'industriel doit mettre en place des mesures correctives jusqu'à l'obtention de résultats négatifs. Cette nouvelle politique encourage aussi l'utilisation de traitements post-létalité, et de certains inhibiteurs de croissance qui ont été approuvés pour *Listeria monocytogenes*, par exemple le lactate et le diacétate, dans les produits prêt-à-manger qui permettent de limiter ou de réduire la contamination du produit en cas de problèmes. Les traitements post-létalité sont des traitements supplémentaires appliqués sur le produit fini ou son emballage, par exemple un traitement à haute pression et qui ont pour but de réduire ou d'éliminer la contamination causée par une possible exposition à des pathogènes après le traitement de létalité qui est souvent l'étape de cuisson du produit (Anonyme, 2004, Anonyme, 2011b).

***Listeria monocytogenes* en production alimentaire :**

Les produits qui sont le plus souvent incriminés dans les toxi-infection à *Listeria monocytogenes* sont les fromages pasteurisés ou non, les viandes froides et le lait non pasteurisé. Comme il a été expliqué précédemment, la réglementation met principalement l'accent sur le contrôle de *Listeria monocytogenes* lors de l'étape de transformation des aliments. Très peu d'information est disponible sur la contamination et la circulation de ce pathogène dans les étapes en amont tel que l'abattage et la découpe. Il a cependant été mis en évidence que les produits qui sortent de ces usines peuvent être une source de contamination pour les usines qui produisent des produits prêt-à-manger. Santé Canada rapporte 14 importantes éclosions liées aux produits carnés en Amérique et en Europe depuis les années 80. Éclosions principalement associés aux pâtés, à la langue de porc en gelée et aux charcuteries. Celles-ci ont touché jusqu'à 355 personnes et ont causé 95 décès au Royaume-Uni (Anonyme, 2011b).

Dans l'environnement :

Listeria est un microorganisme considéré ubiquitaire fréquemment retrouvé dans l'environnement tel que les sols, les étendues d'eau et les végétaux particulièrement en décomposition. Dans ces environnements, cette bactérie peut survivre plusieurs centaines de jours. En effet, il a été démontré que *Listeria monocytogenes* peut survivre plus de 700 jours dans le sol et jusqu'à 900 jours dans l'eau (Ryser et Marth, 2007). Sur des échantillons de végétaux, une étude allemande a retrouvé entre 9,7 % et 44 % d'échantillons positifs dans divers environnements comme des champs cultivés et des forêts (Weis et Seeliger, 1975). Il

semble que la présence de *Listeria monocytogenes* dans le sol soit fortement associée à la présence de matériel végétal en décomposition ou de matières fécales. Dans les études d'eau de rivière, on a pu retrouver jusqu'à 53 % d'échantillons positifs, en Europe. Les auteurs de cette dernière étude ont émis l'hypothèse que cette contamination proviendrait d'eaux usées ou de déchets agricoles (Fenlon, Wilson *et al.*, 1996). Il a aussi été possible de mettre en évidence le pathogène dans les boues d'épuration et dans le fumier qui est parfois utilisé comme engrais (Garrec, Picard-Bonnaud *et al.*, 2003, Jiang, Islam *et al.*, 2004). Comme il a été démontré, ce microorganisme est largement présent dans l'environnement et peut donc régulièrement contaminer les végétaux utilisés dans l'alimentation des animaux. Ces animaux peuvent par la suite être eux aussi contaminés principalement par la consommation de l'ensilage qui n'aurait pas bien été préparé. En effet, un ensilage bien préparé sera trop acide (pH <4.5) ou trop sec pour permettre la croissance de *Listeria*. Par contre, dans des environnements très humides, où il fait plus froid et où les végétaux utilisés sont de mauvaise qualité, cet ensilage pourra permettre la croissance de *Listeria* et ainsi devenir fortement contaminé (Vela, Fernandez-Garayzabal *et al.*, 2001).

Chez les animaux:

Listeria monocytogenes peut contaminer une grande variété d'animaux de ferme. En effet, les moutons, les vaches, la volaille, et les porcs peuvent être porteurs de cette bactérie (Hutchison, Walters *et al.*, 2004, Boscher, Houard *et al.*, 2012). A cause de leur alimentation les risques de contamination sont surtout importants chez les ruminants. Chez les ruminants, cette bactérie est pathogène et cause des symptômes semblables à ceux de l'humain c'est-à-dire des encéphalites, méningites et avortements. Cependant, de nombreux animaux tels que les porcs peuvent être porteurs sains. Les porcs peuvent eux aussi être à risque lorsque du maïs fermenté

est utilisé dans l'alimentation. Plusieurs études contradictoires ont été publiées quant à la prévalence de ce pathogène chez le porc avec des résultats variant de 0 à 47 % avec les plus hautes valeurs en Europe de l'est (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006). Par exemple, en France, l'équipe de Fosse et coll. (2011), rapportait une absence de *Listeria monocytogenes* chez les porcs alors que des études de Beloeil et coll. (Beloeil, Chauvin *et al.*, 2003) et de Boscher et coll. (Boscher, Houard *et al.*, 2012) ont décrit la présence de cette bactérie dans 14 % et 14.5 % des échantillons de fèces respectivement. En Amérique, des études semblables ont plutôt montré de faibles niveaux de contamination. Ainsi, au Canada en 2010 l'équipe de Farzan et coll. a rapporté la présence de *Listeria monocytogenes* dans 3.3 % des échantillons de fèces collectés chez les truies, porcelets et porcs à la ferme (Farzan, Friendship *et al.*, 2010). La forte variation dans les résultats de prévalence pourrait être expliquée principalement par les pratiques différentes de production tel que la présence d'élevages fermés et ouverts, mais aussi par les méthodologies utilisées lors des différentes études. En effet, les études françaises précédemment citées, celles où *Listeria monocytogenes* était absente. utilisaient des techniques de détection à un seul enrichissement, ce qui réduit la sensibilité de la méthode. Pour ce qui est des pratiques de production, on sait que l'utilisation d'alimentation humide, où la moulée est directement mélangée à l'eau, est fréquente en Europe et qu'elle est un facteur de risque important pour la contamination des porcs par *Listeria monocytogenes* (Beloeil, Chauvin *et al.*, 2003). En effet, l'alimentation des porcs à la ferme a été principalement mise en cause pour la contamination des animaux. Comme nous l'avons expliqué précédemment, chez les bovins, un ensilage mal préparé peut contenir de fortes concentrations de *Listeria monocytogenes*. Dans le cas de l'alimentation en soupe, chez le porc, il semble que le développement de biofilms contenant *Listeria monocytogenes* dans

les conduites utilisées pour la distribution puisse être responsable de la contamination (Beloeil, Chauvin *et al.*, 2003). Ainsi les animaux nourris exclusivement à l'aide de nourriture préparée industriellement et sèche sont plus rarement contaminés (Fenlon, Wilson *et al.*, 1996). Les souches qui ont été isolées chez le porc par Boscher et coll. étaient des sérotypes 1/2a, 1/2b, 4b et 1/2c. L'auteur précise que les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b qui ont été le plus souvent isolés ont aussi été retrouvés dans des abattoirs français et que ce sont ceux qui sont le plus souvent liés aux éclosions humaines. Certains auteurs ont donc émis l'hypothèse que la ferme est un réservoir de contamination de *Listeria monocytogenes* et que ces souches pourraient être impliquées dans la contamination des aliments. En effet, des études ont démontré par pulsotypage que des souches présentes chez les porcs à la ferme peuvent être retrouvés dans les usines d'abattage (Nightingale, Schukken *et al.*, 2004, Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010). Ainsi ces animaux contaminés à la ferme pourraient être considérés comme une source d'introduction de la contamination à l'intérieur de celles-ci. Dans certains cas, il semble que certaines de ces souches soient virulentes pour les hommes et peuvent leur être transmises via l'alimentation et contact direct. Par exemple, les souches de sérotype 4b qui sont les plus fréquemment décrites dans les éclosions, ont aussi été décrites chez les porcs sains (Boscher, Houard *et al.*, 2012).

À l'abattage:

La source de la contamination des carcasses de porcs à l'abattoir n'est pas très bien connue. Le niveau rapporté de contamination des carcasses par les *Listeria* en général à l'abattoir est normalement faible et se situe entre 0 et 9 % alors que la contamination de l'environnement et des équipements se situe entre 0 et 7 % (Autio, Sateri *et al.*, 2000, Ryser et Marth, 2007). Une étude effectuée sur tout le territoire des États-Unis a mis en évidence la présence de *Listeria*

monocytogenes sur 7,4% des carcasses échantillonnées (Kam, Luey *et al.*, 2008). Dans une usine de porc ibérique, des résultats de prévalence très faible ont été obtenus avec une absence de détection sur les carcasses lors d'une des trois années de l'étude et une absence sur les équipements lors de deux années (Ortiz, Lopez *et al.*, 2010). L'étude de l'équipe de Hellstrom et coll. en Finlande a quant à elle mis en évidence la présence de *Listeria monocytogenes* sur 1 % des carcasses échantillonnées dans les productions classique et biologique (Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010). Comme il a été décrit précédemment, *Listeria monocytogenes* a été retrouvé à différents niveaux dans les fèces des porcs échantillonnés à la ferme. Il se pourrait que lors de l'abattage, la contamination de la carcasse des porcs provienne de la contamination de celle-ci par les matières fécales principalement lors de l'étape d'éviscération. Cependant, des auteurs ont aussi mis en évidence dans leur étude la présence de *Listeria monocytogenes* sur des carcasses alors que tous les échantillons de fèces n'étaient pas contaminés (Kanuganti, Wesley *et al.*, 2002). Il semble donc que les *Listeria* retrouvées sur les carcasses ne soient pas seulement d'origine fécale et qu'il existe d'autres voies de contamination. Plusieurs étapes ont été identifiées dans le processus d'abattage et d'habillage des carcasses de porc comme facteurs augmentant ou réduisant la contamination de la carcasse. Tout d'abord, à l'attente, il a été démontré que pour plusieurs microorganismes tels que *Salmonella* et *Yersinia*, des porcs infectés peuvent propager l'infection chez des porcs sains lors de cette période. Puis, suite à l'abattage, lors de l'étape d'échaudage, la température élevée de l'eau peut être responsable d'une réduction de la contamination sur la carcasse. Cependant, il a été démontré qu'une charge trop élevée de matière organique à cette étape peut causer une diminution de la température de l'eau et ainsi augmenter les risques de contamination. Un bon renouvellement de l'eau des bassins d'échaudage est donc important. En effet, l'étape d'échaudage ouvre les

pores de la peau de la carcasse ce qui peut permettre aux microorganismes d'y pénétrer et d'être associé à une contamination résiduelle (Hald, Wingstrand *et al.*, 2003, Letellier, Beauchamp *et al.*, 2009). Une étape d'épilage vient ensuite. L'épileuse utilisée lors de cette étape peut être responsable d'une augmentation de la contamination fécale sur la carcasse. Celle-ci passe ensuite une étape de flambage qui élève la température à la surface jusqu'à 100°C, ce qui a un effet significatif sur la réduction de la contamination. La carcasse subit ensuite une étape de polissage qui peut être responsable d'une augmentation de la contamination. Viennent ensuite les étapes d'éviscération qui sont les plus critiques pour la contamination fécale. On détache tout d'abord le rectum qui doit être ligaturé pour éviter les fuites de matière fécale. Il a été démontré que les diverses techniques utilisées pour contrer les fuites à cette étape l'utilisation de méthodes pour sceller le rectum telle que l'utilisation de sac peuvent minimiser les risques de contamination fécale (Nesbakken, Nerbrink *et al.*, 1994, Sheridan, 1998). Le tractus digestif est ensuite retiré. À cette étape, une rupture des intestins, bien que peu fréquente chez les opérateurs bien formés, peut causer une forte contamination de la carcasse. Il est connu que la contamination est plutôt causée par les instruments où les mains souillées des opérateurs c'est pourquoi il est important d'appliquer un bon protocole de lavage des couteaux et des mains lorsqu'il y a présence de matière fécale. Les autres organes tels que les reins, diaphragme, cœur, poumons, œsophage, trachée et la langue avec les amygdales, sont ensuite retirés (Borch, Nesbakken *et al.*, 1996). Comme c'est au niveau des amygdales et de la langue que l'on retrouve les niveaux de contamination les plus élevés pour *Listeria monocytogenes* (Autio, Sateri *et al.*, 2000, Vasconcelos, Almeida *et al.*, 2008), la contamination de la carcasse pourrait aussi provenir d'un contact avec ces organes durant le processus d'éviscération (Autio, Sateri *et al.*, 2000). La carcasse est ensuite fendue en deux.

Les équipements utilisés lors de cette étape de l'abattage peuvent aussi être responsables de la dissémination de *Listeria* par contamination croisée. En effet, une étude de Autio et coll. a démontré la présence de souches de *Listeria monocytogenes* sur les scies de fentes dans un abattoir qui avaient les mêmes pulsotypes que des souches retrouvées sur des carcasses. Ceci suggère que cet équipement pourrait être responsable de contamination croisée entre les carcasses (Autio, Sateri *et al.*, 2000). D'autres auteurs ont quant à eux émis l'hypothèse que les souches présentes chez les animaux ne peuvent pas facilement directement contaminer la viande, mais sont plutôt remplacées par des souches mieux adaptées à l'environnement de l'usine et aux produits. Ainsi, une grande variété de souches pourrait pénétrer dans l'usine par les animaux vivants et certaines d'entre elles pourraient ensuite être sélectionnées ou favorisées par les conditions dans l'environnement, persister et causer la contamination (van den Elzen et Snijders, 1993, Autio, Sateri *et al.*, 2000).

Étapes de réfrigération, découpe et transformation :

Malgré la faible contamination de la carcasse avant l'étape de ressuyage, il a été démontré que le taux de contamination du produit peut être beaucoup plus élevé suite aux étapes de réfrigération et de découpe. On retrouve des niveaux assez variables d'incidence de *Listeria monocytogenes* sur la viande crue de porc avec des études relevant des niveaux aussi bas que 1,4 % sur de la viande de truies aux États-Unis (Wesley, Larsen *et al.*, 2008), jusqu'à des niveaux de 13,1 % sur de la viande de porc dans les commerces en France (Kerouanton, Rose *et al.*, 2011) et de 35,7 % sur dans la viande de porc dans les commerces Japonais (Ochiai, Yamada *et al.*, 2010). Au Canada, une étude a plutôt trouvé des niveaux allant jusqu'à 24 % des produits de porc crus échantillonnés (Bohaychuk, Gensler *et al.*, 2006). Les étapes de réfrigération, de découpes et de transformation, ont été identifiées comme des étapes

d'amplification de la contamination tant au niveau du nombre que de la diversité génétique et représentent des sources significatives de contamination de la viande (Giovannacci, Ragimbeau *et al.*, 1999, Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006, Kerouanton, Rose *et al.*, 2011). Cette augmentation de la contamination à ces étapes peut être expliquée principalement par l'accroissement de la présence de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement. Lors du fonctionnement de l'usine, des niveaux de contamination allant jusqu'à 37 % d'échantillons d'équipements et d'environnement ont été décrits dans des usines de transformation de produits crus. En effet, ces environnements sont propices à la multiplication de *Listeria monocytogenes* puisqu'ils sont maintenus à 4°C, ce qui donne un avantage à ce microorganisme psychrophile en plus de contenir beaucoup de matières organiques offrant une bonne source de carbone à ces bactéries. Chez les souches retrouvées dans l'environnement, une forte diversité génétique des souches a aussi été décrite à ces étapes et pourrait être expliquée par l'apport constant de nouvelles souches par les matériaux crus en plus de l'installation de souches persistantes dans l'environnement (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006). Comme nous l'avons expliqué, *Listeria monocytogenes* peut former des biofilms ou être associé à des biofilms existants qui peuvent être difficiles à déloger. Cette contamination peut donc devenir persistante comme il a été démontré par Giovannacci et coll.. Cette équipe a mis en évidence la présence de souches endémiques, principalement du sérotype 1/2a souvent associée à l'environnement dans une usine d'abattage et découpe de porc et ce, sur une durée d'un an (Giovannacci, Ragimbeau *et al.*, 1999). Ainsi, même après nettoyage et désinfection, Salvat et coll. ont décrit en 1995 une contamination résiduelle de 12,5 % de leurs échantillons dans l'environnement, alors que l'étude de Chasseignaux et coll. en 2002 en a trouvé 2,5 % (Salvat, Toquin *et al.*, 1995, Chasseignaux, Gerault *et al.*, 2002). Dans cette dernière étude, les auteurs ont cependant décrit

de fortes variabilités dans la contamination résiduelle dans certaines usines avec des résultats allant jusqu'à 27,5 % d'échantillons positifs dans l'environnement. Le niveau de contamination retrouvé sur les surfaces à cette étape est donc très variable et semble être lié aux différentes pratiques dans les usines. Dans cette étude, les auteurs ont entre autres identifié des différences dans les habitudes de lavage et désinfection dont certaines favorisent la réduction des *Listeria*, telle que l'utilisation de deux produits désinfectants en alternance. Ceci en effet, empêcherait l'adaptation des bactéries et éviterait leur persistance dans l'environnement. D'autres facteurs de risques ont aussi été mis en évidence pour la présence de biofilms de *Listeria* sur les surfaces, tels qu'une forte humidité dans l'usine, la présence de surfaces rugueuses ou usées, la présence de matière organique sur les surfaces, un pH neutre et des températures plus basses que 10°C (Chasseignaux, Gerault *et al.*, 2002, Sofos et Geornaras, 2010). Les études sur la circulation de ce pathogène dans l'environnement de la transformation du porc ont démontré que la viande crue peut contaminer l'environnement et les équipements de l'usine et persister après le nettoyage. Puis à leur tour ces sites contaminés peuvent contaminer la viande crue ou même le produit transformé prêt-à-manger (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006, Berzins, Hellstrom *et al.*, 2010). Ces phénomènes ont été décrits dans quelques études où des souches de *Listeria monocytogenes* ont été retrouvées sur le produit cru, dans l'environnement, mais aussi dans le produit fini prêt-à-manger, entre autres dans une usine de saucisson et de jambon de parme (Thevenot, Delignette-Muller *et al.*, 2005, Prencipe, Rizzi *et al.*, 2012).

En conclusion, d'après l'information disponible, il semble que *Listeria monocytogenes* soit présent tout au long de la chaîne de production de la ferme jusque chez le consommateur. En

effet, les porcs peuvent se contaminer à la ferme principalement par la consommation de nourriture contaminée mais aussi par simple contact avec l'environnement de la ferme. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que les carcasses de ces porcs peuvent ensuite être contaminée lors de l'abattage et de l'éviscération, par contact avec les matières fécales ou les amygdales. Il semble cependant que les souches persistantes retrouvées dans l'environnement de la production alimentaire aient aussi un impact majeur sur cette contamination. En effet, lors des étapes de réfrigération et de découpe, cette carcasse pourra contaminer l'environnement. Les conditions permettront une amplification de la présence de *Listeria monocytogenes* et une contamination subséquente des produits crus. Ces produits contaminés peuvent ensuite être vendus ou utilisés pour la transformation où ils pourront être responsables de l'introduction du pathogène dans l'environnement hautement contrôlé des usines de prêt-à-manger. C'est dans les étapes finales de la production et sur le produit que le contrôle de *Listeria monocytogenes* s'opère principalement. Cependant, il semble que d'après la littérature disponible, les étapes en amont de la transformation des produits prêt-à-manger puissent avoir un impact sur la contamination du produit final.

Problématique générale :

À la vue de toutes ces informations, force nous est de constater que *Listeria monocytogenes* est un pathogène alimentaire très important au niveau de la santé publique qui, de par ses caractéristiques physiologiques, pose une problématique particulière aux industriels. Malgré la possibilité de contamination des produits crus par *Listeria monocytogenes*, la réglementation et toute l'énergie de l'industrie sont aujourd'hui centrées sur l'étape de la transformation. Ainsi, aucune information n'est aujourd'hui disponible sur la présence et la circulation de ce pathogène dans les autres étapes de la production québécoise et canadienne. Dans ce projet, nous tenterons donc d'apporter plus d'information au sujet de ce pathogène au niveau de l'abattoir au Québec. Cette étude a comme premier objectif d'évaluer la contamination par *Listeria monocytogenes* à différentes étapes d'une usine d'abattage et de découpe; soit à l'attente, à l'abattage éviscération et à la découpe. Nous tenterons aussi de mettre en relation les souches des diverses étapes pour décrire la circulation de cette bactérie et identifier si possible les étapes où un effort supplémentaire doit être appliqué pour le contrôle de ce pathogène alimentaire.

Méthodologie et Résultats

Article scientifique

(en préparation pour publication dans Foodborne Pathogens and Diseases)

RFLP-PFGE analysis of the distribution of *Listeria monocytogenes* in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec.

Guillaume Larivière-Gauthier¹, Ann Letellier¹, Annaëlle Kérouanton², Sylvain Quessy¹,
Sylvain Fournaise³ and Philippe Fravallo¹

¹Chaire de Recherche en salubrité des Viandes (CRSV), Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA), Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP) and Centre de recherche en infectiologie porcine et aviaire (CRIPA), Department of Pathology and Microbiology, University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada

²Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, unité HQPAP, Ploufragan, France

³Olymel S.E.C

Abstract

Listeria monocytogenes causes a major public health concern which can cause a severe toxin-infection and economic losses. Following the 2008 Canadian outbreak associated to pork cold cuts, the regulation on the presence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products was modified by Health Canada, confirming the need to control this pathogen, not only on the final product but also in the environment of the plant. However, there is currently no surveillance of this microorganism in previous production steps such as the cutting area and the slaughter process. Furthermore, the information on the presence of this microorganism in these environments in Canada is scarce. In this study, we have sampled, at slaughter and cutting in a plant of the province of Quebec over a two-year period. The lairage pens, representative areas of the slaughter process, and of the cutting zones, after washing and disinfection, were targeted. A total of 874 samples were analyzed. *Listeria* detection followed the MFHPB-30 CFIA standard serotyping of the isolates was conducted by multiplex PCR, and genotyping by *ApaI* and *AscI* RFLP-PFGE. *Listeria monocytogenes* was detected in all production stages. The 108 positive samples further analyzed presented 4 different serovars, mainly 1/2b. PFGE results showed the presence of a variety of strains from the first two areas of the plant (10 pulsotypes in 13 samples in lairage, 9 in slaughtering) to the cutting room (9 pulsotypes), and revealed selection for a predominant strain in this environment (type 1 representing 96.1% of the isolates). A strong genotypic similarity between strains isolated early in the production areas and some strains in the cutting room was demonstrated. This is the first description of the presence of *Listeria monocytogenes* and its tracking in a Quebec slaughter and cutting plant. Our results support the idea that, *Listeria monocytogenes* enters

facilities with the animals, contaminate further production steps with some strains becoming becoming predominant and persisting in this environment.

Introduction

Listeria monocytogenes is a major pathogen in public health because it has high mortality rate in susceptible populations such as the elderly and the immunosuppressed persons. Listeriosis is mainly caused by consumption of contaminated food particularly ready-to-eat meat products and is of great concern for the food industry (Ryser et Marth, 2007, Dongyou, 2008b). *Listeria monocytogenes* has been frequently isolated from pork products (Lopez, Villatoro *et al.*, 2008, Berzins, Hellstrom *et al.*, 2010, Ochiai, Yamada *et al.*, 2010, Andritsos, Mataragas *et al.*, 2012) and outbreaks have regularly been associated with the consumption of contaminated pork (Dorozynski, 2000, de Valk, Vaillant *et al.*, 2001, Pichler, Much *et al.*, 2009). In 2008, a *Listeria monocytogenes* outbreak associated with cold cuts occurred across Canada, affected 57 persons and caused 22 deaths (Weatherill, 2011). The strain associated with this outbreak was of the 1/2a serotype as was the strain of the cheese-associated outbreak that occurred the same year in Canada (Gilmour, Graham *et al.*, 2010, Gaulin, Ramsay *et al.*, 2012). It is now known that this 1/2a strain has been widely prevalent in human cases in Canada for the last 20 years and could be considered as a new epidemic clone (Knabel, Reimer *et al.*, 2012). This triggered Health Canada to re-evaluate regulation on the presence of *Listeria* in ready-to-eat food production and include not only control on finished product, but also on the further processing environment. There is however, neither regulation nor surveillance of this pathogen in the previous production steps, and limited knowledge is available on listeria's presence and persistence. This information could be very important to evaluate the impact of these steps on the introduction of *Listeria monocytogenes* in further processing plants.

Listeria monocytogenes is ubiquitous in the environment and its introduction routes in plants are not precisely known. Ambiguous reports are available on the possible introduction of this pathogen in plants by live animals (Kanuganti, Wesley *et al.*, 2002, Beloeil, Chauvin *et al.*, 2003, Wesley, Larsen *et al.*, 2008). Indeed, in some of the studies, *Listeria monocytogenes* has been found in feces, intestines and tonsils of healthy pigs at the farm, at levels ranging from 0 to 61% (Kanuganti, Wesley *et al.*, 2002, Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006, Wesley, Larsen *et al.*, 2008, Farzan, Friendship *et al.*, 2010). Highly contaminated pigs could therefore be responsible for the contamination of the environment in lairage pens or during the slaughtering and processing operations (Autio, Sateri *et al.*, 2000, Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010). Differences in husbandry practices studies such as the wet feeding, which is frequent in Europe, could possibly be responsible for the difference in prevalence in the studies (Beloeil, Chauvin *et al.*, 2003) as well as the use of various isolation protocols (Wesley, Larsen *et al.*, 2008, Boscher, Houard *et al.*, 2012). Upon entering the plant, few publications have suggested that *Listeria monocytogenes* contamination level is amplified in the chilling and cutting zone (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006). In this environment, strains that are present can become resident strains and can be very hard to eradicate during washing and disinfection persisting for a long period going from a few months to 12 years (van den Elzen et Snijders, 1993, Tompkin, 2002, Pan, Breidt *et al.*, 2006b, Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006, Ortiz, Lopez *et al.*, 2010, Carpentier et Cerf, 2011). Because of the environmental contamination, following the chilling and cutting operations, the raw pork meat contamination has been shown to significantly increase (Miettinen, Bjorkroth *et al.*, 1999, Kanuganti, Wesley *et al.*, 2002, Gamboa-Marín, Buitrago M *et al.*, 2012, Prencipe, Rizzi *et al.*, 2012). These contaminated products can then be introduced in the ready-to-eat production area increasing the risk of

environmental contamination by *Listeria monocytogenes* and where the control is extremely important (Chasseignaux, Toquin *et al.*, 2001, Thevenot, Delignette-Muller *et al.*, 2006).

It has been shown that *Listeria monocytogenes* can, in some cases, be introduced in high levels in the plant by live pigs, be amplified in some processing steps and cause a risk of contamination of the end-product (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006, Berzins, Hellstrom *et al.*, 2010). However, no information on this situation is available in Canada.

In this study we first described, in Quebec, Canada, the presence of *Listeria monocytogenes* in different areas in the pork production continuum in a slaughter and cutting plant. In addition, we studied the presence of different population strains and their circulation between the different production areas inside this plant with an RFLP-PFGE using two enzymes.

Materials and methods

Sampling:

Samples were collected during a two-year survey, in one Quebec pork slaughterhouse and cutting plant representing a significant part of the production in the province. The first sampling was done during the summer and part of the fall of 2009 in the environment of the lairage pens to assess the likelihood of contamination by incoming animals. Samplings were done only when it was possible to do it without affecting the normal production, approximately every two weeks. These samples were collected by swabbing 100 cm² of the floor surface of 6 different pens with cotton swabs. 100 samples were taken in each pen for a

total of 600 samples collected during 9 visits. The number of samples collected in each visits was determined by the number of pens that were used and available for sampling in the plant on the day of the visit. The samplings were done immediately after the pigs' departure, once the pen was empty.

In order to better appreciate the contribution of the slaughter and cutting process to *Listeria monocytogenes* contamination a second sampling was done in the winter of 2011 during three visits at the plant over three months. Samples were taken in representative areas of these steps after washing and disinfection. Samples for the slaughter steps, evisceration and cutting rooms were collected using swabs pre-moistened with neutralizing broth. These samples covered a maximum surface of 900 cm². A total of 274 samples were collected on 72 sites during these three visits. Selected sites mostly consisted of equipment and environmental surfaces (Annex I and II). Multiple samples were taken on each site to represent the surfaces diversity such as the different equipment parts or materials (Annex I and II).

Detection *Listeria monocytogenes*:

Listeria monocytogenes detection was conducted on 874 samples using a method based on the MFHPB-30 Health Canada standard technique. Briefly, the first enrichment was conducted in UVM-1 broth for 24h at 30°C and the second in Fraser broth for 48h at 37°C. Both broths were inoculated on ALOA agar and incubated for 48h at 37°C. Confirmation of the species of the typical isolate was conducted by evaluating hemolysis, CAMP test, motility in semi-solid agar and carbohydrates use in broths (xylose, rhamnose, mannitol).

Confirmation and serogrouping of the isolates:

Each isolate was serogrouped using the multi-PCR protocol amplifying 6 fragments described by Kerouanton *et al.* in 2010. This PCR separated the strains in 4 groups including multiple serotypes: IIa (including 1/2a and 3a), IIb (1/2b and 3b), IIc (1/2c and 3c) and IVb (4b, 4d, and 4e).

PFGE genotyping:

Pulsed field gel electrophoresis was done according to the CDC Pulse-net protocol for *Listeria monocytogenes* (Graves et Swaminathan, 2001). Enzymes *AscI* and *Apal* were used to cleave the bacterial DNA and migration was resolved using the contour clamped homogeneous electric field technique. Patterns were compared using Bionumerics software. Similarity between the patterns was based on bands position using the Dice correlation with a position tolerance of 1 % (Ferris, Yan *et al.*, 2004). The strains were clustered using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and dendrogram was constructed (Ferris, Yan *et al.*, 2004).

Statistical analysis :

χ^2 test was used to evaluate the link between the level of contamination and the different areas plant. All analyzes were conducted using SPSS 20. *P* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Lairage pens:

Listeria monocytogenes was detected in 10 out of 600 samples (1,7%). These positives samples were detected in 6 of the 60 and in only three of our visits. All the pens were contaminated on only one visit but one, which was found to be positive on the seventh and ninth visit. Except one pen on the seventh visit where four samples were found to be positive, only one sample was found to be positive in each of positive pens. Each *Listeria monocytogenes* positive visit was interspersed with a negative one. Three isolates were serotyped and genotyped in each positive sample for a total of thirty. Among the positive samples seven out of ten presented strains from the IIA serogroup, one from the IIB, one from the IVB and one, which was a mixed population of IVB and IIA (Table V). Eleven different pulsotypes were shown to be present in the ten positive samples. Eight were detected for the IIA isolates, one for the IIB and two for de IVB. Two samples had mixed population with two different genotypes. One of the pulsotype was present on two of the visits (pulsotype 12) but was found in two different pens. (Table V)

Slaughtering and evisceration:

In the pre-cutting room area, 39.4 % of the sites and 19.1 % of the samples were positive for *Listeria monocytogenes*. It was found in the slaughtering area in 66.7 % of the sites sampled and 33.3 % of the total samples. In the evisceration section, 36 % of the sites and 18.1 % of the samples, and in the chilling zone, 40 % of the sites and 13.3 % of the total samples were positive (Table VI). Positive samples were found both on the equipment (splitting saws, *etc.*) and in the environment (Annex I). One isolate was serotyped and genotyped in each positive sample for a total of thirteen. Strains from the slaughtering, evisceration and chilling area were from the IIC serogroup (53.8 %), which was absent from the lairage pens. The majority of

these strains was related to the pulsotype 16 and were found in three consecutive visits. Strains of the serogroups IIB (38.5 %) and IIA (7.7 %) serogroups were also found (Table VI, Table VII) For this part of the plant, a total of eight different pulsotypes were detected and all of these strains but the pulsotype 16, were only found in one of the three visits. (Table VII)

Cutting area:

71.8 % on the sites that were sampled and 41.7 % of individual samples were positive for *Listeria monocytogenes* in the cutting room (Table IV). Positive sampled sites included contact surfaces of conveyers (78.9 % sites, 38.1 % samples) and the equipment (50 % sites and 43.9 % samples) (Table IV and Annex II). One isolate was serotyped and genotyped in each positive sample for a total of eighty-six. Most of the strains found in this part of the plant were from the IIB serogroup (86 %), which contained the pulsotypes 1 and 5. Strains of the IIA (9.3 %), IIC (3.5 %) and IVB (1.2 %) serogroups were also found (Table VI, Table VII). In the cutting room a total of ten different pulsotypes were found. The pulsotype 1 accounted for 83.1 % of all our isolates in this part of the plant. The pulsotypes 1, 5, 11 and 13 were present in two visits or more. The pulsotypes 1, 5 and 16 were found both in the cutting and the slaughtering zone and the pulsotypes identified 24 and 6 and 21 and 11 were shown to be in fact the same after analysis and were found both in the lairage pens and in the cutting room (Table 3).

Our results show an increase in the contamination by *Listeria monocytogenes* both at the sites and samples level from the lairage pens to the cutting room (χ^2 $p < 0.05$). We also observed the emergence of the pulsotypes 16 and 1 in the slaughtering and evisceration steps and in the

cutting room respectively and observed the presence of highly genetically similar strains both present in the lairage pens and the cutting rooms.

Discussion

The primary objective of this study was to describe, in Quebec, Canada, the presence of *Listeria monocytogenes* in different areas in the pork production continuum in a slaughter and cutting plant. First, in the lairage pens, even with the large quantity of fecal matter in the environment, *Listeria monocytogenes* was only found in low levels. Live pigs can introduce these *Listeria monocytogenes* in the plant (Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010). Because pigs can excrete this pathogen, they could well contaminate the environment with their faeces during the waiting period (Boscher, Houard *et al.*, 2012). The low contamination level in this area could be explained by the low contamination level of the pigs' faeces at the farm level. This is supported by other studies, which reports fecal contamination levels going from 0 to 16% at slaughterhouse (Van Renterghem, Huysman *et al.*, 1991, Fenlon, Wilson *et al.*, 1996, Iida, Kanzaki *et al.*, 1998, Farzan, Friendship *et al.*, 2010, Fosse, Laroche *et al.*, 2011). Furthermore, the pathogen was found only in 3 out of 8 visits. This could indicate that only a small proportion of the pig herds entering slaughtering were contaminated and showed variability at the farm contamination level. This is supported by the results that we obtained on visit 7 where we found 7 different pulsotypes from three different serogroups. These observations could be the result of a highly contaminated herd of pig entering the plant. It is known that the feeding practices at the farm such as wet feed and problems in the silage preparation can result in pigs' contamination, which could explain the presence of such highly contaminated herds (Beloil, Chauvin *et al.*, 2003). Most of the strains that were collected

were of the IIA serogroup, which contains principally the 1/2a pulsotype. As it has been explained previously, in Canada, this serotype is the most frequently associated with human sickness (Knabel, Reimer *et al.*, 2012). Strains from the IVB serogroups, which contain the serotype 4b, were also found at low levels. The strains of this serotype are known to be among the most virulent and are most frequently associated with large human outbreaks (Thevenot, Delignette-Muller *et al.*, 2005, Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007). The presence of strains associated with these serotypes in the feces of live pigs has already been described supporting the evidence that live pigs introduced these strains in the meat production processing (Wesley, Larsen *et al.*, 2008, Boscher, Houard *et al.*, 2012). Even with the low contamination level found in these pens, a variety of pulsotypes was found. However, no strain of the same pulsotype was found on consecutive visits. Hence, it seems that there were no persisting strains in the lairage environment. These results all seem to indicate that pigs could be responsible for a regular introduction of new transient *Listeria monocytogenes* strains in the lairage pens, explaining the large diversity of pulsotype we observed. These results are consistent with those of Hellstrom *et al.* (2010) that showed that *Listeria monocytogenes* contamination of the plant can originate from the farm. Considering these results the evaluation of the contamination during the next steps of the production should be interesting.

In the area that were involved in the pre-cutting steps of the process such as the slaughtering, evisceration and chilling part of the plant, *Listeria monocytogenes* was detected both in the environment and on the equipment after cleaning and disinfection. It is known that during the pre-chilling steps of the carcasses, the environment and the equipment can be contaminated by contact with fecal matter or with tonsils, which are frequently contaminated with *Listeria*

monocytogenes (Giovannacci, Ragimbeau *et al.*, 1999, Autio, Sateri *et al.*, 2000). In our study, the contamination levels in the chilling room environment were found to be almost identical to the contamination in the previous areas. These results are in contradiction with the few data published in the literature, which consider chilling as an important amplification step (Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006). As our sampling was done after cleaning and disinfection, this could be explained by good sanitation measures application in this environment. In our sampling of the evisceration area of the plant, we found splitting saws to be contaminated on two different visits. These saws could be responsible of cross contamination of the carcasses as it has been shown by Autio *et al.* (Autio, Sateri *et al.*, 2000).

Most of the strains that were identified were associated to the IIC serogroup and to the pulsotype 16 and were followed in number by the IIB and the IIA serogroups. Since the strain of the pulsotype 16 is absent from the precedent step, and is present here at high levels, it seems that this strain has been selected by this environment and emerged to become a major strain. This pulsotype was found 6 times on three different visits and was present on two different visits on the splitting saws, which could indicate that this strain is persistent on this site in the evisceration steps. It seems that the splitting saw is difficult to clean and disinfect, hence at this step it could be interesting for the processor to adapt its cleaning and disinfection protocol to put more emphasis on this point. However it was also found on multiples other sites and for only one visit indicating that this strain is a recurring strain and that there is a constant introduction of this pulsotype in the slaughtering environment.

In the cutting room and on the three different visits we have found 41.7% of the sampled sites that were positive after washing and sanitation. These results seemed high when compared with other studies, which showed levels between 9 and 20% (Chasseignaux, Toquin *et al.*, 2001, Gudmundsdottir, Gudbjornsdottir *et al.*, 2006, Ortiz, Lopez *et al.*, 2010). However, it is important to note that our samples were taken on surfaces that we had identified during plant operation and that we considered to be at risk of contamination even after washing and disinfection because of organic residues accumulation or because they were hard to clean because of the design of the plant. Furthermore, the cutting room has been described in many studies as an important step for the amplification of the contamination of *Listeria monocytogenes* because of its temperature that is favourable for the psychrophilic organisms and the presence of organic matter. This can explain the much higher level of contamination found in this part of the plant compared to the slaughtering, the evisceration and the lairage pens (van den Elzen et Snijders, 1993, Nesbakken, Kapperud *et al.*, 1996, Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006). A total of 10 different pulsotypes were found in this area of the plant. Two of these pulsotypes (11,13) were found on two visits and two others (1,5) on the three visits. Since these strains were found in multiple visits and after washing and disinfection, these strains could very well be continuously present in the environment of the cutting room and be considered as persistent. The pulsotype 1 accounted for 83.1% of all the *Listeria monocytogenes* found in the cutting room. These results seem to be in accordance with the theory of the existence of major strains in the plant environment, which are very well adapted to the conditions of the meat processing plants (Ortiz, Lopez *et al.*, 2010). These strains may have a better capacity of attachment on the surfaces of the plant such as stainless steel and better growth capacity at 4°C, which gives them an advantage in the formation of biofilms that

are hard to eliminate (Chasseignaux, Toquin *et al.*, 2001, Autio, Lunden *et al.*, 2002, Wulff, Gram *et al.*, 2006). The presence of this strain in a large variety of surface even after cleaning and disinfection seem to be in contradiction with the theory that the persistence is not caused by specific characteristics of the strains but by the presence of sites that have a protecting effect because they are hard to reach or difficult to clean and disinfect (Carpentier et Cerf, 2011). It is interesting to note that the major strain (pulsotype 1) was of the serogroup IIB that contains the serotype 1/2b. This serotype is part of the lineage I, which has been shown to be over represented in the human cases and has been linked to 15 % of the cases in Canada in third place behind the strains of 1/2a and 4b serotypes (Clark, Farber *et al.*, 2010). It is also interesting to note the presence of a strain of the IVB in one of samples in the cutting area. In light of these results, it seems capital to better understand the circulation and source of contamination of these strains in the plant.

Using RFLP-PFGE, we also showed the presence of strains that were found both in the slaughtering and the cutting environment and both in the lairage pens and the cutting room. These results indicated that strains entering the plant via the lairage pens could circulate in the plant and enter the cutting area, where the contamination could be amplified by environmental conditions such as low temperature. It is interesting to note that strains isolated in the cutting room environment were found in the same site one year after the lairage pen sampling. It could indicate that these strains were introduced in the plant with the pigs in the lairage pens and that they are now persisting at a low level in the cutting room environment or that there was a constant introduction of this strain in the plant that reached the cutting room during our samplings.

Conclusion

In conclusion, we have shown that *Listeria monocytogenes* is present in all parts of the slaughtering/cutting plant sampled in Quebec with low levels of contamination in the lairage pens and slaughtering areas and higher contamination levels in the cutting room even after washing and disinfection. We have also shown that this microorganism is circulating in the plant and that some of the strains can become major and persisting strains. The meat that is produced in this plant is intended to be cooked before consumption hence the risk of consumer contamination is low. However, the product can be used, as raw ingredient in the ready-to-eat industry where *Listeria monocytogenes* control is very important. The introduction of contaminated ingredients has been described as source of *Listeria* in these plants. A better control of *Listeria monocytogenes* in the slaughtering and cutting areas could reduce the risks of contamination in the latter stages of the production. Hence, the adaptation of the cleaning and disinfection protocol, to include the sites that were contaminated in this study or the modification of some of the sites to eliminate the harbourages sites could be beneficial at the final product level.

Table V. *Listeria monocytogenes* detection, serotyping and pulsotyping in the lairage pens environment.

	Sampled pens		Samples		Serogroup	Pulsotype
	positive	total	positive	total		
Visit 1	0	4	0	40	-	-
Visit 2	0	4	0	40	-	-
Visit 3	0	4	0	40	-	-
Visit 4	0	12	0	120	-	-
Visit 5	1	8	1	80	IIA	12
Visit 6	0	4	0	40	-	-
Visit 7	2	4	5	40	IIA, IIB, IVB	3, 4, 7, 19, 22, 23,24
Visit 8	0	8	0	80	-	-
Visit 9	3	12	4	120	IIA	2, 12, 21
Total	6	60	10	600		

Table VI. *Listeria monocytogenes* detection in the slaughtering, evisceration, chilling and cutting steps in all three combined visits.

	Sites			Samples			Pulsotypes
	positive	n	%	positive	n	%	
Pre-cutting room:							
Slaughtering	2	3	66.7	3	9	33.3	5, 16, 17
Evisceration	9	25	36	8	44	18.1	1, 8, 9, 10, 16
Chilling	2	5	40	2	15	13.3	16, 18
Total	13	33	39.4	13	68	19.1	
Cutting room:							
Equipment	7	14	50	18	41	43.9	1, 11, 15
Environment	6	6	100	20	30	66.7	1, 6, 15
Conveyor	15	19	78.9	48	126	38.1	1, 5, 11, 13, 14, 16, 20
Total	28	39	71.8	86	206	41.7	

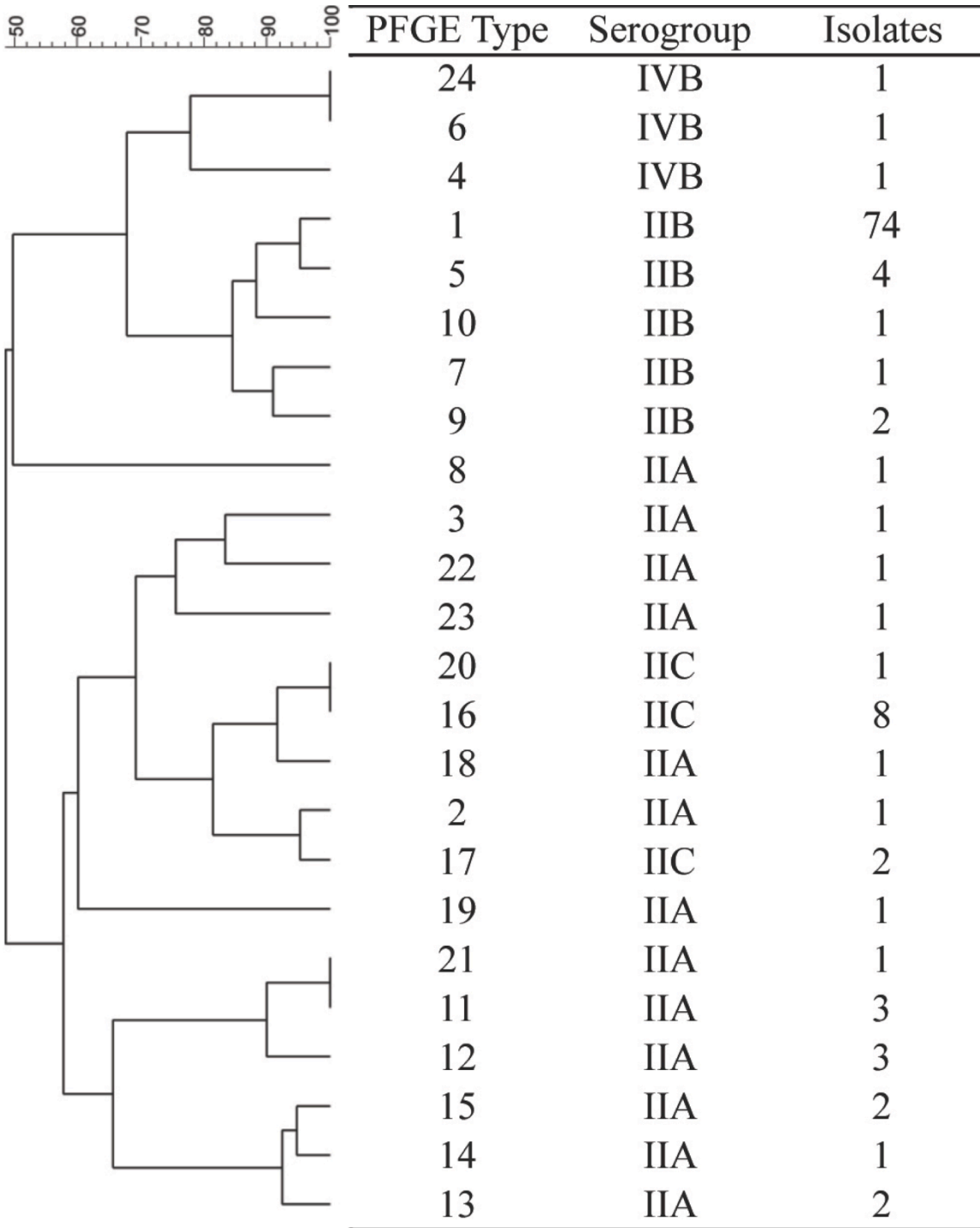


Figure 5. Dendrogram of the combined *Ascl* and *Apal* PFGE type in relation to their serogroup. Type PFGE: code of the combined *Apal-Ascl* profile. Serogroup: serogroup associated to each profile, Isolates: number of detected isolate for each profile.

Table VII. *Listeria monocytogenes* serotyping and pulsotyping in the slaughtering, evisceration, chilling and cutting areas.

		Visit 1		Visit 2		Visit 3		Total	
		Nbr. of Isolats	Pulso.	Nbr. of Isolats	Pulso.	Nbr. of Isolats	Pulso.	Nbr. of Isolats	%
Pre-cutting room	IIA	1	18	0	-	0	-	1	7.7
	IIB	3	<u>1</u> , 8, 10	2	5, 9	0	-	5	38.5
	IIC	3	16	1	16	3	<u>16</u> , <u>17</u>	7	53.8
	IVB	0	-	0	-	0	0	0	0
	Total	7		3		3		13	100
Cutting room	IIA	5	<u>11</u> , <u>13</u> , 15	3	<u>11</u> , <u>13</u> , 14	0	-	8	9.3
	IIB	28	<u>1</u> , <u>5</u>	25	<u>1</u> , <u>5</u>	21	<u>1</u> , <u>5</u>	74	86
	IIC	1	17	1	20	1	<u>16</u>	3	3.5
	IVB	0	-	0	-	1	6	1	1.2
	Total	37		29		23		86	100

Underlined pulsotype numbers have been found in more than one visit

Discussion générale

Le but de ce projet était d'évaluer la présence, la circulation, la distribution et l'évolution de la contamination par *Listeria monocytogenes* en amont de la production de produits prêt-à-manger qui est l'étape habituellement prise en compte par la surveillance. Si la littérature sur le sujet est abondante au niveau international, particulièrement en Europe et dans une moindre mesure aux États-Unis (Giovannacci, Ragimbeau *et al.*, 1999, Autio, Sateri *et al.*, 2000, Chasseignaux, Gerault *et al.*, 2002, Wesley, Larsen *et al.*, 2008, Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010, Ortiz, Lopez *et al.*, 2010), à notre connaissance aucune donnée sur la situation au Québec n'avait été publiée.

Dans notre étude, nous avons opté pour une observation globale du secteur en amont de la production de prêt-à-manger. Pour ce faire, des échantillons ont tout d'abord été récoltés au niveau des parcs d'attente lors du fonctionnement de l'usine. Ces échantillons permettent de déterminer si la contamination à cette étape provient de l'environnement ou est plutôt apportée à l'abattoir par les animaux en fin d'élevage. Ce dernier postulat est dérivé des observations qui ont été faites sur *Salmonella*, mais aussi sur *Listeria monocytogenes* en Europe. Ces observations démontrent que ces pathogènes peuvent être transportés à partir des fermes par les porcs vivants, pour ensuite contaminer l'environnement des parcs d'attente à l'abattoir (Beloeil, Chauvin *et al.*, 2004, Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010). Des échantillonnages ont ensuite été effectués dans la zone d'abattage et la zone de découpe. Dans notre étude, nous avons défini la zone d'abattage comme étant le regroupement des différentes étapes d'abattage, mais aussi des étapes d'habillage de la carcasse et de ressuyage. La zone de découpe était quant à elle, composée des salles où les découpes primaires étaient effectuées suite au ressuyage. Les échantillonnages lors de ces étapes ont été effectués suite à

l'application du protocole de lavage et de désinfection. Ils permettent donc d'avoir un aperçu de la persistance possible des souches dans ces environnements. La prise d'échantillons aux différentes étapes de la production (parcs d'attente, zone d'abattage et zone de découpe) a également permis d'évaluer la circulation de ces souches dans ces environnements.

La sensibilité de la détection de *Listeria monocytogenes* dans ces échantillons était une préoccupation importante dans cette étude. Nous avons opté pour une technique dérivée de la méthode standard MFHPB-30 de Santé Canada. Cette technique consiste à utiliser deux milieux enrichissements; le premier dans un bouillon l'UVM-I, et l'autre dans le bouillon FRASER. Dans la méthode standard, ces deux bouillons sont ensuite inoculés sur deux milieux de culture soit un milieu traditionnel Oxford et un autre milieu au choix (Franco Pagotto, 2011). Comme il a été discuté dans le recensement de littérature, les milieux chromogènes permettent une très bonne récupération des souches de *Listeria monocytogenes* et ce, même dans les conditions présentant une forte compétition. Dans ce cas, si nous avons opté pour l'utilisation d'une gélose traditionnelle comme le milieu Oxford, il aurait fallu repiquer un nombre très élevé d'isolats au hasard sans aucun indice sur l'espèce et ce, avant la confirmation par des tests biochimiques. Le tout, afin de réduire le risque de résultats faux négatifs (Bauwens, Vercammen *et al.*, 2003, Gnanou Besse, Barre *et al.*, 2010). Sachant que les échantillons que nous avons traités lors de cette étude provenaient entre autres des sols de parcs d'attente où il y avait une forte présence de matières fécales et de l'environnement de l'usine, une contamination par une grande variété de microorganismes était prévisible. Nous avons donc retenu une technique se basant sur le seul milieu chromogène ALOA. L'utilisation d'une méthode à deux enrichissements et sur gélose chromogène permet la détection de

Listeria monocytogenes dans des échantillons où sa présence est extrêmement faible comparée aux autres espèces de *Listeria* non pathogènes. De fait, dans plusieurs cas dans notre étude, ces espèces « compétitrices » couvraient la gélose alors que seules quelques colonies typiques des *Listeria* pathogènes étaient présentes et isolées sur les boîtes, et ce aussi bien après le second enrichissement qu'à l'issue du premier. L'utilisation d'une technique à un seul enrichissement, aurait alors augmenté les risques de perdre ces isolats dans le bruit de fond causé par les autres espèces. Le choix de la méthode de détection dans un contexte de recherche comme le nôtre est dicté par le meilleur compromis vers la récolte d'un nombre de souches élevé.

Pour le génotypage des souches, la technique de RFLP-PFGE a été utilisée. Deux enzymes ont été utilisées pour cette étape soit *AscI* et *ApaI*. L'enzyme *AscI* a permis de produire 20 profils génotypiques différents alors que 23 profils ont été produits à l'aide de l'enzyme *ApaI*. Comme c'est l'enzyme *ApaI* qui a permis de différencier un plus grand nombre de génotypes dans les *Listeria monocytogenes* que nous avons isolés, nos résultats supportent ceux d'études précédentes, qui démontrent que l'enzyme *AscI* est plus discriminante qu'*ApaI* (Brosch, Brett *et al.*, 1996, Davis, Hancock *et al.*, 2003, Fugett, Schoonmaker-Bopp *et al.*, 2007). Cependant, il a été rapporté que ces enzymes génèrent le même index de Simpson lorsqu'elles sont comparées pour une utilisation de PFGE (Davis, Hancock *et al.*, 2003). Lorsque les profils ont été combinés, 24 profils différents ont été obtenus. Il a déjà été démontré que l'utilisation de deux enzymes permet une meilleure discrimination des souches, ce qui a aussi été le cas dans notre collection de souches (Fugett, Schoonmaker-Bopp *et al.*, 2007). Ainsi dans notre étude, l'utilisation de ces deux enzymes permet une bonne discrimination entre les différentes souches comme le démontrent nos résultats. Cette technique est actuellement la méthode

standard pour le typage moléculaire de *Listeria monocytogenes* et des protocoles standards ont été mis au point par le groupe Pulsenet pour ce microorganisme (Graves et Swaminathan, 2001). Les profils qui ont été obtenus ont ensuite été comparés grâce au coefficient de Dice qui est fréquemment utilisé pour comparer la similarité entre les patrons des bandes obtenues par PFGE (Davis, Hancock *et al.*, 2003, Ferreira, Barbosa *et al.*, 2011). Ce coefficient est calculé en comparant le nombre de bandes communes entre deux profils sur le nombre total de bandes. Ceci tient pour acquis que les bandes ayant le même poids moléculaire sont identiques génétiquement (Dice, 1945). En théorie des bandes de même poids pourraient cependant être le résultat de coupure à des endroits différents, causant des agencements de bandes erronés (Davis, Hancock *et al.*, 2003). Une étude menée sur *E. coli* a démontré une bonne corrélation entre le coefficient de Dice et la parenté génétique des bactéries. Cette même étude conclut également que l'utilisation de plusieurs enzymes permet aussi d'améliorer cette relation. Ceci conforte notre décision d'avoir utilisé deux enzymes dans notre étude (Davis, Hancock *et al.*, 2003). La matrice de coefficients de Dice a ensuite été utilisée pour former des groupes à l'aide de la méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) et un dendrogramme a été construit. Ce dendrogramme a permis de mettre en évidence la présence de deux groupes bien définis de souches: soit un groupe contenant les souches de la lignée I (séro groupe IVB et IIB) et les souches de la lignée II (séro groupe IIA et IIC). Ces deux groupes correspondent aux deux lignées de *Listeria monocytogenes* les plus fréquemment retrouvées en production alimentaire. Cette capacité de la technique de PFGE à différencier les souches par rapport à leurs lignées avait déjà été observée (Brosch, Chen *et al.*, 1994). De plus, dans notre étude, chaque pulsotype était lié à un séro groupe unique. La corrélation entre le pulsotype et le sérotype avait aussi déjà été décrite dans certaines études cependant, peu

d'information est disponible sur les bases moléculaires de ce lien (Nadon, Woodward *et al.*, 2001, Okwumabua, O'Connor *et al.*, 2005). À l'intérieur du groupe de la lignée I, les souches étaient encore séparées en deux groupes selon leur sérotype. Par contre dans la lignée II, les souches des différents sérotypes étaient mélangées. Ces résultats suggèrent que les souches des différents sérotypes de la lignée II sont moins apparentées génétiquement entre elles. Ceci est supporté par la littérature qui démontre que les *Listeria monocytogenes* de la lignée II sont plus variables génétiquement. Une des hypothèses émises quant à cette variabilité serait une plus grande sensibilité à la pression de sélection de l'environnement. Ainsi, il a été démontré que les souches de la lignée II ont un plus haut taux de recombinaison que les souches de la lignée I et que ces événements de recombinaison pourraient être importants pour la capacité de cette lignée à s'adapter et à survivre dans une multitude d'environnements.(den Bakker, Didelot *et al.*, 2008, Orsi, Sun *et al.*, 2008).

Les résultats que nous avons obtenus démontrent pour la première fois au Québec la présence de *Listeria monocytogenes* à toutes les étapes de la production dans une usine d'abattage et de découpe de la viande de porc. Par ailleurs, les résultats révèlent une très faible présence de cette bactérie dans les échantillons prélevés dans les parcs d'attente (1,7%) et une augmentation statistiquement significative lors des étapes précédant la découpe (19,1%) et de la découpe (41,7%), et ce même après les étapes de nettoyage et de désinfection. Les résultats obtenus dans ces deux dernières sections sont très élevés comparés aux données disponibles dans la littérature. En effet, dans les zones d'abattage, les études qui ont été effectuées précédemment rapportent des niveaux de contamination dans l'environnement et sur les équipements variant de 0 à 10 % (Gill et Jones, 1995, Autio, Sateri *et al.*, 2000, Ryser et

Marth, 2007, Ortiz, Lopez *et al.*, 2010). Par contre, à l'étape de la découpe, après lavage et désinfection, des niveaux très variables ont été retrouvés et ce à l'intérieur même de certaines études. Ces niveaux allaient d'une absence à 27.5 % d'échantillons positifs avec une moyenne observée autour de 10% (Salvat, Toquin *et al.*, 1995, Chasseignaux, Gerault *et al.*, 2002, Gudbjörnsdóttir, Suihko *et al.*, 2004, Ortiz, Lopez *et al.*, 2010). Il est cependant intéressant de remarquer que dans toutes ces études, les milieux de culture utilisés sont des milieux classiques, non chromogènes, alors que nous avons utilisé le milieu ALOA dans nos expériences. Ainsi, les valeurs publiées pourraient sous-estimer la présence de *Listeria monocytogenes* dans les environnements fortement contaminés (Bauwens, Vercammen *et al.*, 2003). De plus, dans le contexte de cette étude, notre but était d'obtenir un nombre maximum de souches, ainsi, le plan d'échantillonnage standardisé qui a été utilisé comprenait un plus grand nombre de sites et des surfaces plus grandes que ce qui est habituellement considéré, y compris dans les politiques mises au point par l'Agence canadienne d'inspection des aliments. Aussi, les sites que nous avons sélectionnés pour l'échantillonnage étaient principalement des sites qui nous semblaient être à risque puisqu'ils semblaient difficiles à atteindre; ou présentaient de traces de matières organiques après le nettoyage. Ainsi, la proportion d'échantillons positifs obtenus pourrait être plus élevée que ce qui pourrait être retrouvé si les échantillonnages sont effectués sur les surfaces plus accessibles de cette usine ou de façon aléatoire. Ceci amplifierait donc dans notre étude, la perception de la présence de ce pathogène dans l'usine. Cependant, certains de ces sites positifs étaient des surfaces en contact direct avec les aliments crus lors du fonctionnement de l'usine, comme des convoyeurs ou des équipements de découpe. La présence résiduelle de *Listeria monocytogenes* sur ces sites représente donc un risque de contamination du produit. Comme la surveillance pour *Listeria*

monocytogenes n'est obligatoire que dans les usines de production d'aliments prêt-à-manger (Anonyme, 2011b), il n'y a présentement aucune surveillance spécifique de cette bactérie dans l'usine où nous avons effectué nos échantillonnage. Alors, dans un contexte de contrôle de *Listeria monocytogenes* dans toute la filière de production porcine, il pourrait être intéressant d'appliquer un meilleur contrôle de ce pathogène à cette étape. En effet, il est connu que des aliments crus contaminés peuvent être responsables de l'entrée de nouvelles souches de *Listeria monocytogenes* dans une usine de prêt-à-manger où celles-ci peuvent persister dans l'environnement et contaminer le produit (Thevenot, Delignette-Muller *et al.*, 2005, Prencipe, Rizzi *et al.*, 2012). Ainsi, en réduisant la contamination des produits crus, il apparait que l'on pourrait réduire la pression de la contamination sur les étapes en aval. Dans le cas de cette usine, il pourrait donc être intéressant de revoir le protocole de lavage et de désinfection pour parfaire le contrôle des points apparus critiques dans notre étude.

Malgré la très faible contamination retrouvée au niveau des parcs d'attente, nous y avons retrouvé proportionnellement un plus grand nombre de pulsotypes (10) différents répartis dans 3 sérogroupes. Sur ces 10 pulsotypes, seul un d'entre eux a été détecté lors de plus d'une visite alors que chacun des autres n'a été retrouvé qu'à une seule des dates d'échantillonnage. De plus, l'environnement de ces parcs n'était pas contaminé en permanence, mais seulement lors de 3 de nos 9 visites et ce de façon non consécutive. Ces résultats semblent démontrer qu'il n'y a pas de persistance de souches dans cet environnement, mais qu'il y a plutôt un apport sporadique de nouvelles souches de *Listeria monocytogenes*. De plus, nous avons démontré qu'il y avait une forte variabilité tant au niveau du pulsotype que du sérotype chez ces souches. Ceci est en accord avec la théorie qui veut que *Listeria monocytogenes* puisse entrer

dans l'usine avec les porcs vivants pour ensuite contaminer l'environnement par leurs matières fécales (Hellstrom, Laukkanen *et al.*, 2010). Comme nous l'avons décrit, ces souches peuvent ensuite circuler dans le continuum de la production de produits de porc pour atteindre la zone de découpe. De plus, la variation du niveau de contamination sur les sols des parcs d'attente que nous avons obtenus dans nos résultats semble démontrer que cette contamination est fortement variable entre les divers élevages. En effet, *Listeria monocytogenes* n'a été retrouvé que lors de trois des visites qui ont été effectuées et l'une d'elles avait une diversité particulièrement élevée de souches. Ainsi, quelques fermes fortement contaminées pourraient être responsables d'une partie de la contamination dans l'étape de la découpe. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer, dans les fermes Québécoises, les facteurs qui affecteraient la contamination des animaux. Ceci afin de faire des recommandations pour réduire au maximum l'entrée de nouvelles souches dans les abattoirs et d'adapter les pratiques d'élevages en conséquence. Il a été démontré dans la littérature que la principale source de contamination des animaux à la ferme est la consommation d'aliments contaminés par exemple par les aliments en soupe qui sont fréquemment utilisés en Europe mais aussi par le maïs fermenté (Beloeil, Chauvin *et al.*, 2003). Ainsi, la piste alimentaire, en commençant par celle de porcs nourris avec du maïs fermenté constitue une perspective de recherche pour mieux comprendre l'introduction de *Listeria* à l'abattoir depuis la ferme.

Malgré une augmentation de la contamination résiduelle à chaque nouvelle étape de la production, il apparaît que la diversité des isolats au niveau de l'abattage et plus encore au niveau de la zone de découpe est plus faible qu'au niveau des parcs d'attente. En effet, dans chacune de ces étapes une souche majoritaire semble émerger, plus nettement au niveau de la

zone de découpe. En effet, un seul pulsotype a été détecté dans une grande proportion des échantillons à cette étape. Ces souches étaient fortement présentes même après les étapes de nettoyage et de désinfection sur de nombreux sites environnementaux, sur des surfaces en contact ou non avec les aliments et sur les équipements. Comme ces souches n'étaient pas particulièrement représentées dans les autres étapes de la production, il est suggéré qu'elles pourraient avoir des caractéristiques spécifiques qui leur permettent de mieux subsister dans ces environnements de la production. Plusieurs auteurs ont rapporté l'existence de souches persistantes dans les environnements de la production alimentaire (Pan, Breidt *et al.*, 2006a, Thevenot, Dernburg *et al.*, 2006, Ortiz, Lopez *et al.*, 2010). Cependant, les caractéristiques précises qui rendent ces souches résidentes ne sont pas bien connues. La littérature fait état de plusieurs facteurs qui pourraient permettre la persistance de certaines souches par rapport à d'autres, telle qu'une plus grande résistance aux produits de désinfection comme les ammoniums quaternaires, mais aussi une meilleure capacité d'attachement et de production de biofilms qui pourrait être liée à cette résistance (Romanova, Favrin *et al.*, 2002, Adriaio, Vieira *et al.*, 2008, Carpentier et Cerf, 2011). Ainsi, dans ce contexte, il est intéressant de constater que la souche majeure, soit le pulsotype 1, est fortement présente dans la zone de la découpe et ce, même après lavage désinfection, semble bien persister dans cet environnement et fait partie de la lignée I. Plusieurs auteurs ont proposé l'idée qu'il y avait une variabilité dans la capacité à s'attacher et à former des biofilms qui seraient liés à la lignée génétique ou au sérotype. D'autres auteurs ont émis l'hypothèse que les souches de lignée I formeraient plus efficacement des biofilms (Djordjevic, Wiedmann *et al.*, 2002, Takahashi, Miya *et al.*, 2009). Cette théorie est cependant critiquée puisque d'autres études ont plutôt mesuré une meilleure formation chez les souches de la lignée II (Lunden, Miettinen *et al.*, 2000, Borucki, Peppin *et*

al., 2003a). L'association entre la formation de biofilm et la lignée pourrait expliquer en partie la sur-représentation des souches de ce pulsotype 1 en découpe. Dans notre étude les caractéristiques liées à la persistance, telle que la formation de biofilms, n'ont pas été évaluées. Il pourrait être intéressant de mesurer leur variabilité chez les souches que nous avons retrouvées dans l'usine, en comparant les souches persistantes (telles que les isolats du pulsotype 1) aux autres souches transitoires. Cela pourrait nous permettre de mieux expliquer les facteurs qui sont responsables de la sélection de populations particulières et la persistance de souches dans certaines des zones de l'usine. Le concept même de souches persistantes chez *Listeria monocytogenes* est cependant matière à débat. Par exemple, Carpentier et Cerf, suite à l'analyse de la littérature disponible sur le sujet, supportent plutôt la théorie que ces souches persistant dans l'environnement, n'ont pas de caractéristiques spécifiques, mais qu'elles sont simplement retrouvées sur des sites difficiles à atteindre lors du nettoyage et de la désinfection de l'usine et émergent donc lors du fonctionnement. Ainsi, ce serait plutôt l'existence de sites constituant des abris tels que des surfaces abimées ou de sites difficiles à atteindre qui seraient responsables de la persistance dans une usine (Carpentier et Cerf, 2011). Dans le cas de notre étude, nous avons effectivement retrouvé des souches persistantes dans des sites difficiles à atteindre lors du protocole de lavage et de désinfection. Cependant, nous avons aussi retrouvé ces mêmes souches sur des sites environnementaux de l'usine tel que le sol et les murs. Il semble donc que ces souches pourraient être particulièrement adaptées aux environnements des zones d'abattage et de découpe. Ainsi, leurs meilleures survies lors du nettoyage et de la désinfection ou leurs meilleures performances de croissance ont permis leur sélection et leur émergence parmi la multitude de souches constamment introduites dans l'usine.

Il est intéressant de constater que certaines des souches qui ont été retrouvées dans cette étude font partie de sérogroupe qui contiennent des sérotypes qui sont reconnus pour être particulièrement retrouvés chez les cas humains. Ces souches sont principalement des sérotypes 4b et 1/2b de la lignée I, mais aussi le sérotype 1/2a de la lignée II (Orsi, Sun *et al.*, 2008). Ainsi, le sérogroupe IVB, auquel appartient le sérotype 4b qui est reconnu comme étant particulièrement retrouvé dans les éclosions à travers le monde (Hong, Doumith *et al.*, 2007), et IIA qui contient les souches de sérotype 1/2a sont, au Canada, responsables de la majorité des cas humains (Knabel, Reimer *et al.*, 2012). Ainsi, il a déjà été établi que certaines lignées et certains sérotypes sont plus fréquemment retrouvés chez l'homme. Les caractéristiques qui rendent ces souches particulièrement virulentes pour les humains ne sont pas très bien connues. Cependant, dans les dernières années, plusieurs études ont permis de découvrir certains facteurs influençant directement la virulence des souches telle que la présence d'un codon-stop prématuré dans le gène de l'internaline A dans plus de 30 % des souches de la lignée II (Chen, Ross *et al.*, 2011). Il a été démontré que la présence de cette internaline tronquée affectait l'efficacité de l'invasion tant dans des études *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines et que ces souches présentaient aussi une virulence considérablement atténuée sur modèle animal (Chen, Ross *et al.*, 2011, Van Stelten, Simpson *et al.*, 2011). Dans notre étude, des souches de cette lignée ont été retrouvées à toutes les étapes et il pourrait être intéressant de caractériser celle-ci quant à l'intégrité de leur InlA, surtout considérant la présence d'une souche de sérotype 1/2a hautement virulente au Canada (Knabel, Reimer *et al.*, 2012). Des études ont aussi mis en évidence la présence d'un facteur de virulence supplémentaire, la listeriolyse S, qui est associé à une plus grande virulence et qui n'est présente que dans une sous-population de souches du sérogroupe IV (Nightingale, Windham

et al., 2005, Cotter, Draper *et al.*, 2008). Il pourrait aussi être intéressant d'évaluer sa présence dans les souches que nous avons retrouvées, principalement chez celles qui émergent au niveau de la découpe.

Ainsi, la virulence des souches est un autre des facteurs qui est à prendre en compte dans l'élaboration des politiques sur *Listeria monocytogenes*. Pour le moment, les politiques qui ont été élaborées considèrent toutes les souches de *Listeria monocytogenes* comme ayant le même potentiel infectieux. Dans le cas de notre étude, nous avons mis en évidence une variabilité des souches aux différentes étapes du procédé d'abattage et de découpe. Après avoir confirmé que ces résultats s'appliquent aux autres abattoirs de la province, ces résultats justifieront la caractérisation du potentiel de virulence de ces souches. Cela permettra de mieux caractériser les risques associés à la présence de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement de la découpe, et permettra également de compléter la surveillance en amont du secteur prêt à manger et la mise en place de politiques visant plus particulièrement ces souches souches virulentes. De cette manière, on pourra limiter la contamination des intrants par ces souches plus dangereuses et leur introduction dans les usines de produits prêt-à-manger.

Conclusion

En conclusion, cette étude a permis d'obtenir des d'informations sur la présence, la distribution et l'évolution de la contamination par *Listeria monocytogenes* dans une usine d'abattage et de découpe québécoise. Premièrement, notre étude a permis de décrire la présence et la circulation de souches de *Listeria monocytogenes* des sérotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c et 4b dans l'abattoir échantillonné et ce, de l'entrée avec les porcs par l'analyse des parcs d'attente jusqu'à la salle de découpe. Nous avons mis en évidence une contamination faible, mais d'une variété de souches de pulsotypes différents dans les parcs d'attente. Ceci laisse penser qu'il y a un apport régulier de nouvelles souches avec l'arrivée de porcs contaminés. Nous avons ensuite démontré la présence croissante de ce microorganisme à chacune des étapes de la production et ce, jusque dans la salle de découpe. À cette étape, une portion élevée des sites que nous avons qualifiés comme associés à un risque de contamination du produit était contaminée. Dans cette salle de découpe, une souche majoritaire et persistante a été identifiée démontrant l'existence de souches particulièrement adaptées à l'environnement de l'usine et qui y a été sélectionnées. De plus, des souches fortement apparentées génétiquement ont été identifiées à chacune des étapes de la production confirmant la circulation du microorganisme entre les différentes zones de l'abattoir.

Comme nous l'avons démontré dans cette étude, même après nettoyage et désinfection, l'environnement de la salle de découpe était encore contaminé par *Listeria monocytogenes*. Ces résultats démontrent qu'une adaptation du protocole de nettoyage et de désinfection est nécessaire et pourrait permettre une réduction de cette contamination résiduelle. Cette étude n'a cependant été réalisée que dans une seule usine du Québec. Comme la forte contamination

dans la zone de découpe pourrait être liée à des pratiques spécifiques à l'usine, il serait donc pertinent de répéter l'étude dans d'autres usines de production porcine de façon à confirmer si les résultats sont applicables à toutes les usines de ce type au Québec. Il serait aussi être intéressant de répéter l'expérience dans d'autres types de production telle que dans l'industrie de la volaille et de comparer les isolats retrouvés.

Lors de futures études, il serait aussi être intéressant de mieux caractériser les souches qui ont été recueillies pendant l'échantillonnage. En effet, il a été démontré qu'il existe une forte variabilité dans la virulence de différentes souches de *Listeria monocytogenes* par exemple par la présence du facteur de virulence Listeriolysine S ou d'un codon-stop prématuré dans l'internaline A. De plus, il serait intéressant de tenter de déterminer les caractéristiques qui rendent les pulsotypes majeurs si dominants dans leurs zones respectives de l'usine. Une meilleure connaissance de la virulence des souches et des caractéristiques permettant la persistance permettraient une meilleure orientation des politiques de surveillance.

Finalement, ces résultats démontrent l'importance de porter une attention à *Listeria monocytogenes* dans toute la filière de production porcine et dans le cas de l'usine décrite dans ce rapport particulièrement au niveau des sites plus difficiles d'accès de la salle de découpe lors des étapes de nettoyage et de désinfection. Nous pensons effectivement qu'en agissant en amont dans la chaîne de transformation, il sera possible de réduire l'introduction de souches de *Listeria monocytogenes* avec les matières premières le produit entrant dans les usines de production de produits prêt-à-manger.

Bibliographie

- Adriao, A., M. Vieira, I. Fernandes, M. Barbosa, M. Sol, R. P. Tenreiro, L. Chambel, B. Barata, I. Zilhao, G. Shama, S. Perni, S. J. Jordan, P. W. Andrew and M. L. Faleiro (2008). "Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces." *Int J Food Microbiol* **123**(1-2): 142-150.
- Andritsos, N. D., M. Mataragas, E. Mavrou, A. Stamatiou and E. H. Drosinos (2012). "The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece." *Meat Science* **91**(4): 486-489.
- Angelidis, A. S. and G. M. Smith (2003). "Role of the Glycine Betaine and Carnitine Transporters in Adaptation of *Listeria monocytogenes* to Chill Stress in Defined Medium." *Appl Environ Microbiol* **69**(12): 7492-7498.
- Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda and B. J. Wilkinson (1997). "Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures." *Appl Environ Microbiol* **63**(10): 3887-3894.
- Anonyme (2003a). Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat and Poultry Products; Final Rule. D. o. Agriculture.
- Anonyme (2003b). *Listeria monocytogenes* Risk Assessment. F. a. D. Administration.
- Anonyme (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*—Part 1: Detection method Amendment 1: Modification of the isolation media and the hemolysis test, and inclusion of precision data, International Standard ISO 11290-1. I. O. f. Standardization.
- Anonyme (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
- Anonyme (2007). Directives pour l'application des principes généraux d'hygiène des denrées alimentaires à la maîtrise de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer. C. Alimentarius.
- Anonyme (2009). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg, and Environmental Samples U. s. D. o. agriculture. Laboratory Guidebook
- Anonyme (2011a). "Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Jensen Farms Cantaloupe—United States, August–September 2011." *American Journal of Transplantation* **11**(12): 2768-2769.
- Anonyme (2011b). Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts-à-manger (2011). S. Canada.
- Autio, T., J. Lunden, M. Fredriksson-Ahomaa, J. Bjorkroth, A. M. Sjoberg and H. Korkeala (2002). "Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources." *Int J Food Microbiol* **77**(1-2): 83-90.
- Autio, T., T. Sateri, M. Fredriksson-Ahomaa, M. Rahkio, J. Lunden and H. Korkeala (2000). "*Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses." *J Food Prot* **63**(10): 1438-1442.
- Bauwens, L., F. Vercammen and A. Hertsens (2003). "Detection of pathogenic *Listeria* spp. in zoo animal faeces: use of immunomagnetic separation and a chromogenic isolation medium." *Veterinary Microbiology* **91**(2-3): 115-123.

- Beloeil, P. A., C. Chauvin, K. Proux, F. Madec, P. Fravallo and A. Alioum (2004). "Impact of the Salmonella status of market-age pigs and the pre-slaughter process on Salmonella caecal contamination at slaughter." Veterinary Research **35**(5): 513-530.
- Beloeil, P. A., C. Chauvin, M. T. Toquin, C. Fablet, Y. Le Notre, G. Salvat, F. Madec and P. Fravallo (2003). "*Listeria monocytogenes* contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France." Veterinary Research **34**(6): 737-748.
- Berzins, A., S. Hellstrom, I. Silins and H. Korkeala (2010). "Contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked pork processing." J Food Prot **73**(11): 2103-2109.
- Bibb, W. F., B. Schwartz, B. G. Gellin, B. D. Plikaytis and R. E. Weaver (1989). "Analysis of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations." Int J Food Microbiol **8**(3): 233-239.
- Bohaychuk, V. M., G. E. Gensler, R. K. King, K. I. Manninen, O. Sorensen, J. T. Wu, M. E. Stiles and L. M. McMullen (2006). "Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada." J Food Prot **69**(9): 2176-2182.
- Bonazzi, M., M. Lecuit and P. Cossart (2009). "*Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis." Cell Microbiol **11**(5): 693-702.
- 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.
- Borucki, M. K., J. D. Peppin, D. White, F. Loge and D. R. Call (2003a). "Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **69**(12): 7336-7342.
- Borucki, M. K., J. D. Peppin, D. White, F. Loge and D. R. Call (2003b). "Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **69**(12): 7336-7342.
- Boscher, E., E. Houard and M. Denis (2012). "Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes and pulsotypes in sows and fattening pigs in farrow-to-finish farms (France, 2008)." J Food Prot **75**(5): 889-895.
- 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., M. Brett, B. Catimel, J. B. Luchansky, B. Ojeniyi and J. Rocourt (1996). "Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)." Int J Food Microbiol **32**(3): 343-355.
- Brosch, R., J. Chen and J. B. Luchansky (1994). "Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar." Appl Environ Microbiol **60**(7): 2584-2592.
- Bruhn, J. B., B. F. Vogel and L. Gram (2005). "Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments." Appl Environ Microbiol **71**(2): 961-967.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, L. Mereghetti, B. Moreno and M. del Camino Garcia-Fernandez (2002). "Evaluation of the international phage typing set and some experimental phages for typing of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain." J Appl Microbiol **92**(1): 90-96.

- 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." International Journal of Food Microbiology **97**(2): 111-122.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition (U.S.) The bad bug book foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. College Park, Md., U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Chan, Y. C. and M. Wiedmann (2008). "Physiology and Genetics of *Listeria Monocytogenes* Survival and Growth at Cold Temperatures." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **49**(3): 237-253.
- Chasseignaux, E., P. Gerault, M. T. Toquin, G. Salvat, P. Colin and G. Ermel (2002). "Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants." FEMS Microbiol Lett **210**(2): 271-275.
- 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." Journal of Applied Microbiology **91**(5): 888-899.
- Chaturongakul, S. and K. J. Boor (2006). "SigmaB activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **72**(8): 5197-5203.
- Chen, J., Q. Chen, J. Jiang, H. Hu, J. Ye and W. Fang (2010). "Serovar 4b complex predominates among *Listeria monocytogenes* isolates from imported aquatic products in China." Foodborne Pathog Dis **7**(1): 31-41.
- Chen, J., X. Zhang, L. Mei, L. Jiang and W. Fang (2009). "Prevalence of *Listeria* in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates." Foodborne Pathog Dis **6**(1): 7-14.
- Chen, Y., W. H. Ross, R. C. Whiting, A. Van Stelten, K. K. Nightingale, M. Wiedmann and V. N. Scott (2011). "Variation in *Listeria monocytogenes* Dose Responses in Relation to Subtypes Encoding a Full-Length or Truncated Internalin A." Appl Environ Microbiol **77**(4): 1171-1180.
- Chen, Y., W. Zhang and S. J. Knabel (2007). "Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **45**(3): 835-846.
- 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.
- Chico-Calero, I., M. Suárez, B. González-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel, T. E. L. G. Consortium and J. A. Vázquez-Boland (2002). "Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(1): 431-436.
- Clark, C. G., J. Farber, F. Pagotto, N. Ciampa, K. Dore, C. Nadon, K. Bernard and L. K. Ng (2010). "Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004." Epidemiol Infect **138**(4): 559-572.

- Cornu, M., M. Kalmokoff and J. P. Flandrois (2002). "Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths." Int J Food Microbiol **73**(2-3): 261-274.
- 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 Pathog **4**(9): e1000144.
- Davis, M. A., D. D. Hancock, T. E. Besser and D. R. Call (2003). "Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7." J Clin Microbiol **41**(5): 1843-1849.
- Dawson, S. J., M. R. Evans, D. Willby, J. Bardwell, N. Chamberlain and D. A. Lewis (2006). "Listeria outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom." Euro Surveill **11**(6): 89-91.
- de Valk, H., V. Vaillant, C. Jacquet, J. Rocourt, F. Le Querrec, F. Stainer, N. Quelquejeu, O. Pierre, V. Pierre, J. C. Desenclos and V. Goulet (2001). "Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999-February 2000." Am J Epidemiol **154**(10): 944-950.
- den Bakker, H. C., B. M. Bowen, L. D. Rodriguez-Rivera and M. Wiedmann (2012). "FSL J1-208, a virulent uncommon phylogenetic lineage IV *Listeria monocytogenes* strain with a small chromosome size and a putative virulence plasmid carrying internalin-like genes." Appl Environ Microbiol **78**(6): 1876-1889.
- den Bakker, H. C., X. Didelot, E. D. Fortes, K. K. Nightingale and M. Wiedmann (2008). "Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*." BMC Evol Biol **8**: 277.
- 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." Journal of Applied Microbiology **104**(6): 1552-1561.
- Dice, L. R. (1945). "Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species." Ecology **26**(3): 297-302.
- 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.
- Dongyou, L. (2008a). Epidemiology. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press. **null**: 27-59.
- Dongyou, L. (2008b). Epidemiology. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press: 27-59.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193.
- Dorozynski, A. (2000). "Seven die in French listeria outbreak." BMJ **320**(7235): 601.
- Farber, J. M. and J. Z. Losos (1988). "*Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen." CMAJ **138**(5): 413-418.
- Farzan, A., R. M. Friendship, A. Cook and F. Pollari (2010). "Occurrence of Salmonella, Campylobacter, Yersinia enterocolitica, Escherichia coli O157 and *Listeria monocytogenes* in Swine." Zoonoses Public Health **57**(6): 388-396.

- Fenlon, D. R., J. Wilson and W. Donachie (1996). "The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing." *J Appl Bacteriol* **81**(6): 641-650.
- Ferreira, V., J. Barbosa, M. Stasiewicz, K. Vongkamjan, A. Moreno 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.
- Ferris, M. M., X. Yan, R. C. Habbersett, Y. Shou, C. L. Lemanski, J. H. Jett, T. M. Yoshida and B. L. Marrone (2004). "Performance Assessment of DNA Fragment Sizing by High-Sensitivity Flow Cytometry and Pulsed-Field Gel Electrophoresis." *Journal of Clinical Microbiology* **42**(5): 1965-1976.
- Foodnet. (2010). "Number and percentage of hospitalizations in 2010, by pathogen, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), United States ", 2012, from <http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/Table11.pdf>.
- Fosse, J., M. Laroche, N. Oudot, H. Seegers and C. Magras (2011). "On-farm multi-contamination of pigs by food-borne bacterial zoonotic hazards: An exploratory study." *Veterinary Microbiology* **147**(1-2): 209-213.
- Franco Pagotto, K. H. a. J. F. (2011). "Isolation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. from foods and environmental samples." 2012.
- Freitag, N. E., G. C. Port and M. D. Miner (2009). "*Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen." *Nat Rev Micro* **7**(9): 623-628.
- Fugett, E. B., D. Schoonmaker-Bopp, N. B. Dumas, J. Corby and M. Wiedmann (2007). "Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as Well as Widely Distributed PFGE Types." *J Clin Microbiol* **45**(3): 865-873.
- Gamboa-Marín, A., S. Buitrago M, K. Pérez-Pérez, M. Mercado R, R. Poutou-Piñales and A. Carrascal-Camacho (2012). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry." *Revista MVZ Córdoba* **17**: 2827-2833.
- Gandhi, M. and M. L. Chikindas (2007). "Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive." *Int J Food Microbiol* **113**(1): 1-15.
- Garrec, N., F. Picard-Bonnaud and A. M. Pourcher (2003). "Occurrence of *Listeria* sp and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species." *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**(3): 275-283.
- Gaulin, C., D. Ramsay and S. Bekal (2012). "Widespread Listeriosis Outbreak Attributable to Pasteurized Cheese, Which Led to Extensive Cross-Contamination Affecting Cheese Retailers, Quebec, Canada, 2008." *Journal of Food Protection* **75**(1): 71-78.
- Gerner-Smidt, P. and F. Scheutz (2006). "Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study." *Foodborne Pathog Dis* **3**(1): 74-80.
- Gill, C. O. and T. Jones (1995). "The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants." *Food Microbiology* **12**(0): 135-141.

- Gilmour, M., M. Graham, G. Van Domselaar, S. Tyler, H. Kent, K. 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**(1): 120.
- Gilot, P., P. Andre and J. Content (1999). "*Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin." Infect Immun **67**(12): 6698-6701.
- 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., L. Barre, C. Buhariwalla, M. L. Vignaud, E. Khamissi, E. Decourseulles, M. Nirsimloo, M. Chelly and M. Kalmokoff (2010). "The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis." Int J Food Microbiol **136**(3): 345-351.
- Goldfine, H., H. Shen and SpringerLink (Online service) (2007). *Listeria monocytogenes* pathogenesis and host response. New York, Springer,; 1 online resource (xii, 287 p.).
- Gorski, L. (2008). Phenotypic Identification. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press. **null**: 139-168.
- Goulet, V., C. Hedberg, A. Le Monnier and H. de Valk (2008). "Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries." Emerg Infect Dis **14**(5): 734-740.
- Graves, L. M., L. O. Helsel, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, M. I. Daneshvar, S. E. Roof, R. H. Orsi, E. D. Fortes, S. R. Milillo, H. C. den Bakker, M. Wiedmann, B. Swaminathan and B. D. Sauders (2010). "*Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **60**(6): 1280-1288.
- 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**(1-2): 55-62.
- Greenwood, M., C. Willis, P. Doswell, G. Allen and K. Pathak (2005). "Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food." Journal of Applied Microbiology **99**(6): 1340-1345.
- Grif, K., G. Patscheider, M. P. Dierich and F. Allerberger (2003). "Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22**(1): 16-20.
- 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.
- Gudmundsdóttir, S., B. Gudbjörnsdóttir, H. Einarsson, K. G. Kristinsson and M. Kristjánsson (2006). "Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants." J Food Prot **69**(6): 1304-1311.
- Gundry, C. N., J. G. Vandersteen, G. H. Reed, R. J. Pryor, J. Chen and C. T. Wittwer (2003). "Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes." Clinical Chemistry **49**(3): 396-406.

- Hain, T., R. Ghai, A. Billion, C. Kuenne, C. Steinweg, B. Izar, W. Mohamed, M. Mraheil, E. Domann, S. Schaffrath, U. Karst, A. Goesmann, S. Oehm, A. Puhler, R. Merkl, S. Vorwerk, P. Glaser, P. Garrido, C. Rusniok, C. Buchrieser, W. Goebel and T. Chakraborty (2012). "Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*." BMC Genomics **13**(1): 144.
- Hald, T., A. Wingstrand, M. Swanenburg, A. von Altrock and B. M. Thorberg (2003). "The occurrence and epidemiology of Salmonella in European pig slaughterhouses." Epidemiol Infect **131**(3): 1187-1203.
- Hamon, M., H. Bierne and P. Cossart (2006). "*Listeria monocytogenes*: a multifaceted model." Nat Rev Microbiol **4**(6): 423-434.
- Hansen, L. T. and B. F. Vogel (2011). "Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products." Int J Food Microbiol **146**(1): 88-93.
- 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.
- Hayes, P. S., L. M. Graves, G. W. Ajello, B. Swaminathan, R. E. Weaver, J. D. Wenger, A. Schuchat and C. V. Broome (1991). "Comparison of cold enrichment and U.S. Department of Agriculture methods for isolating *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. The Listeria Study Group." Appl Environ Microbiol **57**(8): 2109-2113.
- Hellstrom, S., R. Laukkanen, K.-M. Siekkinen, J. Ranta, R. Maijala and H. Korkeala (2010). "*Listeria monocytogenes* Contamination in Pork Can Originate from Farms." Journal of Food Protection **73**(4): 641-648.
- Herschleb, J., G. Ananiev and D. C. Schwartz (2007). "Pulsed-field gel electrophoresis." Nat. Protocols **2**(3): 677-684.
- Hitchins, A. and K. Jinneman. (2011). "BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*."
- Hong, E., M. Doumith, S. Duperrier, I. Giovannacci, A. Morvan, P. Glaser, C. Buchrieser, C. Jacquet and P. Martin (2007). "Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001." Int J Food Microbiol **114**(2): 187-194.
- Hutchison, M. L., L. D. Walters, S. M. Avery, B. A. Synge and A. Moore (2004). "Levels of zoonotic agents in British livestock manures." Lett Appl Microbiol **39**(2): 207-214.
- Hyytia-Trees, E., S. C. Smole, P. A. Fields, B. Swaminathan and E. M. Ribot (2006). "Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157)." Foodborne Pathog Dis **3**(1): 118-131.
- Iida, T., M. Kanzaki, A. Nakama, Y. Kokubo, T. Maruyama and C. Kaneuchi (1998). "Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods." J Vet Med Sci **60**(12): 1341-1343.
- 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*." J Infect Dis **189**(11): 2094-2100.
- Jiang, X., M. Islam, J. Morgan and M. P. Doyle (2004). "Fate of *Listeria monocytogenes* in bovine manure-amended soil." J Food Prot **67**(8): 1676-1681.

- Jin, D., Y. Luo, Z. Zhang, W. Fang, J. Ye, F. Wu and G. Ding (2012). "Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis." *FEMS Microbiology Letters* **330**(1): 72-80.
- Kam, K. M., C. K. Y. Luey, M. B. Parsons, K. L. F. Cooper, G. B. Nair, M. Alam, M. A. Islam, D. T. L. Cheung, Y. W. Chu, T. Ramamurthy, G. P. Pazhani, S. K. Bhattacharya, H. Watanabe, J. Terajima, E. Arakawa, O. A. Ratchranchai, S. Huttayananont, E. M. Ribot, P. Gerner-Smidt, B. Swaminathan and V. P. P. P (2008). "Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: An international multicenter collaborative study." *J Clin Microbiol* **46**(8): 2766-2773.
- Kamp, H. D. and D. E. Higgins (2011). "A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*." *PLoS Pathog* **7**(8): e1002153.
- Kanuganti, S. R., I. V. Wesley, P. G. Reddy, J. McKean and H. S. Hurd (2002). "Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork." *J Food Prot* **65**(9): 1470-1474.
- Kerouanton, 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.
- Kerouanton, A., V. Rose, S. Quesne, C. Courtillon and S. Rouxel (2011). Prevalence and characterization of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in french raw pork meat at the distribution level. Safepork 2011.
- 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 to 2010." *J Clin Microbiol* **50**(5): 1748-1751.
- Ko, R., L. T. Smith and G. M. Smith (1994). "Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*." *J Bacteriol* **176**(2): 426-431.
- Leclercq, A., D. Clermont, C. Bizet, P. A. D. Grimont, A. Le Flèche-Matéos, S. M. Roche, C. Buchrieser, V. Cadet-Daniel, A. Le Monnier, M. Lecuit and F. Allerberger (2010). "*Listeria rocourtiae* sp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(9): 2210-2214.
- 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.
- Letellier, A., G. Beauchamp, E. Guevremont, S. D'Allaire, D. Hurnik and S. Quessy (2009). "Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada." *J Food Prot* **72**(11): 2326-2331.
- Linnan, M. J., L. Mascola, X. D. Lou, V. Goulet, S. May, C. Salminen, D. W. Hird, M. L. Yonekura, P. Hayes, R. Weaver and et al. (1988). "Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese." *N Engl J Med* **319**(13): 823-828.
- Lisa, G. (2008). Phenotypic Identification. *Handbook of Listeria Monocytogenes*, CRC Press. **null**: 139-168.
- Little, C. L., S. M. Pires, I. A. Gillespie, K. Grant and G. L. Nichols (2010). "Attribution of human *Listeria monocytogenes* infections in England and Wales to ready-to-eat food sources placed on the market: adaptation of the Hald *Salmonella* source attribution model." *Foodborne Pathog Dis* **7**(7): 749-756.

- Loessner, M. J. and M. Busse (1990). "Bacteriophage typing of *Listeria* species." Appl Environ Microbiol **56**(6): 1912-1918.
- 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 Science **78**(1-2): 130-134.
- Lopez-Canovas, L., A. M. Riveron, Y. Garrido, F. Corrales, A. Aguila and Y. Cardenas (2009). "Adapting to contour-clamped homogeneous electric field minichamber technology the PulseNet protocols to resolve XbaI-DNA fragments of *Salmonella* serotype Braenderup." Anal Biochem **388**(2): 339-341.
- Lunden, J., T. Autio, A. Markkula, S. Hellstrom and H. Korkeala (2003). "Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants." Int J Food Microbiol **82**(3): 265-272.
- 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.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman and B. G. Spratt (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3140-3145.
- MAPAQ (2012). Bilan annuel 2010-2011 - Toxi-infections alimentaires Canada.
- McLauchlin, J., S. M. Hall, S. K. Velani and R. J. Gilbert (1991). "Human listeriosis and pate: a possible association." BMJ **303**(6805): 773-775.
- McLauchlin, J., R. T. Mitchell, W. J. Smerdon and K. Jewell (2004). "*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods." Int J Food Microbiol **92**(1): 15-33.
- Meinersmann, R. J., R. W. Phillips, M. Wiedmann and M. E. Berrang (2004). "Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages." Appl Environ Microbiol **70**(4): 2193-2203.
- Michael, K., S. Mariela and V. z.-B. Jos^v (2008). Pathogenesis. Handbook of *Listeria Monocytogenes*, CRC Press. **null**: 97-136.
- Miettinen, M. K., K. J. Bjorkroth and H. J. Korkeala (1999). "Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis." Int J Food Microbiol **46**(3): 187-192.
- Milohanic, E., R. Jonquieres, 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.
- Miya, S., H. Takahashi, C. Kamimura, M. Nakagawa, T. Kuda and B. Kimura (2012). "Highly discriminatory typing method for *Listeria monocytogenes* using polymorphic tandem repeat regions." J Microbiol Methods **90**(3): 285-291.
- 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.)." The Journal of Pathology and Bacteriology **29**(4): 407-439.

- Nadon, C. A., D. L. Woodward, C. Young, F. G. Rodgers and M. Wiedmann (2001). "Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **39**(7): 2704-2707.
- 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.
- Nesbakken, T., E. Nerbrink, O. J. Rotterud 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.
- Nightingale, K. K., R. A. Ivy, A. J. Ho, E. D. Fortes, B. L. Njaa, R. M. 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. K., Y. H. Schukken, C. R. Nightingale, E. D. Fortes, A. J. Ho, Z. Her, Y. T. Grohn, P. L. 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.
- 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.
- Norwood, D. E. and A. Gilmour (1999). "Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons." J Appl Microbiol **86**(4): 576-582.
- Norwood, D. E. and A. Gilmour (2001). "The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature." Lett Appl Microbiol **33**(4): 320-324.
- Ochiai, Y., F. Yamada, O. Batmunkh, M. Mochizuki, T. Takano, R. Hondo and F. Ueda (2010). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area." J Food Prot **73**(9): 1688-1693.
- Okwumabua, O., M. O'Connor, E. Shull, K. Strelow, M. Hamacher, T. Kurzynski and D. Warshauer (2005). "Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases." FEMS Microbiol Lett **249**(2): 275-281.
- Olsen, S. J., M. Patrick, S. B. Hunter, V. Reddy, L. Kornstein, W. R. MacKenzie, K. Lane, S. Bidol, G. A. Stoltman, D. M. Frye, I. Lee, S. Hurd, T. F. Jones, T. N. LaPorte, W. Dewitt, L. Graves, M. Wiedmann, D. J. Schoonmaker-Bopp, A. J. Huang, C. Vincent, A. Bugenhagen, J. Corby, E. R. Carloni, M. E. Holcomb, R. F. Woron, S. M. Zansky, G. Dowdle, F. Smith, S. Ahrabi-Fard, A. R. Ong, N. Tucker, N. A. Hynes and P. Mead (2005). "Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat." Clin Infect Dis **40**(7): 962-967.
- Orsi, R. H., H. C. d. 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., Q. Sun and M. Wiedmann (2008). "Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes*." BMC Evol Biol **8**: 233.
- 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.
- Palumbo, J. D., M. K. Borucki, R. E. Mandrell and L. Gorski (2003). "Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting." J Clin Microbiol **41**(2): 564-571.
- Pan, Y., F. Breidt, Jr. and S. Kathariou (2006a). "Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment." Appl Environ Microbiol **72**(12): 7711-7717.
- Pan, Y., F. Breidt and S. Kathariou (2006b). "Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment." Appl Environ Microbiol **72**(12): 7711-7717.
- Pandiripally, V. K., D. G. Westbrook, G. R. Sunki and A. K. Bhunia (1999). "Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2." J Med Microbiol **48**(2): 117-124.
- Parihar, V. S., G. Lopez-Valladares, M. L. Danielsson-Tham, I. Peiris, S. Helmersson, M. Unemo, B. Andersson, M. Arneborn, E. Bannerman, S. Barbuddhe, J. Bille, L. Hajdu, C. Jacquet, C. Johansson, M. Lofdahl, G. Mollerberg, H. Ringberg, J. Rocourt, I. Tjernberg, J. Ursing, B. Henriques-Normark and W. Tham (2008). "Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007." Foodborne Pathog Dis **5**(6): 755-761.
- Parisi, A., L. Latorre, G. Normanno, A. Miccolupo, R. Fraccalvieri, V. Lorusso and G. Santagada (2010). "Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment." Food Microbiol **27**(1): 101-108.
- Pichel, M., S. P. Brengi, K. L. Cooper, E. M. Ribot, S. Al-Busaidy, P. Araya, J. Fernandez, T. I. Vaz, K. M. Kam, M. Morcos, E. M. Nielsen, C. Nadon, G. Pimentel, E. Perez-Gutierrez, P. Gerner-Smidt and N. Binsztein (2012). "Standardization and international multicenter validation of a PulseNet pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Shigella flexneri* isolates." Foodborne Pathog Dis **9**(5): 418-424.
- Pichler, J., P. Much, S. Kasper, R. Fretz, B. Auer, J. Kathan, M. Mann, S. Huhulescu, W. Ruppitsch, A. Pietzka, K. Silberbauer, C. Neumann, E. Gschiel, A. de Martin, A. Schuetz, J. Gindl, E. Neugschwandtner and F. Allerberger (2009). "An outbreak of febrile gastroenteritis associated with jellied pork contaminated with *Listeria monocytogenes*." Wien Klin Wochenschr **121**(3-4): 149-156.
- Pietzka, A. T., A. Stöger, S. Huhulescu, F. Allerberger and W. Ruppitsch (2011). "Gene Scanning of an Internalin B Gene Fragment Using High-Resolution Melting Curve Analysis as a Tool for Rapid Typing of *Listeria monocytogenes*." The Journal of Molecular Diagnostics **13**(1): 57-63.
- 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.
- Pirie, J. H. H. (1927). "A new disease of veld rodents 'Tiger River Disease'." Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. **3**: 163-186.
- Pirie, J. H. H. (1940). "Listeria: Change of name for a genus of bacteria." Nature **145**(3668): 264.
- Pizarro-Cerdá, J., M. Bonazzi and P. Cossart (2010). "Clathrin-mediated endocytosis: What works for small, also works for big." BioEssays **32**(6): 496-504.
- Prencipe, V. A., V. Rizzi, V. Acciari, L. Iannetti, A. Giovannini, A. Serraino, D. Calderone, A. Rossi, D. Morelli, L. Marino, G. Migliorati and V. Caporale (2012). "*Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain." Food Control **25**(1): 150-158.
- Rafelski, S. M. and J. A. Theriot (2005). "Bacterial shape and ActA distribution affect initiation of *Listeria monocytogenes* actin-based motility." Biophys J **89**(3): 2146-2158.
- 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** (Pt 9): 2053-2061.
- Reissbrodt, R. (2004). "New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.--an overview." Int J Food Microbiol **95**(1): 1-9.
- Roberts, A., K. Nightingale, G. Jeffers, E. Fortes, J. M. Kongo and M. Wiedmann (2006). "Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III." Microbiology **152**(Pt 3): 685-693.
- Roche, S., P. Velge and D. Liu (2008). Virulence Determination. Handbook of *Listeria Monocytogenes*, CRC Press: 241-270.
- Roche, S. M., P. Velge, E. Bottreau, C. Durier, N. Marquet-van der Mee and P. Pardon (2001). "Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice." Int J Food Microbiol **68**(1-2): 33-44.
- Rocourt, J., A. Audurier, A. L. Courtieu, J. Durst, S. Ortel, A. Schrettenbrunner and A. G. Taylor (1985). "A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **259**(4): 489-497.
- Romanova, N., S. Favrin and M. W. Griffiths (2002). "Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Sanitizers Used in the Meat Processing Industry." Appl Environ Microbiol **68**(12): 6405-6409.
- Romanova, N. A., P. F. Wolffs, L. Y. Brovko and M. W. Griffiths (2006). "Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride." Appl Environ Microbiol **72**(5): 3498-3503.
- Ryser, E. T. and E. H. Marth (2007). Listeria, listeriosis, and food safety. Boca Raton, CRC Press.
- Salcedo, C., L. Arreaza, B. Alcalá, L. de la Fuente and J. A. Vázquez (2003). "Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones." J Clin Microbiol **41**(2): 757-762.

- Salvat, G., M. T. Toquin, Y. Michel and P. Colin (1995). "Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France." Int J Food Microbiol **25**(1): 75-81.
- Sauders, B. D., D. Pettit, B. Currie, P. Suits, A. Evans, K. Stellrecht, D. M. Dryja, D. Slate and M. Wiedmann (2005). "Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in human stool." J Food Prot **68**(1): 178-181.
- Schlech, 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, E. S. Nicholls and C. V. Broome (1983). "Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food." New England Journal of Medicine **308**(4): 203-206.
- 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.
- Schmid-Hempel, P. and S. A. Frank (2007). "Pathogenesis, Virulence, and Infective Dose." PLoS Pathog **3**(10): e147.
- Schnupf, P. and D. A. Portnoy (2007). "Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin." Microbes Infect **9**(10): 1176-1187.
- Schuerch, D. W., E. M. Wilson-Kubalek and R. K. Tweten (2005). "Molecular basis of listeriolysin O pH dependence." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12537-12542.
- Seeliger, H. P. and K. Hohne (1979). "Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species." Methods in microbiology **13**: 31-49.
- Sheridan, J. J. (1998). "Sources of contamination during slaughter and measures for control." Journal of Food Safety **18**(4): 321-339.
- Smith, G. A., H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy and H. Goldfine (1995). "The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread." Infect Immun **63**(11): 4231-4237.
- Sobrinho, B., M. Brion and A. Carracedo (2005). "SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies." Forensic Sci Int **154**(2-3): 181-194.
- Sofos, J. N. and I. Geornaras (2010). "Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products." Meat Science **86**(1): 2-14.
- Stepanović, S., I. Ćirković, L. Ranin and M. Švabić-Vlahović (2004). "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface." Lett Appl Microbiol **38**(5): 428-432.
- Suarez, M., B. Gonzalez-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero and J. A. Vazquez-Boland (2001). "A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*." Cell Microbiol **3**(12): 853-864.
- Sukhadeo, B., H. Torsten and C. Trinad (2008). Comparative Genomics and Evolution of Virulence. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press. **null**: 311-335.
- Swaminathan, B. and P. Gerner-Smidt (2007). "The epidemiology of human listeriosis." Microbes Infect **9**(10): 1236-1243.
- 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.

- Thevenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans, S. Leroy, A. Kodjo and C. Vernozzy-Rozand (2006). "Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products." Int J Food Microbiol **112**(2): 153-161.
- Thevenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans and C. Vernozzy-Rozand (2005). "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products." Int J Food Microbiol **102**(1): 85-94.
- Thevenot, D., A. Dernburg and C. Vernozzy-Rozand (2006). "An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products." J Appl Microbiol **101**(1): 7-17.
- Todhanakasem, T. and G. M. Young (2008). "Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms." J Bacteriol **190**(17): 6030-6034.
- Tompkin, R. B. (2002). "Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment." J Food Prot **65**(4): 709-725.
- van den Elzen, A. M. and J. M. Snijders (1993). "Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*." Vet Q **15**(4): 143-145.
- Van Renterghem, B., F. Huysman, R. Rygole and W. Verstraete (1991). "Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem." J Appl Bacteriol **71**(3): 211-217.
- Van Stelten, A., J. M. Simpson, Y. Chen, V. N. Scott, R. C. Whiting, W. H. Ross and K. 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.
- Vasconcelos, R. M., A. E. Almeida, E. Hofer, N. M. Silva and V. A. Marin (2008). "Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(8): 836-838.
- Vela, A. I., J. F. Fernandez-Garayzabal, J. A. Vazquez, M. V. Latre, M. M. Blanco, M. A. Moreno, L. de La Fuente, J. Marco, C. Franco, A. Cepeda, A. A. Rodriguez Moure, G. Suarez and L. Dominguez (2001). "Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates." Appl Environ Microbiol **67**(12): 5840-5843.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijns, T. v. d. Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995). "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Research **23**(21): 4407-4414.
- Wagner, M. and J. McLauchlin (2008). Biology. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press. **null**: 3-25.
- Walker, S. J., P. Archer and J. G. Banks (1990). "Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures." J Appl Bacteriol **68**(2): 157-162.
- 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.
- Weatherill, S. (2011). "Report of the Independent Investigator into the 2008 Listeriosis Outbreak.", from http://www.listeriosis-listeriose.investigation-enquete.gc.ca/index_e.php?s1=rpt&page=tab.

- Weis, J. and H. P. Seeliger (1975). "Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature." Appl Microbiol **30**(1): 29-32.
- Wesley, I. V., S. Larsen, H. S. Hurd, J. D. McKean, R. Griffith, F. Rivera, R. Nannapaneni, M. Cox, M. Johnson, D. Wagner and M. de Martino (2008). "Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in cull sows and pork." J Food Prot **71**(3): 545-549.
- Wiedmann, M. (2002). "Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*." J AOAC Int **85**(2): 524-531.
- 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.
- Yi, C. and K. Stephen (2008). Strain Typing. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press. **null**: 203-240.
- Ying, C., S. Robin and K. Sophia (2008). Genomic Divisions/Lineages, Epidemic Clones, and Population Structure. Handbook of Listeria Monocytogenes, CRC Press. **null**: 337-357.
- Zabeau, M. and P. Vos (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. . E. P. Office.
- Zhang, W., B. M. Jayarao and S. J. Knabel (2004). "Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*." Appl Environ Microbiol **70**(2): 913-920.
- Zhu, L., X. Feng, L. Zhang, R. Zhu and X. Luo (2012). "Prevalence and serotypes of *Listeria monocytogenes* contamination in Chinese beef processing plants." Foodborne Pathog Dis **9**(6): 556-560.

ANNEXE I

Sites échantillonnés dans la zone pré-découpe :

		Nombre d'échantillons	Nombres d'échantillons positifs	
Visite 1	Sol au broissage	3	1	
	Dépôts dans la brosseuse	3	0	
	Sol à l'eviscération	3	0	
	Sol à la fente	3	0	
	Scie de fente	3	2	
	Casiers	3	0	
	Barre guide	3	1	
	Plate-forme d'inspecteur	1	0	
	Table pour organes	1	0	
	Baratte à coeur	1	0	
	Chute à viscères	3	2	
	Entrée de la réfrigération	3	1	
	Porte battante de la réfrigération	3	1	
	Murs de la réfrigération	3	0	
	Plateau à viscère	2	1	
	Visite 2	Sol d'abattage	3	0
		Tapis d'abattage	3	1
Murs de chambre froide		3	0	
Barre guide		1	0	
Scie de fente		1	1	
Brosseuse		1	0	
Sol à la fente		1	0	
Sol à l'eviscération		1	0	
Sol au broissage		1	1	
Visite 3	Saignée	3	2	
	Brosseuse	3	0	
	Eviscération	3	0	
	Fente	3	1	
	Réfrigération	3	0	
	Barre guide	1	0	
	Scie	1	0	
Plateau à viscère	1	0		

ANNEXE II

Sites échantillonnés dans la zone de découpe :

		Nombre d'échantillons	Nombres d'échantillons positifs	
Visite 1	Trappe de la vis sans fin	3	3	
	Écraseur à ribs	3	2	
	Convoyeur (piquants)	3	2	
	Convoyeur à longue 1	3	1	
	Convoyeur à longue 2	3	2	
	Écouenneuse	3	0	
	Courroie (rose)	3	1	
	Écouenneuse à flancs	3	0	
	Convoyeur à longue avec os (début)	3	0	
	Convoyeur à longue avec os (fin)	3	0	
	Ensacheuse	3	0	
	Table de travail (usée)	3	0	
	Courroie de travail (usée)	3	2	
	Convoyeur à mailles ajourées	3	0	
	Convoyeur (gras de longue)	3	3	
	Machine à soc	3	2	
	Collecteur (sous la table à soc)	3	3	
	Scie à backribs	3	2	
	Racloirs sous la table à longue	3	2	
	Convoyeur sous-vide	3	0	
	Ligne à bajoues	3	0	
	Convoyeur à jarrets	3	2	
	Chute à spare ribs	3	0	
	Chariots	3	1	
	Drains	3	3	
	Sols	3	3	
	Dégraisseurs	3	0	
	Visite 2	Écraseur à ribs	4	0
		Convoyeur piquants	4	3
		Convoyeur à longue (1)	4	3
		Courroie (rose)	12	0
Courroie de travail		12	1	
Convoyeur du centre		8	1	
Convoyeur à gras de longue		10	9	
Convoyeur à flancs		10	10	
Visite 3	Scie à backribs	4	2	
	Trappe de la vis sans fin	10	8	
	Machine à socs	10	5	
	Début du convoyeur à picnic	10	5	
	Fin du convoyeur à picnic	10	2	
Sol flancs	10	1		
Entrée de la salle 2	10	2		

