

Evaluation du potentiel du phage Deep-Blue pour le biocontrôle des souches émétiques du groupe *Bacillus cereus* dans la filière agro-alimentaire

Présenté par Mathilde Tournay

Promoteur : Prof. Jacques Mahillon (UCL/ELI/MIAE)

Encadrantes : Louise Hock (UCL/ELI/MIAE)
Audrey Leprince (UCL/ELI/MIAE)

Lecteurs : Prof. Anne Legrève (UCL/ELI/ELIM)
Dr. Cécile Boland (Sciensano)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de Bioingénieur : **sciences agronomiques**

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le Professeur Jacques Mahillon, pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire au sein de son laboratoire ainsi que pour ses conseils prodigués tout au long de l'année.

Je tiens également à remercier Cécile Boland et le Professeur Anne Legrève pour avoir accepté d'être lecteurs et membres du jury de ce mémoire.

Je souhaite remercier très sincèrement Louise et Audrey qui m'ont encadrée tout au long de la réalisation de ce mémoire. Merci à elle pour leur patience, leur disponibilité et pour leurs conseils avisés notamment lors de la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements vont ensuite à tous les membres de l'équipe du laboratoire MIAE pour leur accueil, leur bonne humeur et leurs conseils. Merci également aux autres mémorants du labo (Maelle, Anthony, Sebastien et Marie) pour tous ces bons moments partagés ensemble.

Je terminerai par remercier mes proches et mes amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Merci tout particulièrement à mes parents pour avoir pris le temps de relire et de corriger ce travail. Merci aussi à toutes les personnes que j'ai rencontrées ici à Louvain-la-Neuve et qui ont rendu ces cinq années d'étude mémorables. Enfin, merci à toi Max, merci pour ton soutien, ton amour et surtout ta patience durant toute cette année.

Mathilde Tournay

Abstract

Emetic strains of the *B. cereus* group are frequently involved in food intoxications. Although the symptoms are usually mild, severe cases have been reported and their control throughout the food chain supply is therefore a primary concern. However, the conventional preservation methods present significant drawbacks and are not always effective against these pathogens. In this context, novel strategies are required and there is a growing interest in the use of bacteriophages. These viruses are able to specifically infect bacteria and offer many advantages in the biocontrol of pathogenic bacteria.

This work aimed to investigate Deep-Blue potential against three psychrotolerant *B. cereus* strains at two levels of the food chain supply : in the post treatment of food products, where bacteriophages can be used as bio-preservatives and as biosanitation agent for industrial equipments to remove bacterial biofilms. Finally, the last objective was to isolate other *Myoviridae* which could be integrated within a phage cocktail.

First, food matrices were experimentally contaminated and treated with Deep-Blue. Results show that the phage could reduce *B. cereus* concentration below the initial bacterial level in LB broth and milk. Moreover, the treatment was able to control bacterial growth in rice and on the surface of milk rice. In the second part, Deep-Blue potential as antimicrobial agent against *B. cereus* biofilms formed in LB or milk was assessed using flow cell in which bacteria can adhere. Two treatments were applied : a preventive one and a curative one. Deep-Blue was effective in preventing biofilm development in both LB and milk and reductions of up to 4 log CFU/m² were achieved compared to the untreated biofilm. The curative treatment reduced the bacterial density by 2 log CFU/mm² in LB, but no significant effect could be observed in milk. The last objective aimed to isolate *Myoviridae* by combining the technique of enriching samples with target bacteria followed by PCR using primers specific to phages similar to Deep-Blue. However, no *Myoviridae* could be isolated. Nevertheless, optimizing the design of the primers should allow to target a larger number of phages.

This work demonstrated Deep-Blue phage potential both as a bio-preservative in food products and as a biosanitation agent against biofilms. Deep-Blue is a valuable candidate for the elaboration of a phage-based biopreservative intended to reduce the prevalence of intoxications associated with the presence of *B. cereus* within the agri-food industry.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
CFU	Colony Forming Unit
FDA	US Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognised As Safe
IAA	Industrie agroalimentaire
ICTV	Comité International de Taxonomie des Virus
kDa	KiloDalton
LB	Lysogeny Broth
McF	McFarland
MOI	Multiplicity Of Infection
NEP	Nettoyage En Place
NRPS	Non Ribosomal Peptide Synthetase
O/N	Over Night
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque Forming Unit
rpm	Rotations Par Minute
<i>s.l.</i>	<i>sensu lato</i>
<i>s.s.</i>	<i>sensu stricto</i>

Table des matières

I	Introduction	1
1	<i>B. cereus sensu lato</i> : écologie et importance	2
1.1	Les membres du groupe <i>B. cereus</i>	2
1.2	Les intoxications alimentaires liées à <i>B. cereus s.l.</i>	4
1.2.1	Le syndrome diarrhéique	4
1.2.2	Le syndrome émétique	5
1.2.3	Le céréulide	5
1.3	Problématique liée à <i>B. cereus</i> dans l'IAA	7
2	Les biofilms	9
2.1	Etapas de la formation d'un biofilm	9
2.2	Avantages écologiques des biofilms	11
2.3	Les biofilms dans l'IAA	12
3	Stratégies de contrôle dans l'IAA	13
3.1	Nettoyage et désinfection des installations	13
3.2	Contrôle dans les aliments	13
3.3	Biocontrôle	14
4	Bactériophages	15
4.1	Morphologie et classification	15
4.2	Cycle de vie des phages	16
4.2.1	Cycle lytique	17
4.2.2	Cycle lysogénique	17
4.3	Les phages comme agent de biocontrôle dans l'IAA	18
4.3.1	Biocontrôle au niveau des matières premières	18
4.3.2	Biosanitation	20
4.3.3	Biopréservation	20
4.3.4	Endolysines	22
4.4	Considérations pour l'élaboration d'un produit phagique à des fins de biocontrôle	23
4.5	Les phages comme outil de détection	25
	Objectifs	26
II	Matériels et méthodes	27
1	Milieux de culture	27
1.1	Lysogenic Broth (LB)	27
1.2	Liquide de Ringer	27

1.3	Phosphate Buffered Saline (PBS)	28
2	Cultures de bactéries	28
2.1	Obtention de mutants résistants à un antibiotique	29
2.2	Dénombrement des bactéries	30
3	Préparation phagique	30
3.1	Deep-Blue	30
3.2	Multiplication de phages	30
3.3	Détermination de la concentration en phage	31
4	Biocontrôle	31
4.1	Préparation des suspensions bactériennes et phagiques	31
4.2	Matrices et conditions testées	32
4.2.1	LB	32
4.2.2	Lait	32
4.2.3	Riz	32
4.2.4	Riz au lait : surface	33
5	Biofilms	33
5.1	Dispositif expérimental	33
5.2	Cellule contrôle : Pas de traitement	34
5.3	Cellule test 1 : Traitement préventif	34
5.4	Cellule test 2 : Traitement curatif	35
5.5	Détermination de la concentration en bactéries	35
6	Isolation d'un nouveau <i>Myoviridae</i>	35
6.1	Conception des amorces	35
6.2	Échantillonnage et isolement	36
7	Analyses statistiques	37
III Résultats et discussion		38
1	Biocontrôle	38
1.1	LB	39
1.2	Lait	41
1.3	Riz	41
1.4	Riz au lait : contamination et traitement en surface	42
1.5	Synthèse des expériences de biocontrôle	43
1.5.1	Efficacité d'un phage dans une matrice liquide	44
1.5.2	Difficultés liées aux matrices solides	44
1.5.3	Efficacité de Deep-Blue sur les différentes souches testées	45
1.5.4	Influence de la température	46
2	Biofilms	48
2.1	Traitement préventif	48
2.2	Traitement curatif	50
2.3	Synthèse des expériences sur les biofilms	51
2.3.1	Traitement curatif vs préventif	51
2.3.2	LB vs Lait	52
2.3.3	Mono-souche vs Multi-souches	53
3	Isolement d'un <i>Myoviridae</i>	54

3.1	Nombre de plaques de lyse obtenues par échantillon	54
3.2	Nombre de lyses par souche	55
3.3	Optimisation du design des amorces	57
IV Conclusions et perspectives		59
Bibliographie		63

Chapitre I

Introduction

«Chaque année, 600 millions de personnes, soit près d'une sur dix dans le monde, tombent malades après avoir consommé des aliments contaminés et 420 000 en meurent.» (WHO, 2015)

La sécurité sanitaire des aliments est une préoccupation majeure dans l'industrie agro-alimentaire. Cependant, malgré les réglementations strictes en vigueur tout au long de la chaîne alimentaire, produire des aliments exempts de micro-organismes est un enjeu de taille. En effet, les méthodes traditionnelles de conservation des aliments ne sont pas toujours efficaces pour éliminer les pathogènes et présentent de nombreux inconvénients, y compris l'altération des propriétés organoleptiques et l'élimination de la microflore bénéfique. Par ailleurs, les industriels doivent faire face à la présence de biofilms au sein des lignes de production. Ces structures complexes de micro-organismes résistent aux processus de nettoyage des installations et constituent une source de contamination récalcitrante.

Dans ce contexte, et compte tenu de la demande croissante des consommateurs pour des produits naturels et exempts de conservateurs chimiques, le développement de nouvelles méthodes de contrôle des bactéries pathogènes semble indispensable. Ces dernières années ont vu un intérêt grandissant pour les stratégies de biocontrôle. Parmi celles-ci, les bactériophages, ces virus naturels des bactéries, ont un potentiel énorme. Grâce à leur spécificité et leur capacité à se multiplier à l'intérieur de leur hôte, ils apparaissent comme une alternative efficace pour pallier les inconvénients liés à l'utilisation des barrières microbiologiques traditionnelles. L'application de phage comme moyen de biocontrôle contre les pathogènes bactériens est une stratégie bien établie en ce qui concerne *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ou encore *Salmonella enterica*. Ce travail se focalise sur *Bacillus cereus*, une bactérie pathogène pour laquelle aucun produit phagique n'a été mis au point jusqu'ici.

1 *B. cereus sensu lato* : écologie et importance

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries Gram-positives en forme de bâtonnet et à faible taux en G-C. Elles appartiennent à la famille des *Bacillaceae* dont la caractéristique principale réside dans la capacité à produire des endospores (Slepecky et Hemphill, 2006). La résistance des spores à un certain nombre de conditions défavorables et extrêmes contribue à l'ubiquité de *Bacillus* spp. dans la nature. Ces bactéries se retrouvent en effet aussi bien dans le sol, l'air, l'eau ainsi que dans les denrées alimentaires et le système digestif des insectes et des mammifères où elles peuvent vivre comme saprophytes, opportunistes ou encore comme pathogènes (Griffiths, 2010). Au sein du genre *Bacillus*, *B. cereus sensu lato* forme un groupe homogène d'espèces d'intérêts économique et de santé publique.

1.1 Les membres du groupe *B. cereus*

Le groupe *B. cereus s.l.* comprend sept espèces : *Bacillus cereus sensu stricto* (*s.s.*), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus cytotoxicus*. Historiquement, ces espèces ont été classées sur base de critères phénotypiques et physiologiques. Cependant, les approches moléculaires actuelles ont souligné une grande proximité génétique entre les différents membres de ce groupe plongeant cette classification au cœur de nombreuses controverses (Vilas-Boas *et al.*, 2007). Plusieurs scientifiques considèrent *B. cereus s.s.*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* comme appartenant à une seule et même espèce. En effet, ces espèces se distinguent uniquement sur base de leurs facteurs de virulence, codés par des gènes qui sont portés par des plasmides. En outre, certains de ces plasmides peuvent être transférés facilement au sein du groupe et/ou perdus au fil de l'évolution (Van der Auwera *et al.*, 2007).

B. anthracis

B. anthracis est l'agent étiologique responsable de l'anthrax, communément appelée "maladie du charbon". Ce pathogène a été mis en évidence par Koch et Pasteur à la fin du 19^{ème} siècle et doit sa notoriété à son utilisation en tant qu'arme biologique en 2001 aux États-Unis (Jernigan *et al.*, 2002). Les herbivores tels que les ruminants sont les plus propices à développer la maladie mais tous les mammifères, y compris les humains, sont susceptibles d'être atteints (Mock et Fouet, 2001). Selon la voie de contamination, la maladie peut prendre trois formes : l'infection cutanée, pulmonaire ou gastrointestinale. Une fois les spores dans l'hôte, elles germent pour donner des cellules végétatives qui vont proliférer et exprimer leurs exotoxines (Jensen *et al.*, 2003). Les facteurs de virulence de *B. anthracis* sont encodés par deux plasmides pXO1 et pXO2. Le premier permet la production de trois facteurs toxiques distincts : l'antigène protecteur (PA), le facteur œdématogène (EF) et le facteur létal (LF). Ces protéines peuvent s'associer pour former les deux toxines bipartites : PA-EF et PA-LF. En ce qui concerne pXO2, il code pour une capsule faite d'acides poly D-glutamique qui permet à la bactérie d'échapper à la phagocytose par les macrophages du système immunitaire de son hôte (Jensen *et al.*, 2003).

B. thuringiensis

B. thuringiensis est connue mondialement pour son utilisation en agriculture en tant que biopesticide (environ 400 formulations ont été mises sur le marché). En effet, cette bactérie se distingue par sa capacité à synthétiser, durant la sporulation, des cristaux protéiques parasporaux qui sont responsables de leur caractère entomopathogène notamment à l'encontre des larves de Lépidoptères, Coléoptères et Diptères. Ces cristaux peuvent contenir deux types de toxines dont les gènes sont portés par un large plasmide : les toxines Crystal (Cry) et les toxines cytolytiques (Cyt). Une fois ingérées, les protéines Cry sont activées par les protéases du tube digestif de l'insecte et se lient à des récepteurs spécifiques situés au niveau des cellules épithéliales, entraînant une perturbation de l'intégrité membranaire et la mort de l'insecte (Bravo *et al.*, 2007). Les protéines Cyt ne se lient pas à des récepteurs mais interagissent directement avec la membrane lipidique. Le potentiel insecticide des protéines Cry est tel que leurs gènes respectifs ont été introduits dans des plantes transgéniques afin de leur conférer une haute protection contre les ravageurs les plus nuisibles et diminuer l'utilisation mondiale de pesticides chimiques (Pardo-Lopez *et al.*, 2012).

B. cereus s.s.

B. cereus est un organisme mésophile largement répandu dans l'environnement. Le sol est considéré comme le réservoir primaire de cette bactérie mais les intestins des invertébrés et des mammifères pourraient aussi constituer des niches naturelles (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). *B. cereus* peut également être isolé à partir de diverses matrices alimentaires d'origine végétale et animale, et plus particulièrement des produits laitiers. Deux types d'intoxications sont liées à l'ingestion d'aliments contaminés par *B. cereus s.s.* : le syndrome émétique et le syndrome diarrhéique qui feront l'objet du prochain chapitre. En plus d'être un contaminant alimentaire, certaines souches de *B. cereus s.s.* sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections locales ou systémiques sévères, comme la septicémie et l'endophtalmie chez les patients immunodéficients (Bottone, 2010).

B. mycoides* et *B. pseudomycoides

B. mycoides et *B. pseudomycoides* ont la particularité d'être des organismes saprophytes, non motiles et dont la morphologie des colonies est à croissance rhizoidale. De plus, les deux espèces se distinguent entre elles de part la composition en acides gras de leurs parois (Nakamura, 1998).

B. cytotoxicus

B. cytotoxicus se distingue des autres espèces du groupe par son incapacité à croître à des températures inférieures à 20°C et sa capacité à se multiplier jusqu'à une température de 53 °C, synonyme de thermotolérance (Guinebreière *et al.*, 2013). Par ailleurs, cette espèce est capable de produire une entérotoxine, la cytotoxine K1, à l'origine probable d'intoxications alimentaires de type diarrhéique (Auger *et al.*, 2008).

B. weihenstephanensis

B. weihenstephanensis regroupe les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* s.l.. Cette espèce est caractérisée par sa capacité à croître à des températures comprises entre 4 et 7°C mais pas à 43°C. De plus, elle possède des séquences signatures spécifiques au niveau du gène ARNr 16S et du gène *cspA* qui code pour la protéine majeure de réponse à un stress au froid (Lechner *et al.*, 1998). Thorsen *et al.* (2006) ont également montré que certaines souches de *B. weihenstephanensis* possédaient les gènes relatifs à la production du céréulide similaire aux souches émétiques de *B. cereus* s.s. et pouvant être actifs à 7°C.

1.2 Les intoxications alimentaires liées à *B. cereus* s.l.

Comme indiqué précédemment, les membres du groupe *B. cereus* s.l. sont impliqués dans deux pathologies d'origine alimentaire distinctes : un syndrome émétique et un syndrome diarrhéique. *B. cereus* s.s. est l'espèce la plus souvent incriminée dans ces maladies gastrointestinales mais des souches de *B. weihenstephanensis* et de *B. cytotoxicus* ont également été associées à plusieurs reprises aux syndromes émétiques et diarrhéiques (Hoton *et al.*, 2009; Guinebretière *et al.*, 2013). De 2007 à 2014, les États membres de l'Union Européenne ont signalé 413 cas avérés d'épidémies d'origine alimentaire associées à *B. cereus*, qui ont touché 6 657 personnes et donné lieu à 352 hospitalisations, aucun décès n'ayant été rapporté (EFSA, 2016). En 2015, la bactérie était impliquée dans 6.8% des épidémies alimentaires en Europe. Cependant, le nombre d'intoxications liées à *B. cereus* serait largement sous-estimé. Cette affirmation s'explique par le fait que les symptômes sont souvent bénins et durent généralement moins de 24 h. Elles font donc rarement l'objet d'un avis médical et ne sont généralement pas signalées. Par ailleurs, ces symptômes peuvent être confondus avec ceux causés par d'autres pathogènes tels que *Clostridium perfringens* ou *Staphylococcus aureus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b).

1.2.1 Le syndrome diarrhéique

Les premiers cas d'intoxications alimentaires de type diarrhéiques pour lesquels *B. cereus* a été incriminé sont survenus en Norvège entre 1947 et 1949 (Hauge, 1955). Ce syndrome est une toxi-infection. Les cellules végétatives ou spores, une fois ingérées, vont produire des toxines thermolabiles dans l'intestin grêle de leur hôte. Actuellement, trois entérotoxines sont supposées être à l'origine des symptômes diarrhéiques : l'hémolysine BL (Hbl), l'entérotoxine non hémolytique (Nhe) et la cytotoxine K (CytK). Les deux premières sont des protéines, composées de trois sous-unités sécrétées indépendamment mais toutes trois nécessaires à l'activité biologique maximale de la toxine. CytK est une protéine de 34 kDa possédant une activité similaire à la beta-toxine de *Clostridium perfringens* (Granum *et al.*, 2005). Par leur action, ces entérotoxines perturberaient l'intégrité de la membrane plasmique des cellules épithéliales causant ainsi des diarrhées aqueuses importantes chez les personnes malades (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les symptômes se manifestent également par des douleurs abdominales et des nausées et se résorbent généralement endéans les 24 h. Le temps nécessaire d'incubation varie entre 8 h et 16 h suite à

l'ingestion de nourriture contenant un nombre élevé de *B. cereus*, soit entre 10^5 et 10^7 CFU/g. Les aliments protéinés comme les viandes, les légumes, les sauces et les produits laitiers sont le plus souvent associés à ce type de syndrome (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

1.2.2 Le syndrome émétique

Le deuxième type d'intoxication lié à *B. cereus* est le syndrome émétique dont l'agent responsable est une toxine, le céréulide. Le syndrome est caractérisé par des nausées et des vomissements qui surviennent 0.5 à 6 h après l'ingestion de l'aliment contaminé (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b). La rapidité de l'apparition des symptômes (similaires à ceux provoqués par *Staphylococcus aureus*) vient du fait que, contrairement au syndrome diarrhéique, la toxine est préformée dans l'aliment avant d'être ingérée. Les plats incriminés sont principalement à base d'aliments amidonnés tels que le riz cuit ou frit, les pâtes, les nouilles ainsi que les aliments prêts-à-manger. Habituellement, les symptômes sont bénins et disparaissent avant 24 h. Cependant, plusieurs manifestations cliniques plus sévères voir fatales ont été recensées. En effet, le syndrome émétique a plusieurs fois été associé à des cas d'insuffisance hépatique, d'encéphalopathie et de mort soudaine (Mahler *et al.*, 1997; Pósfay-Barbe *et al.*, 2008). En Belgique, deux cas mortels d'intoxications émétiques ont été signalés. En 2003, une fille de sept ans est 13 h après avoir consommé une salade de pâtes contaminée avec environ 10^8 CFU/g de *B. cereus* (Dierick *et al.*, 2005). Cinq ans plus tard, un jeune homme d'une vingtaine d'années en bonne santé mourait suite à l'ingestion d'un plat de spaghetti à la sauce tomate, conservé durant cinq jours à des températures inappropriées. Les analyses ont révélé la présence d'une dose très importante de céréulide ($14.8 \mu\text{g/g}$) (Naranjo *et al.*, 2011). La dose minimale requise pour provoquer le syndrome se situe entre 10^5 - 10^7 CFU/g ou $10 \mu\text{g}$ de céréulide/kg de masse corporelle. Cependant, des cas d'intoxication impliquant des concentrations de 10^3 CFU/g ont aussi été rapportés (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b).

1.2.3 Le céréulide

Généralités

Le céréulide est un dodécapepsipectide de 1.2 kDa. Il consiste en une structure cyclique de trois répétitions de deux acides aminés et de deux hydroxy acides [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃. Sa structure est fortement similaire à celle de la valinomycine, une substance antibiotique produit par *Streptomyces griseus* connue pour entraîner la perméabilisation des membranes à l'ion potassium (Fig. I.1) (Kroten *et al.*, 2010). Des recherches menées récemment par Marxen *et al.* (2015) sur la diversité chimique du céréulide ont identifié au moins 18 variants de la toxine avec des toxicités et des propriétés ionophores variables. Le céréulide est stable à hautes températures (121°C pendant 15 min et 90 min à 126°C) ainsi qu'à une large gamme de pH (2-11) (Shinagawa *et al.*, 1995; Rajkovic *et al.*, 2008b). De plus, cette toxine est insensible aux enzymes digestives humaines. En conséquence, elle subsistera dans les aliments après un traitement thermique et atteindra l'intestin sans être inactivée par l'acidité gastrique ou les protéases du tractus digestif.

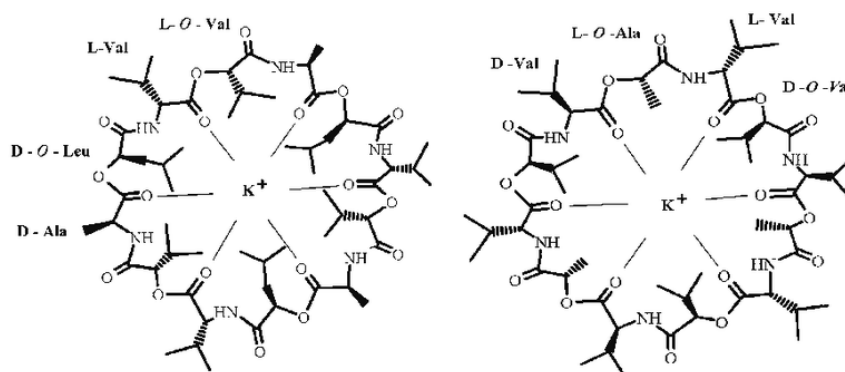


Figure I.1 – Structure du céréulide (gauche) et de la valinomycine (droite) en interaction avec l'ion potassium (Teplova *et al.*, 2006)

Mode d'action

Les mécanismes par lesquels la toxine cause le syndrome émétique chez l'homme n'ont pas encore été entièrement élucidés. Toutefois, des études sur les rongeurs ont montré que la liaison du céréulide avec un récepteur à sérotonine 5-HT₃ au niveau du duodénum stimulerait le nerf vague afférant et engendrerait de ce fait les vomissements (Agata *et al.*, 1995). En outre, comme mentionné précédemment, le céréulide a la particularité d'être un ionophore à potassium. Grâce à ses propriétés lipophiles, il s'insère dans la membrane interne des mitochondries et permet l'efflux des ions potassium vers le cytosol selon leur gradient de concentration. La perte d'ion K⁺ va engendrer un dérèglement du potentiel électrochimique transmembranaire et perturber l'homéostasie ionique des cellules avec, pour conséquence, le gonflement des mitochondries et l'arrêt de la phosphorylation oxydative nécessaire à la production d'ATP (Mikkola *et al.*, 1999; Kroten *et al.*, 2010). Par ailleurs, la modification de la perméabilité des membranes va endommager et inhiber l'activité des Natural Killers, cellules impliquées dans la réponse immunitaire (Paananen *et al.*, 2002).

Synthèse et régulation

Le céréulide est un peptide synthétisé par une voie indépendante de l'intervention des ribosomes. En effet, il est le produit d'enzymes, les synthétases, appelées NRPS (de l'anglais *non ribosomal peptides synthetase*) (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Les NRPS sont des complexes multienzymatiques organisés en modules responsables de la synthèse de nombreux peptides possédant une activité biologique chez les bactéries et les champignons tels que les surfactants, les antibiotiques et les antifongiques. (Marxen *et al.*, 2015). La machinerie enzymatique responsable de la synthèse de la toxine émétique (la céréulide synthétase) est codée par les gènes *ces* rassemblés en un "cluster" de 24 kb. Hoton *et al.* (2005) ont prouvé que la base génétique du céréulide était extrachromosomale. En effet, le locus *ces* est encodé sur un grand plasmide de 270 kb, appelé pCERE01 ou pCER270, présentant des analogies avec le plasmide pX01 de *B. anthracis*. Cependant, les déterminants génétiques du céréulide

des souches émétiques de *B. weihenstephanensis* seraient localisés soit sur un très grand plasmide sans similitude avec pX01, soit sur leur chromosome (Hoton *et al.*, 2009). La variation de l'emplacement de l'opéron *ces* suggère une mobilité génétique et/ou la présence de transferts génomiques.

La production du céréulide est initiée à la fin de la phase exponentielle de croissance et survient dès lors pendant la phase stationnaire (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Pour cette raison, un nombre élevé de cellules végétatives dans les aliments est requis pour induire l'intoxication émétique (Thorsen *et al.*, 2009). Un aliment gardé à température ambiante va permettre aux spores de *B. cereus* qu'il contient de germer et aux cellules végétatives de proliférer afin d'atteindre rapidement ce seuil.

La quantité de céréulide produite dépend de la souche, de la composition de l'aliment ainsi que de facteurs externes comme la température, le pH, la disponibilité en oxygène ou la présence d'acide aminés spécifiques (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b). Traditionnellement, la synthèse de la toxine se produit entre 12 et 37°C avec un maximum variant de 12-22°C. Le risque est dès lors présent lorsque l'aliment est conservé dans de mauvaises conditions. Cependant, certaines souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* sont capables de croître et de produire le céréulide à 7°C (Thorsen *et al.*, 2006). Cette découverte impose une grande vigilance étant donné qu'elle suppose que la toxine pourrait être produite dans des denrées stockées au réfrigérateur.

1.3 Problématique liée à *B. cereus* dans l'IAA

B. cereus occupe une place de premier rang parmi les micro-organismes indésirables en industrie agroalimentaire (IAA) dû à sa capacité à croître rapidement, à sporuler et à former des biofilms (Bartoszewicz *et al.*, 2008). En effet, les spores de *B. cereus* sont largement répandues dans la nature et contaminent les aliments via les matières premières végétales ou animales. Les spores sont très résistantes aux conditions défavorables telles que la chaleur, la déshydratation, le dessèchement, ainsi qu'aux désinfectants et agents de nettoyage. Elles peuvent donc survivre aux opérations de pasteurisation ou de déshydratation dans l'IAA, là où la flore compétitrice sera éliminée. Les traitements thermiques stimulent la germination des spores qui pourront se multiplier dans des conditions favorables. Les bactéries pourront alors atteindre des concentrations susceptibles de détériorer les denrées alimentaires et causer des intoxications alimentaires ayant pour conséquence une réduction de la sécurité alimentaire et de la durée de conservation (Heyndrickx, 2011).

En outre, les spores de *B. cereus* adhèrent facilement aux surfaces sur lesquelles elles peuvent former des biofilms. Cette adhérence est due à trois caractéristiques : l'hydrophobicité de l'exosporium (Fig.I.2), la charge négative de sa surface ainsi que la présence d'appendices (Tauveron *et al.*, 2006). Les biofilms de *B. cereus* posent de sérieux problèmes dans les IAA et principalement dans l'industrie laitière. En effet, *B. cereus* est capable de former des biofilms consistants sur les surfaces en contact avec les aliments y compris les surfaces en acier inoxydable. Sharma et Anand

(2002) ont montré que les biofilms se formant dans les industries laitières et les lignes de pasteurisation sont composés en moyenne de 12% de souches de *B. cereus*. En plus des toxines, elles peuvent produire des enzymes extracellulaires responsables de l'altération du lait et des produits laitiers (Kumari et Sarkar, 2016).

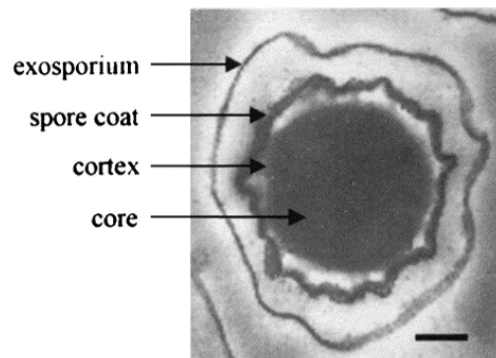


Figure I.2 – Micrographie électronique à transmission d'une section d'une spore de *B. cereus* ATCC 10876 (barre = 0,2 μm)(Todd *et al.*, 2003)

2 Les biofilms

Naturellement, les micro-organismes ont tendance à vivre attachés à une surface. En effet, près de 99% des bactéries seraient à l'état sessile dans leur habitat naturel (Branger, 2007). Un biofilm est une communauté complexe de micro-organismes incluse dans une matrice extracellulaire et qui adhère à une surface inerte ou vivante (Costerton *et al.*, 1999). Cette matrice est composée principalement de différentes substances polymériques telles que des polysaccharides, des protéines, des acides téichoïques et des acides nucléiques (Flemming et Wingender, 2010). Les polymères, sécrétés par les micro-organismes eux-mêmes, constituent environ 90% de la masse sèche d'un biofilm.

Les biofilms sont ubiquitaires dans l'environnement et peuvent dès lors présenter plusieurs effets néfastes notamment dans les domaines médicaux, industriels et alimentaires. En effet, les biofilms se retrouvent sur toutes sortes de surfaces humides comme les aliments et leurs lignes de production, les canalisations d'eau, les systèmes de ventilation et de tuyauteries, les organes et les catheters (Zhao *et al.*, 2017). Ils seraient responsables de plus de la moitié des maladies infectieuses microbiennes humaines (Costerton *et al.*, 1999) et 80% des contaminations récalcitrantes dans l'IAA sont causées par les biofilms.

2.1 Etapes de la formation d'un biofilm

La formation des biofilms est un processus complexe qui est généralement divisé en cinq étapes principales : l'adhésion réversible puis irréversible, l'accumulation, la maturation et la dispersion (III.2).

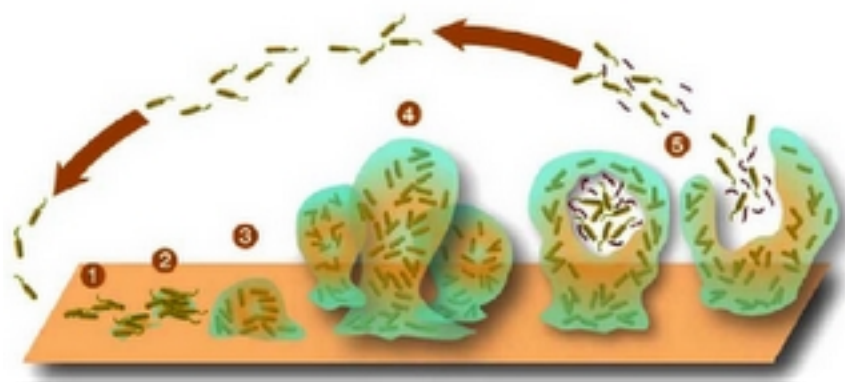


Figure I.3 – Modèle de la formation d'un biofilm en 5 étapes : (1) adhésion réversible, (2) adhésion irréversible, (3) accumulation, (4) maturation et (5) dispersion

Adhésion réversible

Dans un premier temps, les cellules doivent adhérer à une surface (biotique ou abiotique). L'adhésion initiale, souvent réversible, est due à des liaisons chimiques

non-covalentes ou faibles (*e.g.* interactions électrostatiques, acidobasiques ou de Van der Waals). Les cellules peuvent dès lors se détacher et retourner à l'état planctonique. L'adhésion dépend de la nature du support et de son conditionnement préalable (*e.g.* présence de résidus organiques à la surface des canalisations en industries). De plus, le contact avec la surface est favorisé par la présence d'appendices filamenteux ou organelles comme les pili et les flagelles (Klausen *et al.*, 2003).

Adhésion irréversible

Il s'en suit une adhésion irréversible des bactéries. Cette transition vers l'adhésion irréversible est caractérisée par une modification du profil d'expression des gènes qui favorisent l'attachement et par conséquent le développement du biofilm (*e.g.* expression et sécrétion des composants de la matrice) (Bridier *et al.*, 2015).

Accumulation

Une fois ancrées à la surface, les cellules bactériennes se divisent de manière active et s'aggrègent pour former des microcolonies. En outre, des cellules planctoniques viennent également se greffer à la surface du biofilm naissant et contribuent ainsi à sa croissance (Boutaleb, 2007). Rapidement, la structure matricielle se densifie et les cellules s'organisent en multicouches. Durant cette étape, l'adhésion intercellulaire ainsi que l'adhésion du biofilm avec la surface sont favorisées par la sécrétion de substances polymériques extracellulaires.

Maturation

L'étape de maturation se traduit par un accroissement de biomasse liée à une production accrue de polymères, et par la formation d'une structure tridimensionnelle complexe. Cette structure est variable d'une espèce à l'autre mais beaucoup ont une architecture semblable à celle d'un champignon (Briandet *et al.*, 2012). Les espaces séparant les microcolonies deviennent des canaux aqueux à l'intérieur desquels les éléments nutritifs, l'oxygène et les déchets peuvent circuler (Roux et Ghigo, 2006).

Dispersion

La dernière étape du cycle de vie comprend la libération des cellules planctoniques dans l'environnement. Ces cellules ont alors la capacité de coloniser de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs, aussi bien extrinsèques qu'intrinsèques. D'une part, les perturbations mécaniques, la disponibilité en nutriments, l'appauvrissement en oxygène ou en monoxyde d'azote ou encore la température sont autant de facteurs susceptibles d'engendrer l'étape de dispersion (Kaplan et Fine, 2002; Hunt *et al.*, 2004; An *et al.*, 2010). D'autre part, les bactéries peuvent elles-mêmes induire la dispersion via la production d'enzymes capables de dégrader la matrice exopolymérique, comme les polysaccharidases (*e.g.* dispersine B), les nucléases, ou encore via la production d'agents tensioactifs (*e.g.* rhamnolipides) (Schooling *et al.*, 2004; Manuel *et al.*, 2007).

2.2 Avantages écologiques des biofilms

Il est indéniable que le mode de vie sous forme de biofilm est le facteur clé de la survie des cellules procaryotiques dans divers environnements. En effet, les biofilms procurent aux micro-organismes qu'ils englobent certaines caractéristiques avantageuses à l'origine d'une résistance intrinsèque accrue. Ils offrent une protection contre les UV, la dessiccation, les changements de pH, la salinité ou la phagocytose (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Par ailleurs, ils confèrent une résistance 10 à 1000 fois plus élevée aux antibiotiques que pour des cellules planctoniques (Olson *et al.*, 2002).

Parmi ces caractéristiques, la plus importante est très certainement la présence de la matrice extracellulaire. Cette structure agit comme barrière physique à l'entrée d'agents antimicrobiens, de détergents et d'antibiotiques (Flemming et Wingender, 2010). De plus, la matrice favorise l'adhésion au sein du biofilm ce qui augmente sa stabilité face aux perturbations environnementales. Par ailleurs, la plupart des biopolymères de la matrice sont hygroscopiques. C'est à dire qu'ils sont capables de retenir les molécules d'eau présentes dans l'air et de maintenir un environnement hautement hydraté autour du biofilm lui apportant de surcroît une résistance certaine à la dessiccation (Flemming et Wingender, 2010). Enfin, la matrice séquestre les nutriments issus du milieu environnant ou de la lyse cellulaire. Ces composés peuvent être utilisés comme sources d'énergie par les bactéries (Flemming et Wingender, 2010). En outre, des canaux aqueux assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation. Le développement tridimensionnel et la présence de ces canaux au sein du biofilm mènent à la création de gradients physicochimiques. En effet, un biofilm n'est pas un milieu homogène mais comprend une variété de micro-environnements à teneurs différentes en nutriments et en oxygène. Cette hétérogénéité physicochimique rend possible la coexistence organisée d'espèces bactériennes aux propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires (Roux et Ghigo, 2006).

La résistance du biofilm est également liée à d'autres facteurs. Tout d'abord, les cellules au sein du biofilm sont pour la plupart métaboliquement moins actives. Elles entrent dans une sorte de dormance et réduisent la fréquence de divisions cellulaires. Cet état physiologique les rend moins réceptives aux agents biocides et aux perturbations environnementales. De plus, parmi ces cellules latentes se trouvent les cellules dites persistantes qui ont la particularité de tolérer des concentrations létales de plusieurs substances antibiotiques (Lewis, 2008).

Enfin, la densité et la proximité des cellules au sein du biofilm facilitent leur communication via des mécanismes de quorum sensing. En effet, les canaux aqueux, en sus de la distribution de nutriments et des déchets, permettent le transfert de signaux biochimiques de cellule à cellule (Branger, 2007). Ces signaux jouent un rôle important dans la formation du biofilm et la régulation génétique liée à ce mode de vie. En outre, les biofilms, en favorisant le contact des bactéries entre elles, favorisent l'échange d'informations génétiques par transfert horizontal dont notamment l'acquisition de gènes de résistances (Ghigo, 2001).

2.3 Les biofilms dans l'IAA

Annuellement, la contamination microbienne coûte à l'IAA plusieurs milliards de dollars dûs à d'importantes pertes de produits ne répondant pas aux attentes des consommateurs. Il est indéniable que cette contamination est en majeure partie liée à la présence de biofilms au sein des lignes de production (Brooks et Flint, 2008). Les surfaces des installations en acier inoxydable sont propices à l'adsorption de molécules organiques. Rapidement, un film de conditionnement se crée favorisant ainsi l'adhésion des bactéries et assurant leur viabilité et leur croissance (Chmielewski et Frank, 2003). La formation subséquente de biofilms peut mener à des problèmes d'hygiène importants, ainsi qu'à des pertes économiques non négligeables (Fig. I.4).

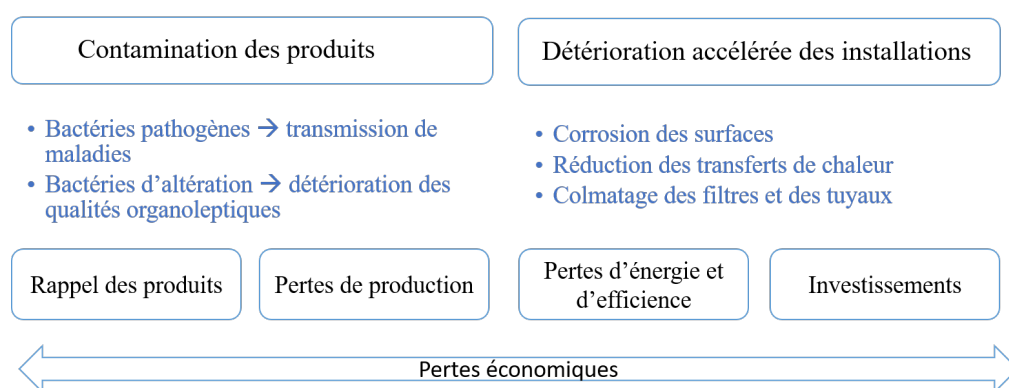


Figure I.4 – Conséquences liées à la présence de biofilms dans l'IAA

D'une part, les biofilms constituent une source de contamination récalcitrante avec pour conséquence l'altération de la qualité et de la salubrité des produits, la diminution de leur durée de conservation et/ou la transmission de maladies (Brooks et Flint, 2008). Plusieurs épidémies se sont avérées être associées à la présence de biofilms dans les équipements des industries de transformation. En effet, il est bien établi à ce jour que la plupart des bactéries pathogènes alimentaires, telles que celles des genres *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Escherichia*, peuvent former des biofilms à la fois sur les aliments et sur les surfaces utilisées dans l'IAA (Akbas, 2015).

D'autre part, les biofilms peuvent entraver la rentabilité des lignes de production. En effet, les micro-organismes des biofilms sont des catalyseurs de réactions chimiques et biologiques responsables de la corrosion des cuves et des systèmes de tuyauteries. De plus, la présence de biofilms sur les échangeurs thermiques, les systèmes de refroidissement et de filtration peuvent diminuer considérablement leur rendement et l'efficacité opérationnelle (Mittelman, 1998). Les biofilms confrontent donc l'IAA à des coûts importants liés à des pertes d'énergie, de production et à la nécessité d'investir pour remplacer le matériel détérioré.

3 Stratégies de contrôle dans l'IAA

Afin d'éviter que *B. cereus* n'atteigne un niveau dangereux à la consommation, de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication sont indispensables. Pour ce faire, les industries alimentaires ont mis en place différentes méthodes, aussi bien dans le but de diminuer la charge microbienne totale dans les produits alimentaires, que de prévenir la formation de biofilms.

3.1 Nettoyage et désinfection des installations

L'élimination des spores et des cellules végétatives immobilisées dans un biofilm en IAA constitue un problème de taille. En effet, elles résistent aux principaux désinfectants chimiques utilisés tels l'hypochlorite de sodium, le peroxyde d'hydrogène et les ammoniums quaternaires (Srey *et al.*, 2013). Le meilleur moyen de lutte est dès lors de prévenir la formation de biofilm en nettoyant correctement les installations afin qu'aucun résidu organique pouvant favoriser l'attachement des bactéries ne subsiste. Si le biofilm est déjà formé, l'étape de nettoyage doit être en mesure de détruire partiellement la matrice pour permettre aux désinfectants de rentrer en contact avec les cellules microbiennes vivantes (Chmielewski et Frank, 2003). Pour ce faire, les industries alimentaires ont mis en place des méthodes de Nettoyage en Place (NEP). Ces procédés permettent de nettoyer rapidement les lignes de production automatiquement sans devoir démonter les installations principalement par l'addition d'acides caustiques/nitriques et en augmentant la turbulence et le flux (Srey *et al.*, 2013). Cependant, ces procédures ne sont pas toujours efficaces sur les biofilms et peuvent induire la sélection de phénotypes résistants (Bridier *et al.*, 2015). Le process NEP le plus couramment utilisé en industrie laitière induit une réduction de moins de 2 log des cellules et des spores de *B. cereus* ce qui est largement insuffisant (Kumari et Sarkar, 2016). Par ailleurs, l'action combinée d'un traitement mécanique ou l'ajout d'un biocide est nécessaire pour promouvoir l'élimination des biofilms de *B. cereus* (Lemos *et al.*, 2015). Enfin, l'utilisation de ces composés chimiques peut également causer des problèmes d'ordres environnementaux en sus de leur toxicité.

3.2 Contrôle dans les aliments

Parmi les méthodes utilisées pour contrôler la charge en cellules végétatives et en spores dans les aliments, on retrouve les traitements thermiques, les procédés à haute pression hydrostatique, les champs électriques pulsés, l'irradiation et l'utilisation de conservateurs (EFSA, 2016). La plupart de ces traitements sont relativement efficaces contre les cellules végétatives mais certains ne parviennent pas à inactiver les spores et aucune des méthodes utilisées dans l'IAA n'est en mesure d'inactiver la toxine émétique (Rajkovic *et al.*, 2008b). L'application de hautes températures en combinaison avec de hautes pressions est nécessaire pour détruire les spores les plus résistantes (EFSA, 2016). Actuellement, le meilleur moyen de contrôler *B. cereus* tout au long de la chaîne alimentaire reste le maintien des aliments à une température inférieure à 7°C (et préférentiellement sous la barre des 4°C) (Rajkovic *et al.*, 2008a).

Ces méthodes actuelles de conservation des aliments présentent de nombreux désavantages. Tout d'abord, elles affectent les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments ainsi que leurs propriétés fonctionnelles. Par ailleurs, leur spectre assez large ne permet pas de faire la distinction entre la flore bénéfique et pathogène. En outre, les tendances actuelles du marché forcent les producteurs à réduire l'utilisation de conservateurs chimiques en raison de leur impact négatif sur la santé et l'environnement. L'engouement des consommateurs vers des produits réfrigérés et prêts-à-manger constitue un nouveau challenge. En effet, le risque de contamination est d'autant plus élevé que le mode de préparation de ces produits ne met en jeu aucun traitement thermique en mesure de détruire d'éventuelles bactéries pathogènes avant consommation.

3.3 Biocontrôle

Au vu des limites et des désavantages liés aux méthodes de nettoyage et de désinfections, ainsi qu'aux traitements visant à préserver les aliments, il est essentiel de développer des méthodes alternatives aux contrôles traditionnels des pathogènes et des biofilms. Ces dernières années ont vu un intérêt grandissant pour les stratégies de biocontrôle et leur application tout au long de la chaîne alimentaire, comme l'utilisation d'organismes vivants ou encore de substances naturelles pour lutter contre les agents pathogènes (Garry *et al.*, 2008). Ces stratégies "vertes", non basées sur l'utilisation de produits chimiques, sont actuellement largement étudiées.

Parmi ces stratégies de biopréservation, les bactériocines présentent un atout certain. Il s'agit de peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire, produites principalement par les bactéries lactiques (Garry *et al.*, 2008). Elles ont une activité bactéricide ou bactériostatique dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice (Ennahar *et al.*, 2000). Actuellement, la nisine, produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactii* est la seule à posséder le statut GRAS (Generally Recognised As Safe). Elle est utilisée comme agent de conservation dans les fromages, les viandes et les poissons et possède une activité inhibitrice sur certains pathogènes Gram-positifs dont principalement *L. monocytogenes* (de Arauz *et al.*, 2009).

En ce qui concerne les biofilms, l'approche la plus étudiée est l'utilisation de détergents enzymatiques. Autrement dit, l'utilisation de cocktails d'enzymes capables de décomposer partiellement les différentes composantes de la matrice. Ce traitement présente plusieurs intérêts (Thallinger *et al.*, 2013). Les enzymes ne causent pas de problèmes de corrosion, ne sont pas toxiques et nécessitent moins de volume de rinçage.

Enfin, les bactériophages, virus qui infectent spécifiquement les bactéries, sont déjà largement utilisés comme agent de biocontrôle et leur capacité à prévenir et éradiquer les biofilms fait l'objet de nombreuses études. Leurs caractéristiques et leurs applications dans l'IAA feront l'objet de la prochaine section.

4 Bactériophages

Les bactériophages ou phages sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries. Les phages constituent l'entité biologique la plus abondante dans la biosphère avec près de 10^{31} représentants (Kutter et Sulakvelidze, 2004). Ils sont ubiquistes et peuplent tous les environnements colonisés par leurs hôtes bactériens notamment les océans, les eaux douces, la rhizosphère, les plantes et les aliments, ainsi que les cavités corporelles des humains et des animaux (Ackermann et Prangishvili, 2012).

Les phages ont été découverts indépendamment par deux chercheurs au début du 20^{ème} siècle. D'abord en 1915, par le bactériologiste anglais Frederic Twort, qui observa des plaques de lyse sur des colonies de *Micrococcus*. Puis deux ans plus tard, Félix d'Herelle, un chercheur franco-canadien fit les mêmes constatations sur des cultures de *Shigella*, lors d'une épidémie de dysenterie. Ce dernier leur donna le nom de "bactériophages", du grec *bakteria* et *phagein* signifiant respectivement "bâton" et "manger". Quelques années plus tard, les phages sont devenus célèbres pour leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques contre les infections d'origine bactérienne. Cependant, suite à la découverte des antibiotiques dans les années 30, cette discipline connue sous le nom de phagothérapie fut abandonnée progressivement, excepté dans les pays de l'Europe de l'Est et de l'ex-Union Soviétique pour qui l'accès aux antibiotiques était difficile voir interdit (Salmond et Fineran, 2015).

Dans les années 1940-1960, les bactériophages ont contribué à l'essor de la biologie moléculaire. Ils ont notamment permis de découvrir que les acides nucléiques constituaient le support de l'information génétique (Hershey et Chase, 1952). Actuellement, les phages connaissent un regain d'intérêt non seulement comme moyen de lutte contre les souches pathogènes résistantes aux antibiotiques mais également pour les applications en biologie moléculaire et en biotechnologie (Gillis et Mahillon, 2014).

4.1 Morphologie et classification

Depuis l'apparition de la microscopie électronique en 1959, plus de 6300 virus bactériens ont été recensés (Ackermann et Prangishvili, 2012). La taxonomie des phages, en continuelle évolution, est sous la responsabilité du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV). Cette organisme classe les phages selon la nature de l'acide nucléique, les propriétés morphologiques et physicochimiques du virion ainsi que plus récemment la séquence génomique (Dublanche, 2014; Adriaenssens et Brister, 2017). A l'instar de nombreux virus, les phages sont essentiellement composés d'une tête de nature protéique, appelée capsid, qui contient l'information génétique sous forme d'ADN ou ARN, mono ou bicaténaire.

La majeure partie des phages décrits (96%) appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* qui regroupe les phages possédant de l'ADN double brin et une queue impliquée dans le processus d'adsorption à la bactérie cible. En outre, leur virions ne sont pas entourés d'une enveloppe (King *et al.*, 2011). La partie caudale, également de nature protéique, est reliée à la tête par un col et peut posséder des structures facultatives

telles que des fibres ou des spicules. L'ordre des *Caudovirales* se subdivise en trois familles selon la morphologie de la queue (Fig. I.5) : les *Siphoviridae* sont caractérisés par une longue queue non contractile (57.3% des phages), les *Myoviridae* ont une queue contractile (24.8%) tandis que la queue des *Podoviridae* est petite et non contractile (14.2%)(Ackermann et Prangishvili, 2012).

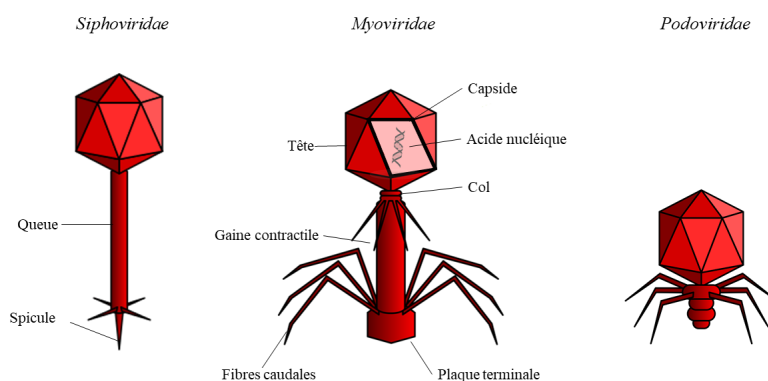


Figure I.5 – Caractéristiques morphologiques des trois différentes familles de phages à queue : les *Siphoviridae*, les *Myoviridae* et les *Podoviridae*

Les phages dépourvus de queues représentent moins de 4% des virus de procaryotes et se divisent en trois groupes morphologiques différents : les phages polyhédraux sont isocaèdres ou à symétrie cubique, les filamenteux sont de symétrie hélicoïdale et à ADN simple brin et les phages pléiomorphes présentent des formes diverses. Certains de ces phages possèdent également une enveloppe lipoprotéique ou une vésicule lipidique interne (Ackermann, 2011). L'ICTV les a classés en 7 familles sur base de leur structure et de leur génome.

B. cereus est la cible de certains phages virulents issus de la famille des *Myoviridae* mais également de phages tempérés appartenant aux *Siphoviridae* et aux *Tectiviridae* (Gillis et Mahillon, 2014). Ces derniers sont des phages polyhédraux qui possèdent une membrane lipidique interne agissant comme une pseudo-queue lors de l'adsorption (Gillis et Mahillon, 2014).

4.2 Cycle de vie des phages

Les phages sont des parasites obligatoires, c'est à dire qu'ils doivent utiliser les ressources de la cellule bactérienne pour compléter leur cycle. En effet, ils ne possèdent pas toute la machinerie génétique pour se reproduire et ne se multiplieront que si leur hôte spécifique est présent. Les phages se divisent en deux groupes selon le cycle de vie adopté. D'une part, les phages virulents suivent un cycle lytique menant à la lyse de la bactérie hôte et la libération de nouveaux phages dans le milieu. D'autre part, les phages tempérés, suivent un cycle lysogénique dans lequel ils coexistent durant plusieurs générations avec la bactérie. Ces deux cycles sont représentés à la Fig. I.6.

4.2.1 Cycle lytique

La première étape du processus infectieux est l'adsorption du phage à un récepteur spécifique présent sur la paroi bactérienne de l'hôte (*e.g.* polyssacharides ou acides téchoïques), ou sur ses flagelles ou pili (Kutter et Sulakvelidze, 2004). L'étape de reconnaissance est très spécifique et influence considérablement le spectre d'action des phages. La rencontre entre un phage et une bactérie est un processus aléatoire dont la probabilité dépend de l'abondance respective des deux partenaires. Une fois le phage fixé, son ADN transite dans la queue et est injecté dans le cytoplasme de l'hôte tandis que la capside vide reste à l'extérieur de la cellule. Rapidement, l'ADN linéaire se recircularise afin d'éviter sa dégradation par les exonucléases bactériennes. Le phage détourne alors la machinerie biosynthétique de la cellule à son profit et initie la réplication de l'ADN phagique ainsi que la production de protéines virales fonctionnelles et structurales. Les virions sont assemblés lorsque tous les constituants séparés ont été synthétisés. Leur libération dans le milieu extracellulaire est assurée par deux enzymes : les holines, qui déstabilisent la membrane interne à un moment précis afin de permettre aux endolysines d'atteindre la paroi cellulaire et d'hydrolyser le peptidoglycan (Catalao *et al.*, 2013). La cellule éclate et libère généralement entre 50 et 100 nouveaux virions capables à leur tour d'infecter d'autres cellules menant à une augmentation du nombre de phages (Borysowski *et al.*, 2014). La durée moyenne du cycle complet est d'environ 30 min.

4.2.2 Cycle lysogénique

Le cycle lysogénique commence de manière analogue au cycle lytique par l'adsorption du phage à la bactérie et l'injection de son matériel génétique. Les phages tempérés ont ensuite la possibilité d'intégrer leur génôme à l'intérieur du chromosome bactérien. Dans certains cas, le phage peut rester sous forme d'un plasmide linéaire ou circulaire stable dans le cytoplasme. Les phages ont alors la dénomination de "prophages" et peuvent rester sous cette forme quiescente pendant plusieurs générations. Lorsque le génome viral s'intègre à celui de l'hôte, une intégrase est requise et lie des segments homologues de l'ADN du phage et de la bactérie au niveau de sites spécifiques d'attachement où il y aura recombinaison (Nicastro *et al.*, 2016). L'ADN du phage se réplique passivement et conjointement avec celui de la bactérie sans conséquence fatale pour cette dernière. Il sera donc transféré verticalement à chaque cellule fille. Le prophage ne produit que les protéines nécessaires au maintien de la lysogénie dont typiquement un répresseur qui va empêcher l'expression des gènes impliqués dans la réplication virale du phage. Le prophage peut commencer un cycle lytique s'il est excisé du chromosome bactérien par l'enzyme excisionase, souvent en réponse à un stimulus tel que l'exposition aux ultraviolets, à des agents chimiques ou à une radiation ionisante. Il s'en suit la production de nouveaux virions.

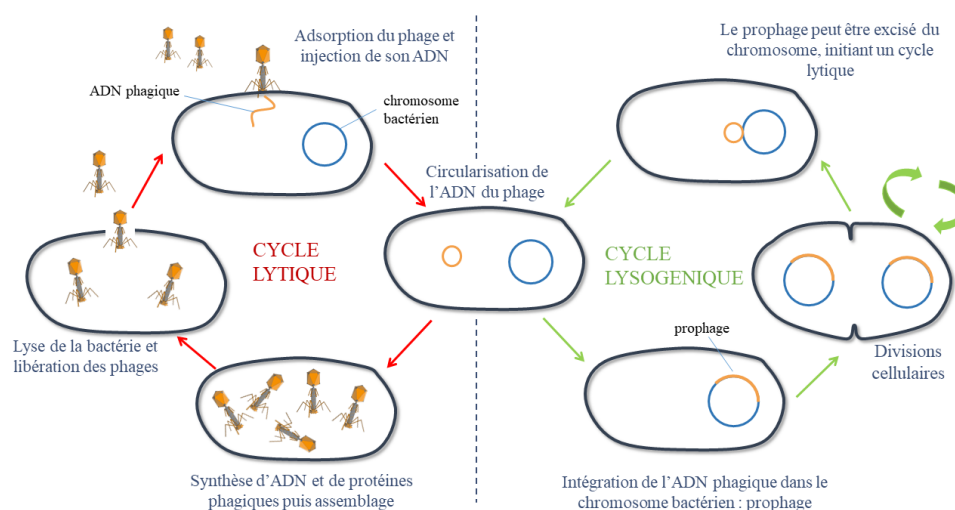


Figure I.6 – Cycles de vie des bactériophages. Les phages virulents suivent un cycle lytique menant à la lyse de la cellule hôte (gauche). Les phages tempérés accomplissent un cycle lysogénique au cours duquel ils intègrent leur génôme dans le chromosome bactérien (droite). En réponse à un stimulus, le phage est excisé du génôme et rentre dans un cycle lytique (Adaptée de © Pearson Education 2010, Inc)

4.3 Les phages comme agent de biocontrôle dans l'IAA

L'utilisation des bactériophages suscite un intérêt croissant en ce qui concerne l'amélioration de la sécurité alimentaire. En effet, grâce à leur spécificité, les phages peuvent aider à combattre les agents pathogènes à chaque étape de la ferme à l'assiette. Le biocontrôle par les phages inclut trois champs d'application principaux représentés à la Fig. I.7 : (i) la prévention et la réduction de la colonisation des animaux d'élevages par les pathogènes, (ii) la décontamination des surfaces en contact avec les aliments dans les industries et (iii) l'application directe des phages sur les aliments transformés.

4.3.1 Biocontrôle au niveau des matières premières

Les animaux sont les réservoirs principaux de nombreux pathogènes importants tels que *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *E. coli* ou *S. enterica*. Il est donc primordial de diminuer la charge bactérienne à ce stade initial de la production afin d'éviter la propagation des pathogènes et les risques de contamination croisée. En effet, les modèles d'évaluation des risques indiquent qu'une diminution de 1 ou 2 log de la charge microbienne dans les matières fécales de l'animal abattu réduirait les risques pour le consommateur de 45 et 75%, respectivement (Kazi et Annapure, 2016). Néanmoins, contrôler les pathogènes à la ferme est un processus complexe, dont la seule ligne de défense pour prévenir la colonisation et le développement de maladies étaient les antibiotiques. Cependant, l'utilisation abusive de ces derniers comme facteur de croissance a entraîné une augmentation inquiétante du nombre de souches bactériennes résistantes et, depuis 2006, leur emploi à des fins non thérapeutiques est banni au sein de l'Union Européenne (Commission Européenne, 2006). La phagothérapie pourrait constituer ici une alternative viable. Bien qu'actuellement aucun

produit n'ait été approuvé pour son utilisation sur les animaux vivants, le potentiel des phages pour contrôler les bactéries pathogènes a été évalué dans de nombreuses études.

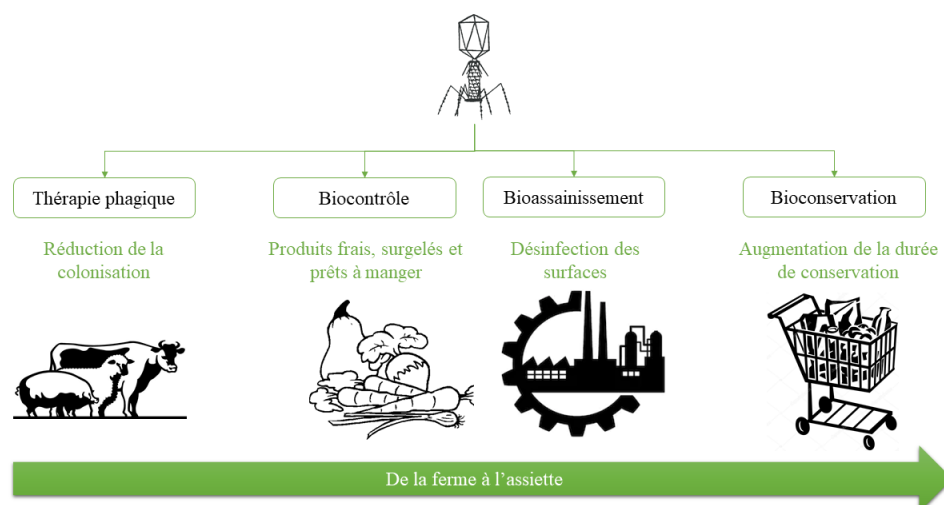


Figure I.7 – Exemples d’application des phages tout au long de la chaîne alimentaire (Inspirée de Garcia *et al.* (2008))

Fiorentin *et al.* (2005) ont évalué l’efficacité d’un mélange de trois phages sur des poulets de chair et ont constaté une diminution de 3,5 ordres de grandeur du nombre de *S. enterica* dans le caecum. Cette diminution a perduré jusqu’à 25 jours après le traitement. Carvalho *et al.* (2010) ont obtenu une réduction de 2 log de la charge de *C. jejuni* dans les fèces de poulet de chair suite à l’administration d’une combinaison de trois phages. Cette diminution diviserait par 30 l’incidence de la campylobactériose associée à la consommation de poulet. L’utilisation d’un cocktail de trois phages en combinaison avec des bactéries d’exclusion compétitives chez le poulet de chair a amené une diminution de 3 log des bactéries dans le caecum (Borie *et al.*, 2009). Par ailleurs, plusieurs études ont prouvé que la thérapie phagique serait également utile pour diminuer considérablement la charge en *E. coli* O157 :H7 au sein des cheptels bovins et ovins (Sheng *et al.*, 2006; Raya *et al.*, 2011). La thérapie phagique chez le bétail présente des résultats prometteurs. Néanmoins, des études supplémentaires sont indispensables notamment en ce qui concerne la viabilité des phages administrés oralement et le risque de développement de résistances (Goodridge et Bisha, 2011).

Plusieurs applications phagiques existent également pour le biocontrôle au niveau des matières premières végétales. En 2002, Omnilytics a développé un pesticide, AgriPhageTM à partir de deux phages ciblant *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae*. Ces pathogènes de plantes sont à l’origine de l’apparition de tâches bactériennes respectivement sur les tomates et les poivrons. En 2002, l’agence de protection environnementale (EPA) a autorisé la pulvérisation du produit directement sur les plantes ainsi que sur le sol environnant (Goodridge et Bisha, 2011).

4.3.2 Biosanitation

La salubrité des installations et des surfaces en contact avec les aliments dans l'IAA est primordiale afin d'empêcher toute contamination croisée. La majorité des études mettent l'accent sur la décontamination des surfaces par les phages mais les résultats suggèrent que ceux-ci pourraient également servir à prévenir la contamination et la formation de biofilms.

ListexTM (Microcos Food Safety), un produit composé du phage virulent P100, a été employé pour éradiquer un biofilm mature de sept jours formé par cinq souches de *L. monocytogenes* sur une surface d'acier inoxydable. Le traitement a réduit de 3,5 à 5,4 ordres de grandeur la concentration en bactérie sur la surface après 24 h à température ambiante. Patel *et al.* (2011) ont pulvérisé un cocktail de phages sur un biofilm mature formé à partir de cinq souches de *E. coli* sur des lames immergées dans un extrait d'épinards. La population d'*E. coli* s'est vue diminuée de 4,5 log après 2h de traitement. L'application d'un cocktail de deux phages s'est également montré efficace sur des biofilms de *C. jejuni* présents sur des surfaces en verre. Il a entraîné une diminution de 1 à 3 log du nombre de colonies viables 24 h post-infection comparé au contrôle. Le traitement a également induit la dispersion de la matrice du biofilm. Cependant un pourcentage élevé de bactéries résistantes a été rapporté (Siringan *et al.*, 2011). Viazis *et al.* (2011) ont testé un cocktail de phages sur des surfaces d'acier inoxydable, de céramique et de polyéthylène contaminées par *E. coli*. Une élimination totale des bactéries a été observée après 10 minutes d'exposition à 37°C et à 12°C ainsi qu'après 1 h d'exposition à 23°C.

Il est essentiel de prendre en compte que les biofilms sont souvent composés de plusieurs espèces dans l'IAA. La dégradation d'un biofilm naturel par un seul type de phage semble dès lors peu probable (Hudson *et al.*, 2005). Cependant, leur utilisation semble prometteuse dans la stratégie d'éradication des biofilms.

4.3.3 Biopréservation

Les phages peuvent également être utilisés directement sur les produits finis ou en cours de transformation. Cette stratégie a pour but de contrôler l'innocuité des aliments et d'augmenter leur durée de conservation. Comparé à l'application sur les animaux vivants, les phages montrent une efficacité supérieure dans les aliments. En effet, dans le premier cas, les phages doivent faire face au système immunitaire de leur hôte ainsi qu'à une multitude de microenvironnements différents. Plusieurs préparations sont d'ailleurs déjà approuvées pour leur utilisation dans l'alimentation.

En 2006, la FDA a autorisé pour la première fois l'utilisation d'une préparation phagique comme bioconservateur (Bren, 2007). Il s'agit de ListShieldTM (Intralix), un cocktail de six phages dont la pulvérisation sur les viandes prêtes-à-manger et les produits à base de volaille assure une protection étendue contre *L. monocytogenes* (Intralix, 2009). Auparavant, le cocktail a montré une réduction de 4 log sur des tranches de melons stockées durant sept jours à 10°C. En combinaison avec la nisine, une diminution de 5,7 log a été obtenue (Leverentz *et al.*, 2003). Par ailleurs, la

préparation phagique, appliquée seule et environ 1 h avant contamination, a diminué jusqu'à 6,8 log la concentration en *L. monocytogenes* (Leverentz *et al.*, 2004). La même année, ListexTM (Micros Food Safety) a reçu le statut GRAS pour sa pulvérisation sur tous les aliments. Le produit, dépendamment du traitement et de la dose, a montré ses capacités à réduire et même à éradiquer la totalité des cellules de *L. monocytogenes* respectivement à la surface de filet de saumon (Soni et Nannapaneni, 2010a) et dans le fromage (Carlton *et al.*, 2005). En outre, l'association de P100 avec un autre phage virulent a rendu indétectable la présence de *L. monocytogenes* dans divers aliments prêts à manger comme le lait chocolaté ou la mozzarella (Guenther *et al.*, 2009).

EcoShieldTM (Intralix, Inc), une préparation dont le composé actif est une combinaison de trois phages lytiques spécifiques contre *E. coli* O157:H7 a également été approuvé par la FDA en 2011. Le produit peut être appliqué en toute sécurité sur les pièces de viande rouge destinées à être hachées. Carter *et al.* (2012) ont montré son efficacité par la mise en contact des viandes et des salades contaminées durant 5 min avec la préparation phagique. Cela a réduit significativement la concentration en bactéries de 94% et 87% respectivement avec un MOI de 1000 (rapport entre la concentration en phages et en bactéries). Cette diminution a été maintenue durant une semaine à des températures réfrigérantes mais l'application unique du produit n'a cependant pas été en mesure d'empêcher la recontamination des aliments. L'efficacité d'EcoShieldTM a également été testée sur des tomates, des épinards, des brocolis et de la viande hachée. La réduction en bactéries cibles s'élevait de 94% pour les tomates à 100% pour les épinards en fonction du temps d'incubation (120 et 24 h respectivement) (Abuladze *et al.*, 2008).

Le dernier produit en date à avoir été approuvé par la FDA (2013) vise particulièrement les sérotypes les plus communs et hautement pathogènes de *S. enterica*. SalmoFreshTM (Intralix, Inc), un cocktail de six phages, est le troisième produit de sécurité alimentaire de Intralix à avoir reçu le statut GRAS pour son application sur les viandes rouges et les volailles préalablement à l'étape de hachage. Le statut GRAS a été accordé la même année à SalmoNelexTM (Micros Food Safety), un cocktail de deux phages visant ce même pathogène. L'entreprise indique qu'une réduction de 0,5 log peut être obtenue en quelques minutes et jusqu'à 2 log en 24h sur les viandes et les volailles fraîches.

Acutellement, aucun produit n'a été approuvé pour le biocontrôle de *C. jejuni*. Néanmoins, plusieurs études ont analysé le potentiel des phages lytiques sur des peaux de poulets contaminées (Atterbury *et al.*, 2003; Bigwood *et al.*, 2008).

La majorité des études se concentrent tout naturellement sur les quatre grands pathogènes principaux. Cependant les recherches n'en sont pas moins actives et prometteuses pour *S. aureus*, *Shigella* ou *Cronobacter sakazakii* (Sulakvelidze, 2013). En ce qui concerne *B. cereus*, un cocktail de deux phages a montré sa capacité à réduire de 6 log la charge en bactéries sur une purée de pomme de terre après seulement 24 h (MOI de 100)(Lee *et al.*, 2011). Shin *et al.* (2011) ont appliqué le phage JBP901 avec une MOI de 10⁶ sur une pâte de soja fermentée, le chungkookjang.

Après 24 h d'incubation à 37°C, une réduction de 3 log a pu être observée par rapport au groupe contrôle (Shin *et al.*, 2011). De plus, l'expérience n'a en aucun cas impacté la concentration en *B. subtilis* nécessaire à la fermentation des haricots.

4.3.4 Endolysines

Les endolysines sont des enzymes produites par les phages à la fin du cycle lytique. Elles possèdent un domaine enzymatique actif qui catalyse la désintégration de la paroi ainsi qu'un domaine qui permet à l'enzyme de reconnaître des molécules ligands spécifiques présentes sur les parois cellulaires. Les bactéries Gram-positives étant dépourvues de membrane externe, les endolysines peuvent accéder à la paroi de l'extérieur et lyser complètement les cellules. Elles peuvent dès lors être utilisées comme agent de biocontrôle, seules ou en synergie avec d'autres antimicrobiens comme les bactériocines (Schmelcher et Loessner, 2016).

L'endolysine LysZ5 s'est révélée efficace contre *L. monocytogenes* dans du lait de soja en réduisant sa concentration de 4 log après 3 h d'incubation (Zhang *et al.*, 2012). Par ailleurs, la croissance de *S. aureus* dans du lait pasteurisé a pu être contrôlée à 37°C par l'action de la lysine LysH5. Cette dernière a réduit le nombre de CFU de 8 unités de grandeur par rapport au contrôle (Obeso *et al.*, 2008). Cette activité a été renforcée par l'utilisation conjointe de cette endolysine avec la nisine. Un effet synergique a été observé entre les deux antimicrobiens (García *et al.*, 2010). Les endolysines ont également prouvé leur efficacité en tant qu'agent anti-biofilm dans différentes études. Gutierrez *et al.* (2014) ont montré que l'endolysine LysH5 pouvait diminuer de 1 à 3 log le nombre de cellules d'un biofilm de *S. aureus* après 3 h de traitement à 37°C et que l'enzyme était aussi active contre les cellules persistantes. Une autre étude a démontré le potentiel de l'endolysine LysK comme agent biocide aussi bien pour l'éradication que la prévention de biofilms associés à *S. aureus* (Fenton *et al.*, 2013).

Les endolysines ont plusieurs avantages par rapport aux phages. D'une part, l'absence de résistance bactérienne est considérée comme un atout majeur. En effet, la bactérie devrait être en mesure de modifier la composition de sa paroi afin d'empêcher sa dégradation (Schmelcher et Loessner, 2016). D'autre part, les endolysines ont un spectre d'activité généralement plus étendu que les bactériophages et ne présentent aucun risque de transfert de virulence (Fischetti, 2010). Cependant, la production de cette enzyme est onéreuse en comparaison avec celle des phages. Par ailleurs, ce sont des protéines relativement instables qui sont sujettes à la protéolyse et la perte de leur activité dans les aliments (Schmelcher et Loessner, 2016).

4.4 Considérations pour l'élaboration d'un produit phagique à des fins de biocontrôle

L'application de phages comme moyen de biocontrôle est reconnue pour être une des approches les plus sécuritaires actuellement grâce à leur étroite spécificité qui leur permet de n'infecter qu'une gamme limitée de bactéries. S'ils sont bien sélectionnés, ils n'affecteront pas les bactéries bénéfiques de la flore commensale. Par ailleurs, plusieurs études sur des volontaires humains ont prouvé leur innocuité envers les consommateurs et les cellules de mammifères en général. En effet, les phages sont naturellement présents chez les humains, les animaux et l'eau et nous en consommons donc quotidiennement via notre alimentation. Dans les pays de l'est, la thérapie phagique est largement répandue depuis plus de 50 ans. Les phages ont été administrés oralement, superficiellement mais également par voie intraveineuse et intramusculaire sans aucun effet secondaire (Hagens et Loessner, 2010).

Cependant, pour qu'un phage soit sélectionné pour son application dans la chaîne alimentaire à des fins de biocontrôle, il doit satisfaire à plusieurs exigences et critères qui garantiront son statut sécuritaire et son efficacité.

Sélectionner des phages lytiques

Tout d'abord, une exigence essentielle de sécurité concernant l'application d'un phage est la confirmation qu'il s'agit d'un phage strictement lytique. Les phages tempérés, par l'intégration de leur matériel génétique dans celui de la bactérie ou par leur résidence sous forme de molécules extrachromosomiques (plasmides), peuvent altérer le phénotype de leur hôte. En effet, ils peuvent contenir dans leur génome des gènes de virulence ou de résistance à un antibiotique. Par exemple, le prophage CTX contient le matériel génétique nécessaire à *Vibrio cholerae* pour la production de la toxine cholérique. De la même manière, le principal facteur de virulence des *E. coli* est la Shiga toxine codée par le gène *stx*, localisé dans le génome d'un prophage (Howard-Varona *et al.*, 2017). Par ailleurs, les phages lytiques ont l'avantage de tuer directement les bactéries au contraire des phages tempérés qui coexistent majoritairement avec celles-ci et ne sont donc pas appropriés pour le biocontrôle. Le génome du phage doit dès lors être complètement séquencé afin de garantir l'absence de gènes de lysogénie (*e.g.* intégrase). Par ailleurs, il doit être dépourvu de séquences codant pour des facteurs de virulence ou pour des protéines pouvant induire une réponse du système immunitaire (Endersen *et al.*, 2014).

Choisir un phage non transducteur

La transduction, phénomène au cours duquel l'ADN de l'hôte est accidentellement empaqueté dans la capside d'un nouveau phage à la fin du cycle lytique, devrait également être évitée. Par ce mécanisme, de l'ADN étrangé peut être transféré à d'autres bactéries lors d'une nouvelle infection. Cet ADN pourrait alors introduire des gènes indésirables, potentiellement pathogènes, par recombinaison dans le génome d'une espèce non pathogène (Hagens et Loessner, 2010). Dans la mesure du possible,

il faut dès lors veiller à utiliser un hôte non pathogène pour la propagation des phages.

Stabilité et production

Le phage doit être suffisamment stable dans différentes conditions et sur de longues périodes de stockage. En effet, plusieurs considérations écologiques sont à prendre en compte lors de l'élaboration d'une stratégie de biocontrôle tels que le pH, la température ou les composantes de la matrice à l'étude. Ces facteurs pourraient diminuer l'efficacité du phage en interférant dans l'interaction phage-hôte et/ou en inhibant l'activité phagique (Lu et Koeris, 2011). Dans le cas de l'application de phages sur des êtres vivants, une éventuelle réponse immunitaire de l'hôte devra également être prise en compte. Enfin, le phage doit être facilement produit et purifié à grande échelle. La préparation doit être exempte des éventuelles toxines relâchées dans le milieu lors de la lyse cellulaire (Hagens et Loessner, 2010).

Cocktail de phages

Bien que répondant aux différents critères précédemment cités, l'utilisation d'un seul phage peut mener à l'émergence de souches résistantes. Par ailleurs, une maladie est souvent causée par la présence de plusieurs souches pathogènes. Afin de pallier ces contraintes, plusieurs phages peuvent être utilisés en concomitance. La gamme d'hôtes reconnus sera alors plus étendue, ce qui augmentera de surcroît l'efficacité du biocontrôle et réduira la fréquence d'apparition de résistance (Garcia *et al.*, 2010). Une autre solution est l'utilisation de phages ayant un large spectre d'action. Cependant de tels phages ne sont pas toujours disponibles.

Au vu de toutes ces informations, il est clair que les phages constituent une alternative prometteuse aux antibiotiques. Les avantages surpassent largement les inconvénients (Tableau I.1). Néanmoins, le frein majeur à l'établissement d'applications commerciales sera d'approfondir nos connaissances sur les phages afin de conforter les consommateurs avec cette idée de "virus comestibles".

Tableau I.1 – Avantages et inconvénients liés à l'utilisation de phages à des fins de biocontrôle.

Avantages
Grande spécificité
Innocuité envers la flore bénéfique
Multiplication seulement en présence de l'hôte
N'affecte pas les propriétés organoleptiques et sensorielles
Inoffensif pour les humains et l'environnement
Inconvénients
Spectre d'action étroit
Possibilité d'apparition de résistance
Nécessité d'utiliser des phages virulents

4.5 Les phages comme outil de détection

La détection précoce et rapide des pathogènes est essentielle pour l'industrie alimentaire afin de préserver la santé publique. Cependant les méthodes traditionnelles de détection des pathogènes sont fastidieuses et exigent des délais d'incubation importants. Le développement de nouvelles procédures qui soient simples, rapides, fiables et peu coûteuses devient indispensable. Les phages grâce à leur capacité à cibler spécifiquement leur hôte, constituent une alternative efficace.

La haute spécificité du domaine de reconnaissance à la paroi des endolysines peut être mise à profit dans la détection de bactéries à Gram positif. Ces domaines peuvent, par exemple, être immobilisés sur des billes magnétiques qui pourront être utilisées pour détecter et concentrer spécifiquement les bactéries cibles. Grâce à ce système, Kretzer *et al.* (2007) ont pu capturer et récupérer plus de 90% des cellules vivantes de *L. monocytogenes* d'un échantillon en 20 à 40 min. Par ailleurs, la fusion de marqueurs fluorescents différents à plusieurs domaines a permis à Schmelcher *et al.* (2010) de détecter et de distinguer plusieurs serotypes de *L. monocytogenes* dans du lait et du fromage.

De la même manière, les anti-récepteurs des phages qui reconnaissent les récepteurs spécifiques à la surface bactérienne et qui sont présents au niveau de la queue des phages ont également fait leurs preuves notamment pour la détection et l'identification de bactéries à Gram-négatif (Schmelcher et Loessner, 2014).

Malgré sa haute spécificité et son activité de liaison plus efficace que lors de l'utilisation d'anticorps, cette technique ne peut différencier les cellules vivantes des mortes. Cette restriction a été surmontée par l'utilisation de phages rapporteurs pour détecter les pathogènes (Bai *et al.*, 2016). Un phage rapporteur est un phage génétiquement modifié. Le principe repose sur l'insertion d'un gène dans le génome phagique qui ne pourra être exprimé que lorsque l'infection de la bactérie aura lieu. Cela permettra la détection subséquente de l'hôte infecté par mesure de la bioluminescence (*e.g.* luciférase), la fluorescence (*e.g.* GFP) ou la conversion enzymatique d'un substrat chromogénique (*e.g.* beta-galactosidase) (Schmelcher et Loessner, 2014). Récemment, Zhang *et al.* (2016) ont conçu un phage rapporteur contenant un gène de luciférase capable de détecter *E.coli* O157 :H7 à une concentration aussi basse que 5 CFU/g dans du boeuf haché et dans un délai de 9 h .

Objectifs

Les bactéries pathogènes représentent un problème de santé publique majeur et sont un fléau pour les industries agroalimentaires qui doivent faire face à leur présence récurrente dans les lignes de production. Certaines souches de *B. cereus s.l.* sont responsables d'intoxications alimentaires émétiques et/ou diarrhéiques et bien que les symptômes soient généralement bénins, certains cas mortels ont été rapportés. Dès lors, le contrôle de cette bactérie s'avère primordial. Cependant, en raison de sa capacité à sporuler et à former des biofilms, *B. cereus s.l.* résiste aux méthodes actuelles de préservation des aliments et aux procédures de nettoyage des installations industrielles. Une approche alternative et largement étudiée actuellement pour éradiquer ces bactéries repose sur l'utilisation de phages. Ces virus, capables d'infecter spécifiquement les bactéries, présentent de nombreux avantages qui font d'eux des outils prometteurs pour le contrôle des bactéries pathogènes au sein de la filière agro-alimentaire.

Récemment isolé de l'environnement, le phage Deep-Blue montre une activité lytique contre plusieurs souches émétiques psychrotolérantes de *B. cereus*. Ce *Myoviridae* répond aux critères requis pour l'utilisation d'un phage comme agent de biocontrôle et ce travail se concentre dès lors sur son application dans la chaîne alimentaire. Les objectifs de ce mémoire seront, d'une part d'évaluer la capacité de Deep-Blue à contrôler des souches émétiques de *B. cereus* dans les aliments ainsi que lors de la formation de biofilms, et d'autre part, d'isoler des phages lytiques proches de Deep-Blue et ayant un spectre d'hôtes complémentaire dans le but de concevoir un cocktail phagique.

Tout d'abord, l'efficacité de Deep-Blue à contrôler la croissance de trois souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* sera évaluée à différentes températures et dans diverses matrices alimentaires (lait, riz et riz au lait) contaminées artificiellement. Le potentiel de Deep-Blue à prévenir et à éradiquer les biofilms sera ensuite appréhendé à l'aide d'un système de cellule à flux au sein duquel les bactéries peuvent adhérer. Les impacts respectifs d'un traitement préventif et curatif sur la formation d'un biofilm composé de souches de *B. weihenstephanensis* seront étudiés tout d'abord dans un milieu de croissance optimal, le LB, puis dans du lait afin de se rapprocher des conditions rencontrées en industrie. Par ailleurs, divers échantillons prélevés dans l'environnement seront enrichis avec des souches émétiques de *B. cereus*, insensibles à Deep-Blue. Les échantillons ayant révélé la présence de phages (plaques de lyse) seront soumis à une PCR utilisant des amorces ciblant des régions conservées chez les *Myoviridae*.

Chapitre II

Matériels et méthodes

1 Milieux de culture

1.1 Lysogenic Broth (LB)

Le LB est un milieu de culture utilisé en microbiologie et qui fournit tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance optimale d'un grand nombre de bactéries. La composition du LB est reprise au Tableau II.1. Le tryptone, issu de la protéolyse trypsique des caséines, constitue une source importante d'acides aminés. Les vitamines, les minéraux et les oligo-éléments quant à eux proviennent des extraits de levure. Après préparation, le milieu est autoclavé durant 15 min à 121°C.

Tableau II.1 – Composition du milieu de culture LB

Composants	Concentration (g/L)	Marque
Eau déminéralisée	-	-
NaCl	5	VWR Chemicals
Extrait de levure	5	Oxoid
Tryptone	10	Oxoid
Agar (si LB solide)	14	Biolabs
Agar (si top agar)	6	Biolabs

Pour l'isolement et la multiplication de phages, le milieu liquide est enrichi par l'ajout de cations divalents à raison de 0,3 g/L de CaCl_2 et 0,5 g/L de MgSO_4 (LBi). En effet, ces ions jouent un rôle majeur dans l'étape d'adsorption du phage. Enfin, un milieu LB solide est obtenu en ajoutant 1,4% d'agar au mélange liquide avant de l'autoclaver. Le "top agar", utilisé principalement pour le dénombrement des phages, nécessite quant à lui l'ajout d'une quantité moindre d'agar (0,6%) afin de permettre une lyse efficace des bactéries.

1.2 Liquide de Ringer

Le Ringer est une solution physiologique composée de différents sels (Tableau II.2) et qui assure une pression osmotique suffisante pour garantir la survie des organismes. Il est utilisé comme diluant dans la préparation des solutions de dispersion pour le

contrôle microbiologique de produits alimentaires et pour effectuer les dilutions décimales. Une solution de Ringer d'une concentration à 25% est obtenue par dissolution d'un comprimé (Oxoid) dans 500 ml d'eau déminéralisée. La préparation est ensuite autoclavée durant 15 min à 121°C puis stockée à température ambiante.

Tableau II.2 – Composition du liquide de Ringer

Sels	Concentration (g/L)
NaCl	2,25
KCl	0,105
CaCl ₂	0,12
NaHCO ₃	0,05

1.3 Phosphate Buffered Saline (PBS)

Le PBS est un tampon physiologique utilisé pour préparer les suspensions bactériennes. Les sels contenus dans cette solution (Tableau II.3) et son pH de 7,4 assurent l'intégrité et la viabilité des cellules. Après dissolution d'une pastille (Sigma) dans 200 ml, le PBS est autoclavé durant 15 minutes à 121°.

Tableau II.3 – Composition du tampon PBS

Sels	Concentration (g/L)
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,78
KH ₂ PO ₄	0,27

2 Cultures de bactéries

Dans le cadre de ce travail, l'activité de Deep-Blue a été étudiée sur trois souches de l'espèce *B. weihenstephanensis* : BtB2-4, Cer057 et Cer074. Ces trois souches ont été isolées respectivement dans des échantillons de sol forestier, de persil et de lait cru provenant de Belgique (Tableau II.4). Toutes trois peuvent se multiplier et synthétiser la toxine émétique à 8°C mais pas à 48°C. Par ailleurs, elles ont la particularité d'avoir les gènes nécessaires à la production du céréulide localisés sur leur chromosome contrairement aux autres souches émétiques de *B. cereus s.l.* pour lesquelles ils sont situés sur un plasmide (Hoton *et al.*, 2009).

Les bactéries sont cultivées pendant la nuit (O/N) à 30°C soit dans 10 ml de LB liquide sous une agitation de 120 rpm (culture liquide), soit sur du LB solide.

Tableau II.4 – Souches émétiques de *B. weihenstephanensis* utilisées dans le cadre de ce mémoire (Hoton *et al.*, 2009)

Souche	Origine		Lieu	Année
BtB2-4	Environnement	Sol forestier	Louvain-la-Neuve	2005
Cer057	Alimentation	Persil	Louvain-la-Neuve	2006
Cer074	Alimentation	Lait cru	Louvain-la-Neuve	2007

2.1 Obtention de mutants résistants à un antibiotique

Afin de pouvoir différencier BtB2-4, Cer074, Cer057 lors des différentes expériences, des mutants spontanés résistants à l'acide nalidixique, la rifampicine ou la streptomycine respectivement ont été obtenus comme suit : une culture liquide O/N de la bactérie cible est centrifugée pendant 10 min à 4 000 g et le culot est resuspendu dans 1 ml de Ringer. 10×100 µl de la solution obtenue sont ensuite étalés sur 10 boîtes de LB auxquelles un antibiotique a été ajouté à une certaine concentration (voir Tableau II.5). Après incubation à 30°C pendant 48 h, des colonies résistantes peuvent apparaître sur le milieu. Si tel est le cas, une colonie est striée sur une boîte de LB contenant son antibiotique de sélection.

Tableau II.5 – Antibiotiques utilisés et souches qui leurs sont résistantes.

Antibiotique	Solvant	Concentration du stock (mg/L)	Concentration utilisée (µg/L)	Souche résistante
Acide nalidixique	NaOH 0,5M	15	15	BtB2-4
Rifampicine	C ₂ H ₆ OS	25	25	Cer074
Streptomycine	H ₂ O	100	100	Cer057

Une PCR est ensuite effectuée pour vérifier qu'il s'agit bien de souches émétiques. Celle-ci est réalisée à l'aide des primers EM1F et EM1R (Tableau II.6), qui ciblent un fragment de 635 pb du gène *ces*, et de l'ADN polymérase OneTaq (New England Biolab), utilisée selon les indications du fournisseur.

Tableau II.6 – Séquences oligonucléotidiques des amorces EM1F et EM1R (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a). T_m = température d'hybridation.

Nom	Séquence (5'-3')	T _m (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
EM1F	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	57	635
EM1R	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT		

Les souches sont conservées à long terme à -80°C dans un milieu composé de 70% de LB, 30% de glycérol et 1µg/l d'antibiotique. A court terme, les souches sont striées régulièrement sur des boîtes comprenant leurs antibiotiques de sélection et conservées à 4°C. Les solutions stocks des différents antibiotiques sont préparées puis stérilisées par filtration à l'aide de filtre de 0.22µm avant d'être stockées à -20°C.

2.2 Dénombrement des bactéries

Le nombre de bactéries présentes dans une suspension est obtenu par la méthode de dénombrement des colonies. La suspension mère est tout d'abord diluée de dix en dix successivement dans du Ringer. 100 μ l de chacune des dilutions obtenues sont alors étalés sur des boîtes de LB qui sont incubées à 30°C pendant 24 h. La concentration finale, exprimée en CFU (Colony Forming Unit) par millilitre, est obtenue en multipliant le nombre de colonies dénombrées par le facteur de dilution décimale. Une moyenne des valeurs obtenues aux différentes dilutions est effectuée afin d'obtenir une estimation plus précise et seules les boîtes présentant un nombre de bactéries compris entre 10 et 200 sont prises en compte. Lorsque l'expérience est réalisée avec les souches mutantes, chaque dilution est étalée sur trois boîtes de Pétri comprenant chacune un antibiotique de sélection.

3 Préparation phagique

3.1 Deep-Blue

Deep-Blue est un bactériophage isolé à partir d'un sol agricole à Gembloux (Hock *et al.*, 2016). Il fait partie de la famille des *Myoviridae* et possède une activité lytique contre 74% des souches émétiques de *B. cereus* et *B. weihenstephanensis* (114/155) parmi lesquelles se trouvent BtB2-4, l'hôte préférentiel de Deep-Blue, mais également Cer057 et Cer074.

Deep-Blue possède une tête isocaédrique de 48 nm et une queue contractile d'une longueur de 129 nm (Fig. II.1). Son génome a une taille de 158 kb avec un taux en G-C de 39,95 % et est dépourvu de séquences codant pour des facteurs de virulence. De plus, Deep-Blue est lytique étant donné qu'il est exempt de gènes nécessaires à son intégration en tant que prophage et au maintien de la lysogénie. Son cycle dure moins de 1 h et mène à la libération d'environ 300 virions. Ces derniers resteront stables pendant plusieurs mois à 4°C. L'ensemble de ces critères fait de Deep-Blue un candidat prometteur pour son utilisation à des fins de biocontrôle.

3.2 Multiplication de phages

BtB2-4, l'hôte préférentiel de Deep-Blue est utilisé pour multiplier les phages de la manière suivante. Après incubation O/N, une culture de 10 ml de la bactérie cible est centrifugée durant 10 min à 4000 g et le culot est resuspendu dans 0,5 ml de LBi. 100 μ l de cette solution et 50 μ l d'une suspension stock de Deep-Blue sont ajoutés dans un Falcon contenant 10 ml de LBi. Le Falcon est ensuite incubé durant 5 h (jusqu'à ce que la solution devienne translucide) à 30°C dans un agitateur rotatif à 120 rpm (rotation par minute). La suspension est centrifugée pendant 5 min à 1000 g et filtrée à l'aide d'une membrane filtrante de 0,45 μ m de porosité afin qu'aucune bactérie ne subsiste. Le perméat est récupéré et le titre en phage déterminé (voir 3.3) puis la suspension obtenue est finalement stockée à 4°C.



Figure II.1 – Photo de Deep-Blue. Réalisée en microscopie électronique avec une coloration au phosphotungstate de potassium (L. Hock, non publié)

3.3 Détermination de la concentration en phage

La concentration en phages est déterminée par la technique de la double couche d'agar et de micro-gouttes. Cette méthode repose sur le principe que les phages sont capable de former des zones claires, des plaques, sur un tapis bactérien uniforme. Tout d'abord, une série de dilutions d'ordre 10 de la suspension phagique est préparée dans du liquide de Ringer. Parallèlement, 5 ml de top agar LB maintenu en surfusion à 45°C est contaminé à 2% par une culture de BtB2-4 et coulé sur une boîte de LB. Après 20 min à température ambiante, des gouttes de 10 μ l des différentes dilutions sont déposées sur le top agar solidifié et puis incubé O/N à 30°C. Durant l'incubation, un tapis de BtB2-4 se forme excepté là où des phages sont présents. En effet, chaque phage et sa progéniture mène à l'apparition d'une zone de lyse. Le titre de la suspension phagique, exprimée en PFU/ml (Plaque Forming Unit), est obtenu en multipliant le nombre de plages par le facteur de dilution décimale correspondant.

4 Biocontrôle

Les différentes expériences de biocontrôle visent à étudier la capacité de Deep-Blue à contrôler la croissance de plusieurs souches émétiques dans les aliments. Diverses matrices ont été contaminées avec BtB2-4, Cer057 et Cer074 puis traitées avec Deep-Blue à une MOI de 1000 (Multiplicity of infection) représentant le ratio phages/bactéries.

4.1 Préparation des suspensions bactériennes et phagiques

Les différentes suspensions bactériennes sont préparées via la méthode mise au point par l'ASBL REQUASUD. A l'aide d'un écouvillon, des colonies d'une culture fraîche sont suspendues dans un tube à essai contenant 10 ml de Ringer et la solution est homogénéisée. Le tube est ensuite placé dans un densitomètre pour en mesurer la turbidité. Des cellules sont ajoutées jusqu'à ce qu'une valeur de 2 McFarland (McF)

soit obtenue, soit une concentration en *B. cereus* équivalente à 2×10^7 CFU/ml. Les inocula sont ensuite dilués et utilisés pour contaminer les différentes matrices. Les phages sont également appliqués sous forme liquide en diluant la préparation stock de concentration connue dans du Ringer.

4.2 Matrices et conditions testées

Le potentiel de Deep-Blue comme agent de conservation a été testé dans quatre matrices, le LB, le lait, le riz et le riz-au-lait et ce à deux conditions d'incubation et de stockage différentes : 48 h à 20°C et 7 jours à 7°C.

4.2.1 LB

L'efficacité de Deep-Blue a tout d'abord été étudiée dans du LB liquide. Six Falcons stériles ont été remplis avec 20 ml de milieu et inoculés avec des suspensions de BtB2-4, Cer057 et Cer074 pour atteindre une concentration en chacune des trois bactéries de 10^3 CFU/ml. Les trois premières bouteilles ont servi de contrôle pour la croissance bactérienne. Les trois autres ont été traitées avec des phages avec à MOI de 1000, soit environ 3×10^6 PFU/ml. Les six bouteilles ont alors été incubées à 20°C ou à 7°C. Les concentrations en bactéries ont été déterminées après 0 et 48 h (20°C) ou après 0 et 7 jours (7°C). La teneur en phages a été évaluée au jour 0 pour vérifier la valeur de la MOI.

4.2.2 Lait

L'expérience a été réalisée ensuite dans du lait demi-écrémé (365, Delhaize). Elle a été effectuée de la même manière que pour le LB liquide à l'exception près qu'un Falcon supplémentaire a été rempli avec 20 ml de lait non contaminé. Ce dernier a servi de contrôle pour la microflore accompagnatrice.

4.2.3 Riz

Le riz a été cuit à l'autoclave (121°C, 15 min) afin d'éliminer la flore accompagnatrice potentiellement présente dans l'aliment. Il a alors été mélangé à l'aide d'un mixeur et dans un rapport de 50/50 avec le jus de cuisson amidonné. Le riz étant une matrice solide, cette étape a pour but de faciliter son homogénéisation qui est nécessaire pour garantir l'uniformité de l'inoculation par les phages ou les bactéries. 50 g ont ensuite été enlevés et ont servi de contrôle pour la flore externe. BtB2-4, Cer057 et Cer074 ont alors été ajoutés à raison de 10^3 CFU/g et le mélange a à nouveau été mixé. 3×50 g ont été prélevés et représentent le contrôle pour la croissance des *Bacillus*. Le riz restant a finalement été traité avec Deep-Blue à une concentration de 10^6 PFU/g et 150 g ont été répartis dans trois flacons. Les échantillons ont alors été incubés soit à 20°C soit à 7°C. Afin d'évaluer les différentes concentrations en phages et bactéries, 10 g de chaque échantillon ont été mélangés à 90 ml de Ringer. Le tout a été homogénéisé durant 30 sec au stomacher dont le but est de mimer les mouvements de l'estomac et d'assurer une récupération optimale des cellules contenues au sein de la matrice alimentaire.

4.2.4 Riz au lait : surface

Contrairement aux autres matrices, le potentiel de Deep-Blue à contrôler les différentes souches émétiques a été évalué à la surface du riz au lait (Boni, Colruyt). Une charge totale de 10^3 bactéries et de 10^6 de phages a été appliquée à la surface de la matrice. Chaque pot a ensuite été déposé dans un environnement stérile, soit un berlin de 1L recouvert d'aluminium et préalablement autoclavé durant 15 min à 121°C (Fig. II.2), et incubé à 7°C ou 20°C . Les concentrations finales en bactéries ont été évaluées de la même manière que pour le riz en prenant soin d'échantillonner 10 g uniformément sur la surface. On considère que tous les phages et toutes les bactéries sont présent(e)s dans l'échantillon étant donné que les solutions ne s'infiltrèrent pas dans la matrice. Les quantités initiales en phages et en bactéries sont évaluées sur base des concentrations respectives des différents inocula.



Figure II.2 – Dispositif mis en place pour incuber le riz au lait dans un environnement stérile.

5 Biofilms

Le potentiel de Deep-Blue comme bio-désinfectant contre des biofilms a été étudié dans différentes expériences. Deux types de traitement, un traitement curatif et un traitement préventif, ont été appliqués sur des biofilms formés soit uniquement de BtB2-4, soit composés des trois différentes souches.

5.1 Dispositif expérimental

Les différents biofilms bactériens ont été obtenus à l'aide du système mis au point par Vanzielegheem *et al.* (2015). Ce système permet d'étudier l'adhésion bactérienne et la formation subséquente d'un biofilm sur une lamelle de verre insérée dans une cellule à flux. Le dispositif expérimental est représenté à la Fig. II.3.

Le montage consiste en quatre bouteilles : trois pour l'injection des différentes solutions (PBS, suspension bactérienne et préparation phagique) et une destinée à récolter les déchets. Les différentes bouteilles sont connectées aux cellules à flux à l'aide de tuyaux et de connecteurs de type droit ou en Y. Le système totalement assemblé est autoclavé à 121°C pendant 15 min et puis placé dans une étuve à 55°C jusqu'à ce qu'il soit entièrement sec.

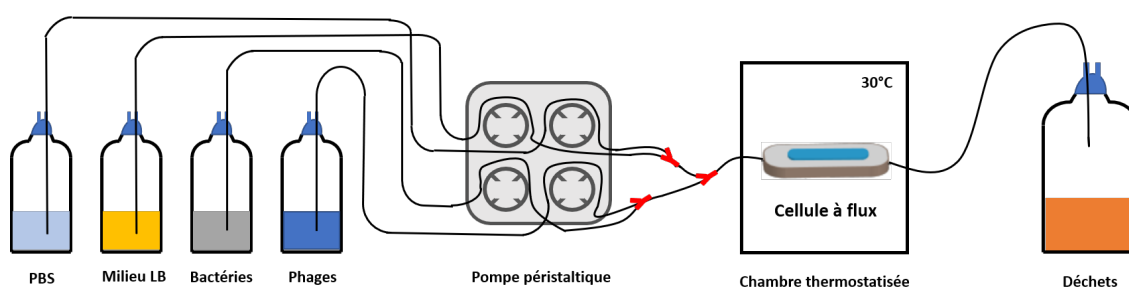


Figure II.3 – Représentation du dispositif expérimental utilisé pour la formation de biofilms. La cellule à flux, placée dans une chambre thermostatée à 30°C, est reliée aux différentes bouteilles par des tuyaux. Les solutions contenues dans ces dernières sont distribuées dans le système à l'aide d'une pompe péristaltique. L'ordre dans lequel les liquides sont injectés dépend du traitement étudié (Adapté de C. Nannan).

Les cellules à flux sont ensuite placées dans une chambre thermostatique fermée et maintenue à une température de 30°C durant toute la durée de l'expérience. Une pompe péristaltique permet le passage des différentes solutions à travers tout le système. Cette dernière est réglée sur 1,85 rpm ce qui correspond à un débit de 0,5 ml/min.

Dans un premier temps, les différents tuyaux et les cellules à flux ont été remplis avec du PBS. Cette étape a pour but d'expulser l'air du système et ainsi d'assurer qu'aucune bulle, susceptible d'impacter sur la formation du biofilm, ne persiste. L'ordre dans lequel les autres solutions ont ensuite été injectées dans les cellules à flux va dépendre du traitement appliqué. Trois cellules à flux ont été utilisées en parallèle dans cette expérience. La première a servi de contrôle tandis que la deuxième et la troisième ont été utilisées pour tester le potentiel de Deep-Blue respectivement comme agent préventif et curatif pour le traitement des biofilms.

5.2 Cellule contrôle : Pas de traitement

La cellule contrôle sert à quantifier et observer un biofilm en l'absence de traitement par les phages. Une suspension bactérienne a été préparée via la méthode REQUASUD et diluée dans du Ringer pour obtenir une concentration finale de 10^5 CFU/ml puis injectée durant 20 min dans le cellule à flux. Le milieu de culture a ensuite été ajouté en continu pendant 24 h pour permettre aux bactéries ayant adhéré à la surface de former un biofilm.

5.3 Cellule test 1 : Traitement préventif

Ce traitement consiste à étudier le potentiel de Deep-Blue à prévenir la formation d'un biofilm sur la lame de verre. Pour ce faire, une solution phagique d'une concentration de 10^7 , obtenue par dilution d'une préparation stock (10^9 PFU/ml), a été injectée dans la cellule à flux durant 20 min avant l'ajout de la suspension bactérienne. Le milieu a ensuite circulé pendant 24 h à l'instar de la cellule contrôle.

5.4 Cellule test 2 : Traitement curatif

Le traitement curatif consiste en l'évaluation de la capacité de Deep-Blue à éliminer un biofilm mature. A cet égard, la même suspension bactérienne que celle utilisée pour le contrôle a été ajoutée pendant 20 min. Après 20 h de circulation du milieu de culture, les phages ont finalement été ajoutés sur le biofilm en formation à une concentration de 10^7 PFU/ml et ce durant les quatre dernières heures d'expérience.

5.5 Détermination de la concentration en bactéries

A la fin de l'expérience, les lames de verres ont été récupérées et vortexées durant 2 min dans un falcon contenant 40 ml de liquide de Ringer. Plusieurs dilutions ont alors été effectuées et étalées sur boîte de Pétri afin d'évaluer la concentration en bactéries par la méthode de dénombrement des colonies.

Chaque expérience a été effectuée en triplicat d'abord sur des biofilms composés uniquement de BtB2-4 puis formés à partir de BtB2-4, Cer057 et Cer074. Dans un premier temps, du LB liquide dilué $2\times$ a été utilisé comme milieu de culture. Ensuite, l'ensemble des expériences a été réitéré en remplaçant ce dernier par du lait demi-écrémé UHT (Delhaize).

6 Isolation d'un nouveau *Myoviridae*

Le but de cette expérience est d'isoler dans l'environnement un phage appartenant à la famille des *Myoviridae* et infectant les souches émétiques du groupe *B. cereus*. L'objectif à long terme étant de mettre au point un cocktail composé de plusieurs phages.

6.1 Conception des amorces

La séquence complète du génome de Deep-Blue a été insérée dans le logiciel de recherche BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Ce programme compare la séquence à celles des bases de données et recherche les séquences les plus similaires. Six phages ont ainsi été sélectionnés sur base de leur pourcentage d'identité avec Deep-Blue (Tableau II.7). Tous sont des phages de *Bacillus* et appartiennent à la famille des *Myoviridae*. Les séquences des sept phages ont ensuite été alignées à l'aide du programme MEGA 7 dans le but de trouver des séquences conservées parmi ces phages et de concevoir des amorces.

Les amorces créées, appelés MYOAF et MYOAR, amplifient un fragment de 462 pb de l'ADN de Deep-Blue situé entre les bases 8017 et 8479 (Tableau II.8).

Tableau II.7 – *Myoviridae* les plus semblables à Deep-Blue au niveau génomique sélectionnés par BLAST. Tous sont des phages de *Bacillus* et la E-value obtenue pour chacun est égale à 0.

Bacillus phage	Query cover %	Identity %	Accession
Deep-Blue	100	100	KU577463
BM10	85	83	KT995480
PK16	82	85	KX495186
Bcp1	78	89	KJ451625
Bc431v3	80	89	JX094431
JBP901	85	83	KJ676859
BCP8-2	80	90	KJ081346

Tableau II.8 – Séquences oligonucléotidiques des amorces conçues pour la recherche de *Myoviridae* de *Bacillus*

Nom	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon chez Deep-Blue
MYOAF	TGCATTTGGGCAGACTTATC	57	462
MYOAR	ATTCTGAATCTTGCGACAAA		

6.2 Échantillonnage et isolement

Divers échantillons ont été prélevés dans l'environnement. Les échantillons solides ont été homogénéisés dans de l'eau stérile et chacun des prélèvements est réparti dans quatre Falcons et dilué deux fois dans du LBi. Chaque Falcon a ensuite été contaminé avec une combinaison de cinq souches émétiques et incubés O/N sous agitation de 120 rpm à 30°C. Cette étape a pour but de permettre la multiplication des phages potentiellement présents et spécifiques aux souches ajoutées. Celles-ci sont reprises au Tableau II.9. Après incubation, les échantillons sont centrifugés à 1000 g durant 10 min et le surnageant est filtré sur 0,45 μ m.

La présence de phages dans chaque échantillon a ensuite été évaluée via la méthode de la double couche d'agar et des micro-gouttes. 10 μ l du surnageant de chacun des Falcons incubés avec une bactérie cible ont été ajoutés sur le tapis bactérien correspondant et les boîtes observées après incubation O/N à 30°C. Les plaques de lyse, éventuellement présentes, sont piquées à l'aide d'un tips et resuspendues dans de l'eau stérile. Une PCR est finalement réalisée à l'aide des amorces conçues (voir Tableau II.8), l'ADN de Deep-Blue faisant office de contrôle positif, pour déterminer si la plaque est le fruit d'un *Myoviridae*.

Tableau II.9 – Souches émétiques de *B. cereus* utilisées dans le cadre de l'isolement de phages.

Souches	Origine	Souches	Origine
LH002	Sol agricole	E55C02	Plat de riz-viande-haricot
MC118	Sol	E57C01	Composte
Cer039/ISP1930	Riz	5975a	Vomit
TIAC181	Poissons et pâtisseries	2269	Riz
5958b	Salade de pâtes	A1	Miel
I7-1	Crème glacée	B1	Concentré d'oranges
I20-4	Crème glacée	F	Miel
5971a	Lait chocolaté	5964c	Pâtes cuites
5975c	Vomit	5965a	Salade de pâtes
5972b	Lait demi-écrémé	5975b	Vomit

7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du programme JMP PRO 12.2 et consistent en des tests de Student avec un niveau de confiance de 5% .

Chapitre III

Résultats et discussion

Il a été démontré, dans un précédent travail, que le bactériophage Deep-Blue possédait les caractéristiques requises pour son utilisation en tant qu'agent de bio-contrôle contre BtB2-4, une souche émétique psychrotolérante du groupe *B. cereus* (Leprince, 2017). Cependant, dans certains cas, un cocktail de souches émétiques peut être à l'origine d'une intoxication alimentaire (Dierick *et al.*, 2005). Ce travail se focalise donc sur le potentiel de Deep-Blue à contrôler simultanément la croissance de trois souches émétiques psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* : BtB2-4, Cer074 et Cer057. L'efficacité de Deep-Blue a été évaluée à deux niveaux de la filière agro-alimentaire. Dans un premier temps, l'activité lytique du phage a été testée dans diverses denrées alimentaires afin d'évaluer sa capacité à assurer leur innocuité. Dans un second temps, le potentiel de Deep-Blue comme agent de bio-désinfection contre les biofilms pouvant se former à la surface des installations industrielles a été étudié. Enfin, dans le but d'agir sur une gamme d'hôtes plus élargie et parce que l'utilisation d'un seul phage peut mener à l'émergence de souches résistantes, la dernière partie de ce mémoire a eu pour objectif d'isoler dans l'environnement un *Myoviridae* ayant un spectre d'hôtes complémentaire à Deep-Blue dans le but de concevoir un cocktail phagique.

1 Biocontrôle

La première partie de ce travail vise à évaluer l'efficacité de Deep-Blue à contrôler la croissance de souches émétiques de *B. cereus* dans les aliments afin d'assurer leur innocuité et d'augmenter leur durée de conservation. Quatre matrices différentes (milieu LB, lait, riz et riz au lait) ont été contaminées simultanément avec BtB2-4, Cer057 et Cer074 à raison de 10^3 CFU/ml ou g et traités avec Deep-Blue à une MOI de 1000.

Tout au long des expériences de biocontrôle, deux températures d'incubation ont été testées : (i) 7°C, température probable d'un réfrigérateur mal réglé et à laquelle les souches de *B. weihenstephanensis* sont capables de se multiplier et de produire la toxine émétique, (ii) 20°C, soit la température à laquelle un plat est exposé lorsqu'il est conservé à l'air ambiant. Ces conditions reflètent les mauvaises habitudes des consommateurs concernant la conservation des aliments.

1.1 LB

Le potentiel de Deep-Blue à contrôler BtB2-4, Cer057 et Cer074 a tout d'abord été évalué dans 20 ml de LB dans un incubateur sans agitation. Les concentrations en bactéries ont été déterminées par dénombrement des colonies sur boîte de Pétri et les différents résultats sont exprimés en unités logarithmiques (log), une réduction d'un log correspondant à une élimination de 90% des phages ou bactéries. Notons qu'afin de pouvoir différencier les trois souches lors des expériences de biocontrôle, nous avons utilisé des mutants résistants à différents antibiotiques.

Incubation à 7°C

La capacité de Deep-Blue à inhiber la croissance de *B. cereus* à 7°C dans le milieu LB est représentée à la Fig. III.1a. Le traitement a engendré des réductions significatives de 4,6 log, 1,5 log et 3,2 log CFU/ml respectivement pour BtB2-4, Cer074 et Cer057 par rapport aux contrôles. De plus, malgré des taux de croissance très différents observés dans les contrôles (une moyenne de 6,4 log CFU/ml pour BtB2-4 contre 3,1 pour Cer074), les concentrations finales en chacune des bactéries sont similaires (de l'ordre de 1,6 à 1,8 log CFU/ml) et inférieures au seuil initial de contamination.

Il est à noter que la concentration en Cer074 dans le groupe contrôle n'est pas significativement différente du taux initial, ce qui suggère que la bactérie n'a pas été en mesure de croître dans le milieu après sept jours à cette température. La souche a alors été incubée seule pour vérifier la présence potentielle de compétition avec Cer057 et BtB2-4 mais des résultats similaires ont été obtenus. L'expérience a ensuite été répétée avec la souche non mutante et des concentrations supérieures de près de 2 log ont été obtenues. Il est possible que le mutant utilisé ait été affecté pour sa croissance à 7°C. Cependant, la croissance de cette bactérie n'a pas été impactée à cette même température dans les autres matrices (Fig. III.1c,e,g).

Incubation à 20°C

La Fig. III.1b représente les résultats obtenus après 48 h d'incubation à 20°C du LB contaminé. Deep-Blue s'est également montré très efficace sur cette matrice. En effet, des réductions comprises entre 4 et 4,7 log ont été obtenues pour les trois souches par rapport au groupe contrôle. Dans la plupart des cas, on observe que le traitement a été en mesure de réduire significativement la concentration en bactéries en deçà de la charge initiale sauf pour BtB2-4, probablement à cause de sa croissance plus importante. BtB2-4 atteint en effet une concentration de 7,4 log CFU/ml dans le contrôle soit 1,5 log plus élevé que Cer057 et Cer074.

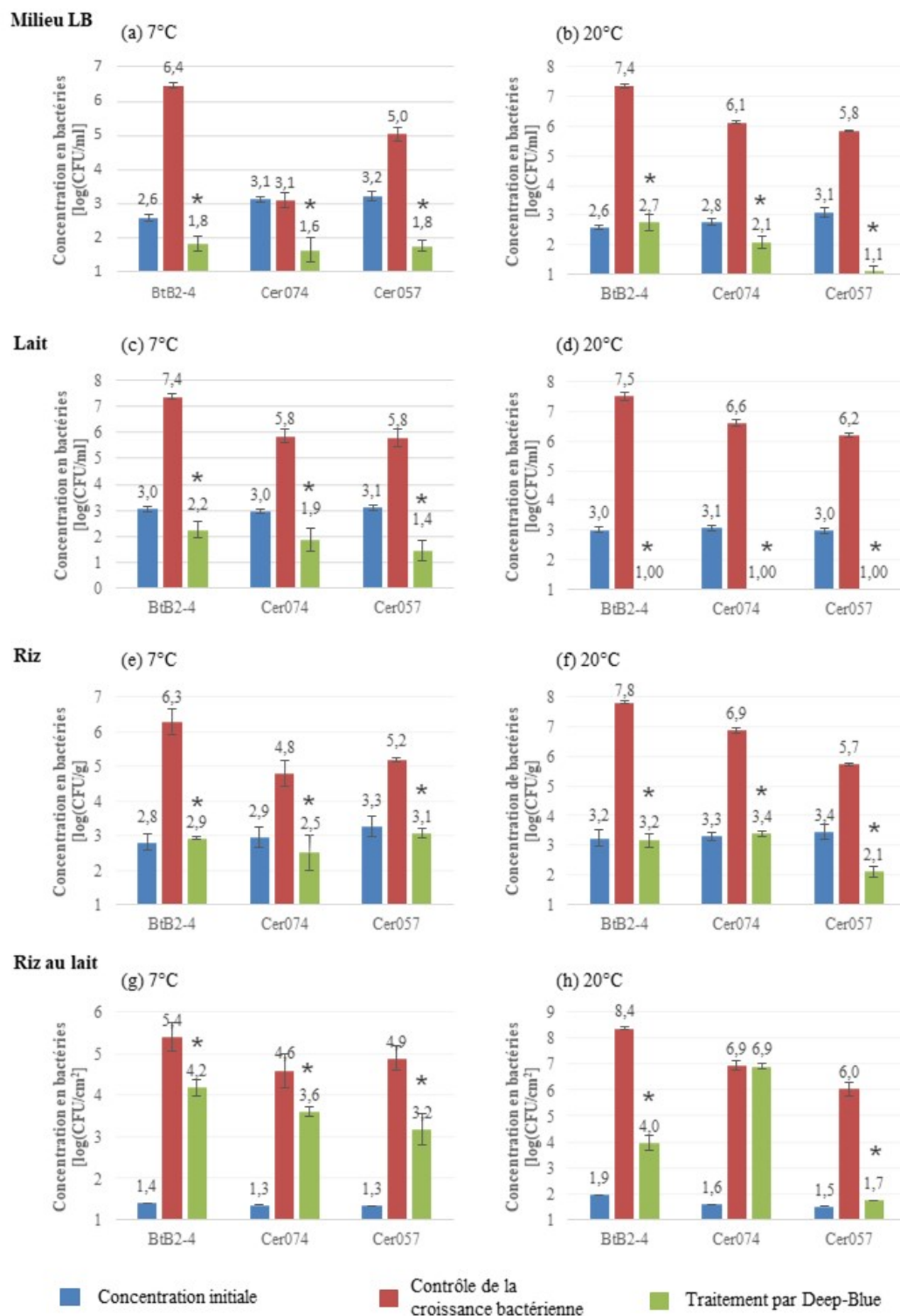


Figure III.1 – Potentiel de Deep-Blue à contrôler la croissance de BtB2-4, Cer074 et Cer057 à 7°C et 20°C dans du LB, du lait, du riz et à la surface du riz au lait. La concentration en bactérie est quantifiée sur une échelle logarithmique à partir de la limite de détection (1 log CFU/ml, g ou cm²). Une diminution significative par rapport à la concentration obtenue dans le contrôle (après 48 h à 20°C ou 7 jours à 7°) selon le test de Student ($p < 0.05$) est indiquée par une étoile. Les moyennes avec écarts-types sont obtenues sur base des résultats de trois tests.

1.2 Lait

Le potentiel de Deep-Blue a ensuite été testé dans du lait UHT. Bien qu'aucun cas d'intoxication émétique lié à l'ingestion de lait contaminé par *B. cereus* n'ait été rapporté, cette bactérie est un contaminant fréquent des industries laitières et une des principales causes microbiennes d'altération du lait (Kumari et Sarkar, 2016). Le problème est d'autant plus important que les souches psychrotolérantes de *B. weihenstephanensis* sont susceptibles de croître aux températures habituelles de stockage et de conservation du lait. Par ailleurs, le potentiel de production de la toxine émétique dans cette matrice est particulièrement élevé (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b). La démarche expérimentale pour cette matrice est similaire à celle utilisée pour le LB hormis que dans ce cas ci, la présence potentielle de flore accompagnatrice a également été investiguée.

Incubation à 7°C

La Fig. III.1c montre les résultats obtenus après 7 jours de stockage à 7°C du lait contaminé par les différentes souches et traité par Deep-Blue. Des diminutions significatives de 3,9 à 5,2 log CFU/ml en fonction de la souche ont pu être observées par rapport au groupe contrôle. Pour chacune des souches, non seulement le traitement a induit une réduction du nombre de cellules viables mais la charge finale obtenue est aussi significativement plus faible que la concentration initiale.

Incubation à 20°C

Comme le montre la Fig. III.1d, Deep-Blue s'est montré très efficace dans le lait à 20°C. En effet, son application a réduit la charge en *B. cereus* à des niveaux indétectables après 48 h de traitement. Cela signifie que le nombre de cellules vivantes pour chacune des souches est inférieur à la limite de détection, soit à 10 CFU/ml. Les populations de BtB2-4, Cer057 et Cer074 se sont vues diminuées de 5,2 à 6,5 log CFU/ml.

La concentration en flore accompagnatrice à la fin du traitement aussi bien à 7°C qu'à 20°C était également inférieure à la limite de détection.

1.3 Riz

Le riz a ensuite été choisi comme matrice alimentaire car c'est l'un des aliments le plus souvent associé aux intoxications émétiques (environ 95% des cas) (Altayar et Sutherland, 2006). Deux études de prévalence ont révélé la présence de *B. cereus* respectivement dans 37,5% et 56% des plats de riz frit servis dans des restaurants asiatiques (Chang *et al.*, 2011; Perera et Ranasinghe, 2012). En effet, le riz y est stocké à température ambiante ce qui permet aux spores ayant résisté à la cuisson de germer et de proliférer. Par ailleurs, le riz favorise la production de céréulide en raison de son contenu riche en amidon (Rajkovic *et al.*, 2006).

Le riz est une matrice solide et bien plus complexe que le LB ou le lait. Il a dès lors été mélangé avec son jus de cuisson et homogénéisé brièvement au mixeur de manière à obtenir une matrice semi-solide dans laquelle le phage peut se mouvoir plus aisément et à garantir l'uniformité de la contamination. Au préalable, le riz a été cuit à l'autoclave afin d'éliminer la flore accompagnatrice dont la croissance à tout de même été contrôlée tout comme pour le lait.

Incubation à 7°C

L'efficacité de Deep-Blue dans le riz à 7°C est illustrée à la Fig. III.1e. Le phage a eu une activité lytique performante sur les cellules de BtB2-4 et a atténué sa charge microbienne de 3,4 log CFU/g. Des réductions moindres mais tout autant significatives ont été observées pour Cer057 et Cer074 (2,3 et 2,1 ordres de grandeur respectivement). Cependant, le traitement n'a pas été en mesure de réduire significativement la charge en bactérie en dessous de la valeur de contamination initiale. Il a néanmoins pu la maintenir à des concentrations équivalentes, soit environ 10^3 CFU/g pour chacune des souches.

Incubation à 20°C

La Fig. III.1f montre les résultats obtenus après 48 h de stockage du riz à une température de 20°C. La diminution la plus importante est une fois de plus accordée à BtB2-4 avec une différence significative de 4,6 log CFU/g par rapport au groupe contrôle. Deep-Blue s'est également montré efficace sur les deux autres souches pour lesquelles le nombre en cellules viables a été atténué d'environ 3,5-3,6 ordres de grandeur. Par ailleurs, la population de Cer057 s'est vue réduite à des concentrations inférieures au seuil initial de contamination.

Tout comme pour le lait, aucune présence de flore externe n'a pu être détectée à 7°C. Cependant, sa concentration s'élevait à environ 3 log CFU/g après 48 h d'incubation à température ambiante.

1.4 Riz au lait : contamination et traitement en surface

L'objectif de cette dernière expérience de biocontrôle est de simuler un cas où la bactérie n'est pas présente initialement dans la matrice mais issue de contamination croisée. En d'autres termes, il s'agit d'évaluer le potentiel de Deep-Blue à diminuer la contamination d'un aliment par *B. cereus* lorsque le phage est appliqué à sa surface. Le choix s'est porté sur une matrice semi-solide, un riz au lait d'une surface relativement lisse et homogène dont la nature gélatineuse empêche l'inoculum de s'y infiltrer. Une charge totale de 10^3 bactéries et 10^6 phages a été dispersée à la surface du pot de riz au lait qui a ensuite été placé dans un environnement stérile pour minimiser le risque de contamination croisée et incubé aux deux températures.

Incubation à 7°C

La Fig. III.1g montre l'efficacité de Deep-Blue à contrôler la colonisation de la surface du riz au lait par les différentes souches à 7°C. Bien que les nombres en chacune des souches soient 2 à 3 log plus élevés que leurs concentrations initiales respectives, le traitement a permis de diminuer significativement de 1,2 log, 1 log et 1,7 log les concentrations respectives en BtB2-4, Cer074 et Cer057 par rapport au contrôle.

Incubation à 20°C

Deep-Blue a pu contrôler efficacement la croissance de BtB2-4 et de Cer057 à la surface du riz. En effet, après 48 h à 20°C, les deux souches ont atteint des concentrations inférieures de 4,3 log par rapport à celles obtenues dans le contrôle. Par ailleurs, la concentration surfacique en Cer057 est pratiquement similaire au taux initial (1,7 log CFU/cm²), ce qui n'est pas le cas de BtB2-4 dont la croissance a été plus importante et qui se retrouve donc à un taux plus élevé (4 log CFU/cm²). Cependant, le traitement n'a visiblement eu aucun effet sur Cer074 pour lequel aucune différence statistique avec le contrôle n'a été observée. En effet, la bactérie a atteint une concentration de 6,9 log CFU/cm² aussi bien avec que sans la présence de phages (Fig. III.1h).

A la fin du traitement, la flore accompagnatrice colonisait la surface à raison de 10² CFU/cm² à 7°C et était supérieure à 10⁵ CFU/cm² à 20°C.

1.5 Synthèse des expériences de biocontrôle

Le Tableau III.1 synthétise l'effet de Deep-Blue sur chaque souche dans les différentes matrices et aux deux températures d'incubation. Les résultats sont exprimés en réduction logarithmique par rapport aux concentrations obtenues après 48 h ou 7 jours dans les échantillons non traités.

Tableau III.1 – Tableau récapitulatif des différentes réductions obtenues après traitement par Deep-Blue à une MOI de 1000. RL signifie réduction logarithmique. Les couleurs représentent la situation de la concentration obtenue après traitement par rapport au seuil de contamination initial. **Vert** : significativement plus faible. **Orange** : aucune différence significative. **Rouge** : significativement plus élevé.

	Température [°C]	RL[log (CFU/ml, g ou cm ²)]		
		BtB2-4	Cer074	Cer057
LB	7	4.6	1.5	3.2
	20	4.7	4.0	4.7
Lait	7	5.2	3.7	4.4
	20	6.5	5.6	5.2
Riz	7	3.4	2.3	2.1
	20	4.6	3.5	3.6
Riz au lait	7	1.2	1	1.7
	20	4.4	-	4.3

1.5.1 Efficacité d'un phage dans une matrice liquide

Deep-Blue s'est montré efficace dans le lait sur les trois souches de *B. weihenstephanensis* et ce aussi bien à 7°C qu'à 20°C. En effet, aux deux températures, le traitement a pu réduire la charge en bactéries sous le seuil de contamination initial de 10^3 CFU/ml, seuil qui correspond à la limite d'acceptabilité d'un aliment et qui est inférieur à la dose minimale impliquée dans des cas d'intoxication émétique (généralement 10^5 - 10^7 (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b)). Malgré la nature plus complexe du lait, les réductions obtenues sont, de manière générale, similaires à celles observées pour le milieu LB et s'avèrent même supérieures à 20°C. Cette efficacité est certainement liée à la nature liquide des deux matrices. En effet, les phages sont des entités biologiques non mobiles et le seul moyen pour eux de se mouvoir, et donc d'atteindre leur cible, est par diffusion dans leur milieu environnant ce qui est grandement facilité en conditions liquides.

1.5.2 Difficultés liées aux matrices solides

Dans le riz, Deep-Blue a pu empêcher la croissance de chacune des souches aux deux températures d'incubation. Cependant, les niveaux de réduction obtenus sont inférieurs de 1 à 2 ordres de grandeur à ceux observés dans le lait et LB et le traitement n'a pas été en mesure de diminuer la charge en *B. weihenstephanensis* sous le seuil de contamination. Cette baisse d'efficacité est vraisemblablement liée à la nature semi-solide de la matrice testée dans laquelle l'accessibilité aux bactéries est réduite. En effet, dans ce type de matrice alimentaire, l'interaction initiale phages/bactéries peut être entravée par un certain nombre de barrières. En plus d'impacter négativement sur la diffusion du phage, la présence de certains composés dans la matrice tels que les protéines, les lipides ou encore l'amidon peut diminuer le potentiel d'un phage à interagir avec sa cible (Greer, 2005). D'une part, ces composés peuvent protéger la bactérie et masquer les récepteurs phagiques, et d'autre part, les phages peuvent être immobilisés par adsorption dans la matrice et ainsi devenir inactifs (incapables d'infecter la bactérie hôte). Afin de favoriser la rencontre phage/bactérie, les échantillons auraient pu être homogénéisés régulièrement au fil de l'expérience mais cela aurait été à l'encontre des conditions réelles de stockage des aliments.

Certes, au vu des résultats, Deep-Blue s'est montré efficace dans le riz semi-solide. Cependant si le phage avait été appliqué sur cette matrice sans qu'une étape de dilution n'ait lieu, l'impact des différents facteurs mentionnés plus haut aurait probablement été exacerbé et la réduction induite par le traitement inéluctablement moins conséquente.

L'application de Deep-Blue à la surface du riz au lait a permis de contrôler la croissance bactérienne mais pas de diminuer la concentration en *B. weihenstephanensis* en dessous du seuil de contamination initial. De la même manière que dans le riz, il est probable que les phages n'aient pas pu se mouvoir de manière optimale à la surface du riz au lait, où l'activité libre de l'eau est relativement faible, et aient donc été incapables d'atteindre leur cible. Par ailleurs, la présence d'une flore annexe en forte concentration dans la matrice traitée peut également interférer avec l'action du

phage (Greer, 2005). En effet, une étude a prouvé que le biocontrôle par les phages était plus efficace pour contrôler la croissance de *S. aureus* dans du lait UHT que dans du lait cru (García *et al.*, 2009). Or malgré les précautions prises, la flore externe à la surface du riz au lait était particulièrement élevée à la fin du traitement, surtout à 20°C (10^5 CFU/cm²), ce qui a pu impacter sur l'efficacité de Deep-Blue.

Afin d'améliorer l'efficacité du biocontrôle, deux solutions sont envisagées. La première consiste à appliquer une concentration plus élevée de phages dans la matrice. La seconde repose sur l'optimisation de la méthode d'application de Deep-Blue.

Choix de la MOI

Afin d'optimiser les chances de rencontre avec la bactérie et réduire significativement la contamination dans des matrices solides, les phages devraient être appliqués à une MOI plus élevée (Hagens et Loessner, 2010). Les phages ne tireraient alors plus profit de leurs capacités à se répliquer et à s'auto-propager et agiraient de manière passive. Cette activité passive des phages est connue sous le nom de "lysis from without" au cours de laquelle l'adsorption et l'adhésion d'un nombre élevé de particules phagiques à la surface d'une bactérie résulte en la lyse de la cellule sans que le phage ne passe par un cycle de réplication (Carvalho *et al.*, 2012). Une MOI plus élevée permettrait donc d'augmenter les probabilités que chaque bactérie soit directement infectée par un phage. Cela conduirait à la lyse de toutes les bactéries sans nécessité que les phages ne "diffusent" au travers de la matrice pour atteindre de nouvelles cibles.

Mode d'application des phages

Le mode d'application de Deep-Blue dans le cadre de ce travail n'est probablement pas adéquat pour une matrice telle que le riz qui est difficile à traiter de manière régulière. Une méthode plus appropriée de traitement serait de pulvériser la suspension afin que les particules phagiques soient dispersées plus uniformément à la surface des différents grains de riz. Sharma *et al.* (2009) ont pulvérisé le produit EcoShieldTM (Intralytix, Inc) à la surface de laitue contaminée. Après seulement quelques heures, la population d'*E. coli* s'est vue diminuée de 1,9 log CFU/cm². La matrice pourrait également être immergée dans une solution contenant le phage. En effet, une réduction de 2 log CFU/cm² a été obtenue suite à l'immersion d'une salade durant 2 min dans une solution d'EcoShieldTM (Intralytix, Inc) à 10^8 PFU/ml (Ferguson *et al.*, 2013). Pour cette deuxième méthode, le temps d'immersion a dû être optimisé afin d'obtenir une réduction significative.

1.5.3 Efficacité de Deep-Blue sur les différentes souches testées

D'une manière générale, BtB2-4 a tendance à atteindre des concentrations plus élevées dans le groupe contrôle (taux de croissance plus élevé). Cependant, Deep-Blue s'est montré généralement plus efficace en terme de réduction logarithmique sur cette bactérie que sur Cer074 et Cer057. Cette constatation paraît logique étant donné que BtB2-4 est considéré comme l'hôte préférentiel de Deep-Blue. Au contraire, Cer057

semble avoir un taux de croissance plus faible notamment à 20°C où, indépendamment de la matrice, elle se retrouve à des concentrations inférieures à BtB2-4 de près de 2 ordres de grandeur. Néanmoins, Deep-Blue est également efficace sur cette *B. weihenstephanensis* qui se trouve être, dans la plupart des cas, la moins abondante dans la matrice à la fin du traitement. Enfin, il semblerait que l'activité lytique du phage soit moins performante sur Cer074. En effet, les réductions obtenues suite au traitement sont généralement moindres pour cette bactérie et dans certains cas non significatives.

Résistance bactérienne aux phages

Le principal désavantage lié à l'utilisation de phages est, de manière similaire aux antibiotiques, le risque de favoriser l'émergence de souches résistantes ce qui pourrait impacter sur leur efficacité. Les bactéries peuvent en effet mettre au point diverses stratégies afin de résister à l'infection par les phages. Celles-ci visent principalement une des étapes cruciales du cycle du phage (Labrie *et al.*, 2010). La première ligne de défense des bactéries est d'empêcher l'étape initiale d'absorption. Pour ce faire, elles peuvent modifier la structure des récepteurs phagiques présents à leur surface, réduire leur nombre ou encore les dissimuler à l'aide de polymères extracellulaires (Pires *et al.*, 2017). Cependant, la plupart des mécanismes interviennent une fois le génome du phage intégré dans la bactérie. Par exemple, la majorité des bactéries possède des systèmes de restriction-modification dont la fonction principale est de cliver tout ADN étranger à la bactérie à l'aide d'endonucléases. L'ADN peut également être la cible d'un autre mécanisme de défense, le CRISPR-Cas. Ce système, récemment découvert, confère aux bactéries une forme d'immunité acquise contre certains phages (Hyman et Abedon, 2010). Enfin, toute mutation affectant un gène essentiel au cycle de reproduction du phage est susceptible de rendre une bactérie résistante (Chatain-Ly, 2014). La baisse d'efficacité de Deep-Blue envers Cer074 pourrait s'expliquer par des fréquences d'apparition de souches résistantes plus élevées au sein de cette population bactérienne que pour BtB2-4 et Cer057.

Néanmoins cette résistance possible aux phages est moins problématique que pour les antibiotiques. En effet, les phages peuvent à leur tour, par mutation, recouvrer leur efficacité vis-à-vis de la bactérie cible. Par ailleurs, la fréquence d'apparition de souches résistantes aux bactériophages serait dix fois moindre que pour les antibiotiques (Chatain-Ly, 2014).

1.5.4 Influence de la température

Lorsqu'une bactérie se trouve exposée à des conditions défavorables (température élevée ou basse, déficience en nutriments, etc.) elle peut changer d'état physiologique ce qui a pour conséquence de la rendre moins susceptible à l'infection par les phages (Fister *et al.*, 2016). En effet, quand les phages s'attaquent à des bactéries en phase stationnaire de croissance, la période de latence est plus étendue et le nombre de virions relâchés moindre. Les températures de réfrigération peuvent être stressantes pour les bactéries qui vont dès lors ralentir leur métabolisme (Fister *et al.*, 2016). Ce changement de statut physiologique peut expliquer pourquoi à 7°C, les diminutions

obtenues sont généralement plus faibles qu'à 20°C. Cependant, les souches testées sont psychrotrophes et peuvent donc croître à cette température d'où le fait que Deep-Blue a tout de même été en mesure de réduire leur concentration dans la plupart des matrices. En comparaison, les phages e11/2, pp01, et e4/1c se sont montrés actifs contre *E. coli* à des températures optimales de croissance (30 et 37°C) alors qu'à 12°C, température à laquelle la bactérie ne prolifère pas, les cellules n'ont pas pu être lysées (O'flynn *et al.*, 2004).

2 Biofilms

Naturellement, la plupart des espèces microbiennes ne vivent pas individuellement en suspension mais sont regroupées au sein de biofilms. Les biofilms sont des communautés complexes de micro-organismes, adhérents entre eux et à une surface, et englobés dans une matrice extracellulaire polymérique. Ce mode de vie pose de nombreux problèmes dans les industries alimentaires où non seulement les biofilms sont impliqués dans la détérioration des installations mais constituent surtout une source récurrente de contamination des aliments par des bactéries pathogènes et de détérioration. En effet, la matrice confère aux micro-organismes retenus au sein du biofilm une résistance accrue aux opérations de nettoyage et de désinfection conventionnelles. La nécessité de développer des moyens de lutte plus efficaces contre ces structures complexes a entraîné un intérêt grandissant pour l'utilisation des phages comme stratégie de contrôle. Dans cette optique, le potentiel de Deep-Blue, aussi bien à prévenir la formation de biofilms par des souches émétiques de *B. cereus* qu'à les éliminer, a été étudié.

Les biofilms ont été formés dans des conditions bien définies et examinés en temps réel à l'aide d'un système de cellules à flux. Une suspension bactérienne, composée de BtB2-4 seul ou des trois souches de *B. weihenstephanensis*, a été injectée dans le système avant qu'un milieu de culture soit ajouté en continu pendant 24 h pour permettre aux bactéries ayant adhéré à la surface de la lamelle en verre de former un biofilm. Deux traitements ont été testés. Dans le premier, une suspension de Deep-Blue d'une concentration de 10^7 PFU/ml a été ajoutée dans le système avant l'injection de bactéries dans le but de prévenir la formation de biofilm. Le second traitement a consisté quant à lui en l'application de Deep-Blue (10^7 PFU/ml) durant les quatre dernières heures de l'expérience afin d'évaluer la capacité des phages à éliminer un biofilm de 20 h. Les concentrations respectives en bactéries sur les lames de verre ont finalement été évaluées.

L'expérience a, dans un premier temps, été réalisée en utilisant un milieu optimal pour la croissance des bactéries, le LB. Dans le souci de se rapprocher des conditions rencontrées en industrie, l'ensemble des expériences a ensuite été réitéré avec du lait. En effet, les spores de *B. cereus*, après avoir survécu à la pasteurisation, adhèrent à la surface en acier inoxydable des tanks et des canalisations où elles peuvent germer et se multiplier si bien que *B. cereus* représente plus de 12% de la flore microbienne constitutive des biofilms en industrie laitière (Sharma et Anand, 2002).

2.1 Traitement préventif

Milieu LB

L'expérience a dans un premier temps été réalisée avec une suspension uniquement composée de BtB2-4. La Fig. III.2a montre que, dans le contrôle, la bactérie a atteint une concentration de $5,8 \log \text{ CFU/mm}^2$ alors que, suite à l'application de Deep-Blue, elle n'a atteint qu'une concentration de $1,1 \log \text{ CFU/mm}^2$. La population en BtB2-4 s'est donc vue diminuée de $4,7 \log \text{ CFU/mm}^2$. En ce qui concerne les

biofilms multi-souches, l'effet de Deep-Blue a tout d'abord été analysé d'un point de vue macroscopique. La Fig. III.3b montre que, suite au traitement préventif, aucun développement bactérien n'est visible sur la lamelle en verre contrairement au contrôle sur lequel un biofilm dense a pu être observé (Fig.III.3a). En effet, la concentration en chacune des souches dans la première cellule est supérieure à 4 log CFU/mm² alors que celle dans la cellule traitée est inférieure à 1,5 log CFU/mm² (Fig. III.2b). L'application de Deep-Blue a réduit la charge en BtB2-4, Cer057 et Cer074 sur la surface de 2,7 à 3,9 log CFU/mm².

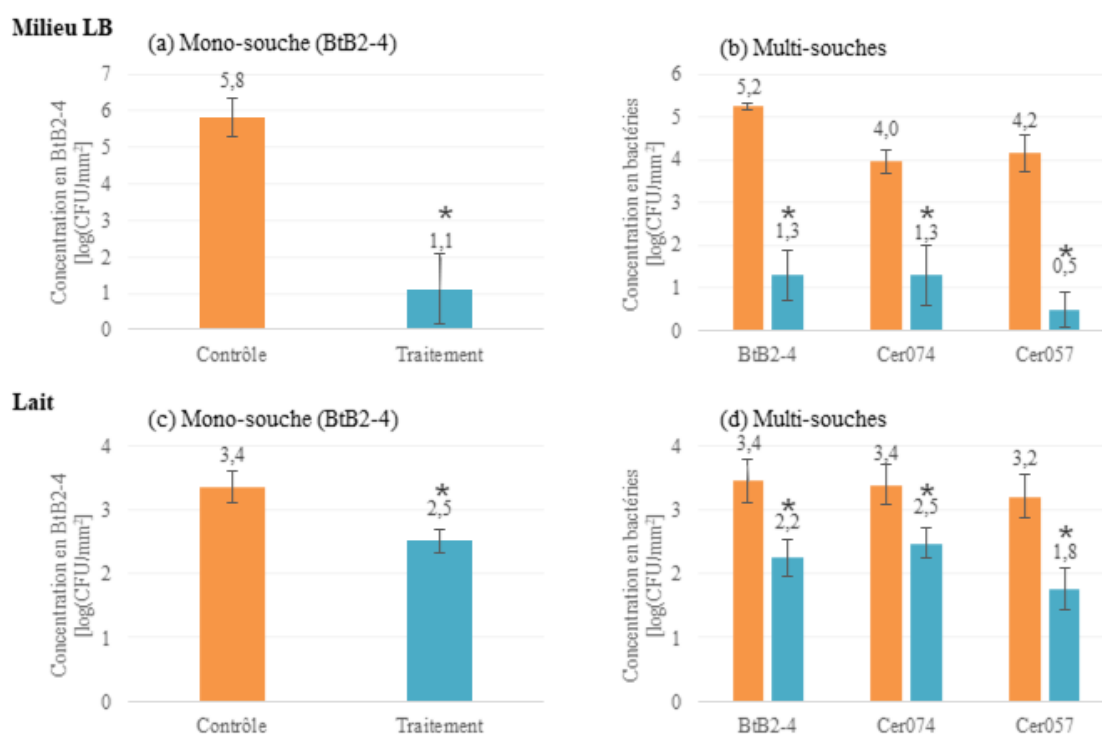


Figure III.2 – Concentration en bactéries de biofilms formés sur une surface en verre avec et sans traitement préventif par Deep-Blue. Les contrôles sont représentés en orange, les traitements en bleu. Une diminution significative par rapport au contrôle selon le test de Student ($p < 0.05$) est indiquée par une étoile. Les moyennes avec écarts-types sont obtenues sur base des résultats de trois expériences.

Lait

Globalement, la concentration en bactéries dans le biofilm contrôle formé dans le lait est moins élevée que dans le LB (± 3 vs ± 5 log CFU/mm²). Néanmoins, Deep-Blue s'est tout de même montré efficace dans cette matrice aussi bien sur le biofilm mono-souche que multi-souches. Dans le premier, le traitement préventif a pu réduire significativement la concentration en BtB2-4 d'un ordre de grandeur, soit 90% de bactéries en moins. Dans le second, les populations en BtB2-4, Cer074 et Cer057 se sont vues diminuées de 1,2, 0,9 et 1,4 log CFU/mm² respectivement. Les concentrations finales restent cependant assez élevées, de l'ordre de 2 à 2,5 CFU/mm², soit plus élevées que celles retrouvées dans le LB suite à l'application de Deep-Blue.

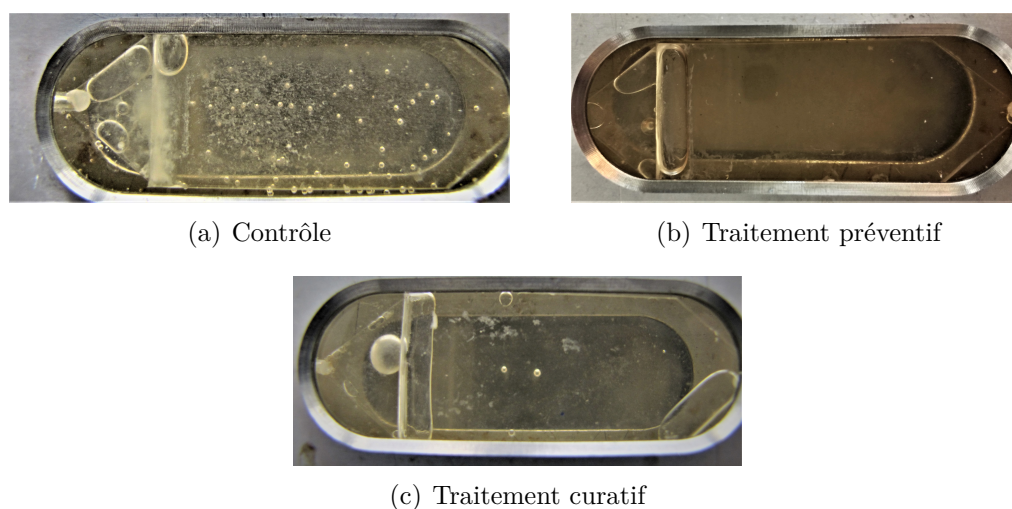


Figure III.3 – Impact de Deep-Blue sur le développement d’un biofilm formé O/N par des souches de *B. weihenstephanensis* à 30°C dans une cellule à flux. (a) Biofilm mature (contrôle) (b) Biofilm soumis à un traitement préventif avec Deep-Blue (c) Effet de l’application de Deep-Blue durant 4 h sur un biofilm mature

2.2 Traitement curatif

Milieu LB

La Fig. III.4a montre l’efficacité de Deep-Blue à éliminer un biofilm formé pendant 20 h dans du LB. Dans des expériences préliminaires, Deep-Blue s’était déjà montré efficace contre un biofilm formé uniquement de BtB2-4. En effet, après 4 h de traitement, la concentration en bactérie à la surface du verre a été évaluée à 3,7 log CFU/mm², soit une réduction de 2,1 ordres de grandeur par rapport au contrôle (Hock, non publié). La Fig. III.3c montre l’efficacité de Deep-Blue à éliminer un biofilm mature formé par les trois *B. weihenstephanensis*. On constate que le phage a été en mesure de diminuer le nombre de cellules attachées à la surface. En effet, le traitement curatif a pu réduire significativement la concentration en BtB2-4 et Cer057 au sein d’un biofilm multi-souches (respectivement 1,9 et 1,7 log CFU/mm²). Cependant, il s’est montré inefficace contre Cer074 dont la charge n’a pas diminué sensiblement (Fig. III.4a).

Lait

Comme le montre la Fig. III.4b, l’application de Deep-Blue pendant 4 h n’a pas été en mesure de réduire significativement la charge en *B. weihenstephanensis* au sein d’un biofilm formé dans du lait pendant 20 h. Ces résultats montrent que tout comme pour le traitement préventif, Deep-Blue s’est montré moins efficace pour éradiquer les biofilms formés dans ce milieu que dans le LB.

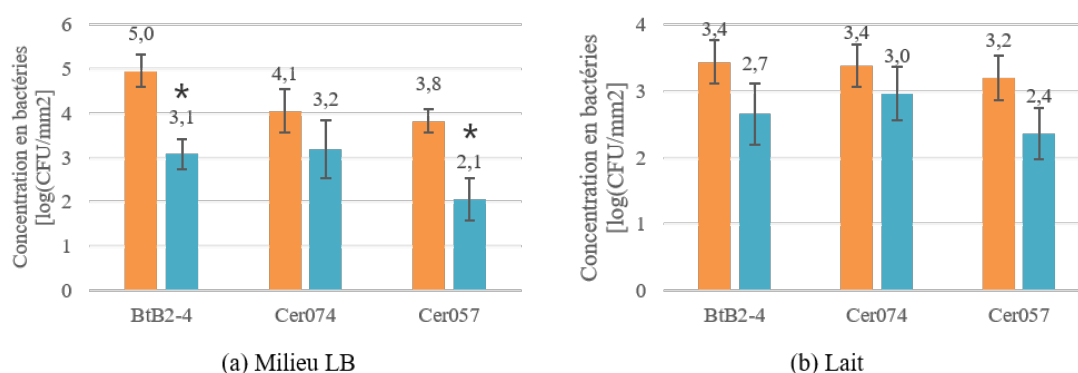


Figure III.4 – Concentration en bactéries d'un biofilm formé sur une surface en verre avec et sans traitement curatif par Deep-Blue. Les contrôles sont représentés en orange, les traitements en bleu. Une diminution significative par rapport au contrôle selon le test de Student ($p < 0.05$) est indiquée par une étoile. Les moyennes avec écarts-types sont obtenues sur base des résultats de trois expériences.

2.3 Synthèse des expériences sur les biofilms

Le Tableau III.2 synthétise les résultats obtenus suite à l'application de Deep-Blue comme traitement préventif ou curatif contre des biofilms de *B. weihenstephanensis*.

Tableau III.2 – Tableau récapitulatif des différentes réductions obtenues dans les expériences sur les biofilms. Les résultats sont exprimés en réductions logarithmiques. Les différences non significatives par rapport au contrôle sont indiquées en gras.

	Type de biofilm	Mono-souche	Multi-souches		
		Traitement	BtB2-4	BtB2-4	Cer074
LB	Préventif	4,7	3,9	2,7	3,7
	Curatif	2,1	1,9	0,9	1,7
Lait	Préventif	0,9	1,2	0,9	1,4
	Curatif	-	0,7	0,4	0,8

Une première constatation est que, aussi bien dans le lait que dans le LB, Deep-Blue s'est montré plus efficace pour prévenir la formation d'un biofilm que pour l'éradiquer. En effet, de manière générale, les réductions en échelle logarithmique sont environ deux fois plus élevées suite au traitement préventif qu'au curatif. De manière similaire, les deux traitements ont eu un effet plus conséquent dans le LB que dans le lait.

2.3.1 Traitement curatif vs préventif

Afin d'éradiquer un biofilm, les phages doivent pouvoir atteindre les bactéries qui y sont englobées et s'attacher aux récepteurs spécifiques présents à la surface bactérienne. Cependant, la nature complexe du biofilm confronte le phage à plusieurs difficultés qui l'empêche d'agir efficacement. La matrice constitue une première barrière à l'initiation du processus d'infection. Cette structure complexe limite la diffusion du phage et diminue son accessibilité à la bactérie hôte (Pires *et al.*, 2017). Par ailleurs, les polymères qui la composent peuvent masquer les récepteurs phagiques et

ainsi entraver le processus d'infection. Un deuxième frein à l'éradication des biofilms par les phages est lié à la présence prépondérante au sein de la matrice de cellules métaboliquement peu actives (*e.g.* cellules persistantes ou en phase stationnaire) et donc moins susceptibles d'être lysées. En effet, comme mentionné précédemment, les phages infectent préférentiellement les bactéries en phase exponentielle de croissance (Pires *et al.*, 2017).

Les phages, appliqués de manière préventive, ne doivent pas faire face à toutes ces contraintes étant donné qu'ils ont la possibilité d'infecter les cellules avant que celles-ci ne forment un biofilm et lorsqu'elles sont encore à l'état planctonique. Cela explique pourquoi le traitement préventif s'est généralement montré plus efficace que le curatif.

Néanmoins, les phages ont évolué pour surpasser les barrières imposées par les biofilms. En effet, certains possèdent une activité polysaccharide dépolymérase qui leur permet de dégrader spécifiquement les polymères de la matrice. Cette caractéristique constitue un avantage important étant donné qu'elle encourage le processus d'invasion du phage dans les couches profondes du biofilm ainsi que la dispersion de la matrice (Labrie *et al.*, 2010). Par ailleurs, les phages sont capables de pénétrer au sein du biofilm via les canaux au même titre que l'eau et les éléments nutritifs. Enfin, la densité en bactéries y est très élevée ce qui facilite l'action des bactériophages en permettant une infection rapide et efficace (Harper *et al.*, 2014).

Le traitement curatif, certes en moindre mesure que le préventif, s'est montré efficace dans le LB. En effet, il a pu réduire d'environ $2 \log$ CFU/mm² le nombre de cellules de BtB2-4 attachées à la surface en verre dans les deux types de biofilm (mono- et multi-souches). Ces résultats corroborent ceux obtenus suite à l'utilisation de ListShieldTM (Intralix) sur un biofilm de *L. monocytogenes* mature de deux jours. En effet, le cocktail phagique a diminué la concentration en bactéries de 1,9 à 2,4 log après 2 h de traitement (Sadekuzzaman *et al.*, 2017). Le produit ListexTM (Microos Food Safety) a, quant à lui, été en mesure de réduire de 3,5 à 5,4 ordres de grandeur la concentration en *L. monocytogenes* au sein d'un biofilm mature après 24 h de traitement (Soni et Nannapaneni, 2010b). Ces résultats sont similaires à ceux observés pour Deep-Blue dans le traitement préventif et nous amènent à penser qu'un traitement curatif appliqué sur une période de temps plus étendue permettrait probablement d'atteindre des réductions semblables (Soni et Nannapaneni, 2010b). Par ailleurs, afin d'améliorer l'efficacité du biocontrôle, les phages pourraient être utilisés en combinaison avec d'autres méthodes de désinfection ou d'élimination des biofilms.

2.3.2 LB vs Lait

Deux grandes différences ont été observées en fonction du milieu dans lequel les expériences ont été menées. D'une part, les biofilms formés en l'absence de phages sont plus conséquents dans le LB que dans le lait. D'autre part, aussi bien le traitement préventif que curatif se sont montrés plus efficaces dans le LB. Une première explication est liée au fait que le lait contient certaines molécules qui pourraient

interagir avec Deep-Blue par interactions hydrophobes ou ioniques. Les phages pris au piège seraient alors incapables d'atteindre et d'infecter leur cible (Fister *et al.*, 2016). D'une manière similaire, certains composés peuvent masquer les récepteurs phagiques à la surface de la bactérie la rendant inaccessible aux phages. Gill *et al.* (2006) ont montré que l'adsorption de protéines du lait de masse moléculaire élevée à la surface de *S. aureus* a induit une baisse de l'efficacité du bactériophage K à infecter la bactérie. Enfin, les résidus organiques et les minéraux du lait peuvent s'insérer dans la matrice et constituent une barrière supplémentaire à franchir pour les phages (Chmielewski et Frank, 2003).

Concernant les différences de concentrations obtenues au niveau des biofilms contrôles, l'explication la plus probable est que le contact des bactéries avec certains composés chargés tels que les protéines, le phosphate de calcium ou les lipides peut entraver l'adhésion des cellules à la surface. En effet, Wong (1998) a montré que les caséines et les albumines présentes dans le lait pouvait réduire de 1,5 log l'adhésion des cellules de *L. monocytogenes* sur de l'inox comparé aux concentrations obtenues dans du PBS. Par ailleurs, le LB est un milieu de croissance optimal. Il paraît donc logique que les bactéries attachées à la surface se soient multipliées plus rapidement dans ces conditions. Enfin, rappelons que les bactéries n'ont été injectées que durant 20 min lors de cette expérience, un temps de contact plus étendu aurait certainement abouti en l'adhésion d'un nombre plus élevé de cellules.

2.3.3 Mono-souche vs Multi-souches

Dans le LB, le traitement préventif s'est montré plus efficace pour prévenir la formation d'un biofilm formé uniquement de BtB2-4 que des trois souches de *B. weihenstephanensis*. En effet, la population de BtB2-4 s'est vue diminuée respectivement de 4,7 et 3,9 log CFU/mm² par rapport au contrôle. Cependant, dans les autres conditions, aucune différence significative n'a pu être observée quant à l'efficacité des phages à agir sur des biofilms mono- ou multi-souches. La présence d'autres bactéries cibles de Deep-Blue dans un biofilm ne semble donc pas impacter sur son activité lytique envers une souche (ici BtB2-4). Cependant, les biofilms retrouvés dans la nature et dans les industries alimentaires, à l'inverse de ceux testés dans le cadre de ce mémoire, sont généralement composés de plusieurs espèces bactériennes. Dans ce type de biofilm, les bactéries cibles sont entourées par d'autres espèces qui la protègent et risquent de gêner l'activité du phage (Sutherland *et al.*, 2004).

3 Isolement d'un *Myoviridae*

Deep-Blue possède une activité lytique contre 74% des 155 souches émétiques de *B. cereus* et *B. weihenstephanensis* de la collection du laboratoire MIAE (Hock *et al.*, 2016). Cette proportion, bien qu'assez conséquente, peut s'avérer insuffisante dans certains cas de contamination (spectre d'hôte trop étroit). En comparaison, P100, le seul phage du produit ListexTM (Micros Food Safety), est capable de lyser plus de 95% des 250 souches de *L. monocytogenes* impliquées dans des intoxications alimentaires. Cependant, un phage à spectre d'action élargi n'est pas toujours disponible. Pour se prémunir de cette contrainte, une solution efficace réside dans l'utilisation concomitante de plusieurs phages. En effet, l'utilisation d'un cocktail de phages ayant des spectres d'action complémentaires offre la possibilité d'agir sur une gamme d'hôtes plus étendue. Par ailleurs, l'application d'un cocktail à la place d'un seul et même phage pourrait diminuer le risque d'apparition de souches résistantes.

Cette troisième expérience vise à isoler dans l'environnement un phage appartenant à la famille des *Myoviridae* et capable d'infecter un panel de souches émétiques du groupe *B. cereus* complémentaire à Deep-Blue. L'objectif à long terme est d'élaborer un cocktail composé de plusieurs phages ayant un spectre d'action élargi afin d'augmenter l'efficacité du biocontrôle. Pour ce faire, divers échantillons ont été prélevés et contaminés avec des souches émétiques de *B. cereus* dans le but de les enrichir en phages ciblant spécifiquement ces bactéries. Les plaques de lyse claires obtenues suite au dépôt des échantillons sur top agar ont ensuite été soumises à une PCR avec des amorces MYO1R/F ciblant des régions conservées chez Deep-Blue ainsi que chez les six *Myoviridae* infectant *Bacillus* qui lui sont le plus semblable au niveau génomique. La raison pour laquelle les *Myoviridae* ont été choisis pour cible lors de cette expérience est que la majorité d'entre eux sont des bactériophages lytiques qui sont les seuls phages appropriés pour le biocontrôle.

Les 20 souches émétiques de *B. cereus* utilisées dans le cadre de cette expérience ont été sélectionnées sur base de deux caractéristiques. Tout d'abord, elles sont insensibles à l'activité lytique de Deep-Blue. Cette caractéristique est importante étant donné que l'on souhaite isoler un phage ayant un spectre d'action qui lui soit complémentaire. Ensuite, elles ne contiennent ni IEBH, ni de tectivirus, qui sont des phages tempérés présents sous forme de prophages chez de nombreuses souches de *B. cereus*. Lors de l'étape d'incubation, ceux-ci pourraient initier un cycle lytique pour s'extraire de la bactérie. Les plaques de lyse obtenues sur le tapis bactérien ne seraient dès lors pas le fruit d'un phage isolé dans l'environnement mais d'un phage ajouté conjointement avec les bactéries.

3.1 Nombre de plaques de lyse obtenues par échantillon

Au total, 40 échantillons ont été prélevés et ont été répartis en différentes catégories selon leur origine dans le Tableau III.3. La présence dans un échantillon d'un phage ciblant une des souches est révélée par la formation de plaques de lyse sur le tapis bactérien formé par cette souche. Les plaques ont été classées en deux catégories

en fonction du type de phage dont elles sont issues : les plaques de lyse claires sont propres aux phages lytiques tandis que les phages tempérés forment généralement un halo trouble à l'endroit où l'échantillon a été déposé. Le Tableau III.3 recense le nombre de plaques de lyses obtenues toutes bactéries confondues pour chaque catégorie d'échantillons.

Tableau III.3 – Échantillons prélevés et plaques de lyses obtenues suite à leur contamination par des souches émétiques.

Origine	Nombre	Nombre de plaques de lyse			Positifs à MYO1R/F
		Lytique	Tempéré	Total	
Déjections animales	6	14	16	30	0
Sols agricoles	5	12	21	33	0
Eaux	5	11	19	30	0
Aliments	5	2	5	7	0
Fumiers	5	16	20	36	0
Composts	3	6	4	10	0
Épuration	3	4	0	4	0
Égouts	3	3	4	7	0
Prairies	3	6	21	27	0
Ensilages	2	2	1	3	0
Total	40	86	105	191	0

Les phages utilisés actuellement pour le biocontrôle dans la chaîne alimentaire ont pour la plupart été isolés de l'environnement ou de sources non alimentaires telles que les eaux usées, les égouts, les déjections, les sols, les fermes ainsi que les effluents des usines de traitement (Greer, 2005). Les mêmes tendances ont pu être observées dans le cadre de ce travail. En effet, une proportion plus importante de phages a été retrouvée dans les déjections animales, les fumiers, les eaux usées ainsi que dans les sols agricoles et les prairies. Au contraire, les aliments, les ensilages ainsi que les échantillons issus de stations d'épuration ont rarement engendré la formation de plaques sur les différents tapis bactériens.

3.2 Nombre de lyses par souche

La Fig. III.5 indique le nombre d'échantillons ayant révélé la présence de phages en fonction de chacune des souches émétiques testées. Seules douze *B. cereus* sur les vingt sont représentées sur ce graphique. En effet, aucune plaque de lyse n'a pu être observée sur les différents tapis bactériens formés par les huit souches absentes (LH002, MC118, 5958b, 5975c, 5975a, 5964c, 5965a, 5975b). On remarque que la proportion de phages lytiques et tempérés dépend de la souche. Certaines souches telles que F et B1 ont été ciblées par des phages dans la plupart des échantillons. Cependant, la majorité d'entre eux étaient tempérés. À l'inverse, E57C01 et I20-4 ont été lysés plus rarement mais toujours par des phages lytiques. Par ailleurs, certains échantillons ont révélé la présence des deux types de phages mais sur différentes souches. Il est possible cependant que ce soit le même phage qui soit à l'origine des

différentes plaques de lyse obtenues. En effet, un phage tempéré peut effectuer des cycles lytiques chez un hôte et des cycles lysogéniques chez un autre ce qui explique pourquoi certaines souches semblent être infectées principalement par des phages lytiques.

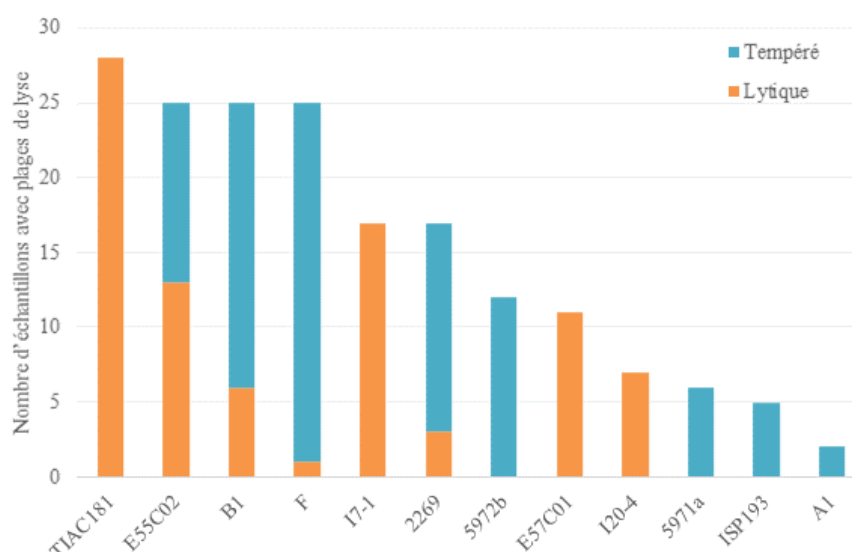


Figure III.5 – Nombre d'échantillons ayant révélés la présence de phages par souche émétique de *B. cereus*. Les phages lytiques sont représentés en orange, les tempérés en bleu.

Seules 86 PFU issues de phages lytiques ont été soumises à une PCR. En effet, les phages tempérés ne sont pas appropriés pour la thérapie phagique car ce sont des vecteurs potentiels de gènes de virulence. De plus, ceux-ci, contrairement aux phages lytiques, ne tuent pas systématiquement leurs hôtes mais coexistent avec sur plusieurs générations. Comme le montre le Tableau III.3, la PCR ne s'est révélée positive pour aucune des plaques testées. Une première explication à ce résultat réside dans le fait qu'il est possible que les bactéries sélectionnées soient résistantes à l'infection par les *Myoviridae*. En effet, les 20 souches testées sont la cible de phages isolés en même temps que Deep-Blue mais aucun d'eux n'appartiennent à cette famille de bactériophages, raison pour laquelle elles ont été sélectionnées initialement pour cette expérience. Deuxièmement, certes, la PCR ne s'est révélée positive à aucune des PFU testées mais il est possible que parmi les plaques de lyse obtenues se trouvaient tout de même un ou plusieurs *Myoviridae*. En effet, il est possible que les amorces utilisées aient été trop spécifiques. Il s'avérerait donc nécessaire d'optimiser le design des amorces afin de cibler un plus grand nombre de phages.

3.3 Optimisation du design des amorces

Pour rappel, les amorces ont initialement été conçues sur base de la séquence complète de Deep-Blue. Suite à une comparaison BLAST au niveau nucléotidique, six phages ont été sélectionnés suivant leur pourcentage d'identité avec Deep-Blue. Les différentes séquences génomiques ont été alignées et les amorces conçues sur base de séquences conservées chez ces différents phages. Après vérification sur PrimerBlast, un programme permettant d'examiner quels organismes seront ciblés par une paire d'amorces, seuls les sept *Myoviridae* utilisés ont pu être détectés, ce qui représente une proportion assez faible sur la centaine de *Myoviridae* infectant *Bacillus* dont le génome est actuellement séquencé. Il semble donc que la démarche suivie initialement pour la conception des amorces n'était pas la plus adéquate étant donné qu'elle ciblait un nombre trop restreint de phages.

Afin d'optimiser les amorces, au lieu de partir du génome complet de Deep-Blue, une alternative serait de sélectionner des protéines conservées chez les *Myoviridae*. Cet exercice a été réalisé avec la séquence codant pour les protéines de la gaine contractile de Deep-Blue. En effet, étant présente uniquement chez les *Myoviridae*, il est vraisemblable que cela permette de les discriminer par rapport aux *Siphoviridae* et aux *Podoviridae*. Lors d'une comparaison BLASTp de la protéine de la gaine de Deep-Blue, on obtient 70 correspondances avec des myovirus de *Bacillus* (pourcentage d'identité élevé), soit 10 fois plus de résultats que pour la séquence génomique complète. Cinq phages ayant différents niveaux d'identité avec Deep-Blue ont ensuite été sélectionnés (Tableau III.4) et une paire d'amorces a été conçue suite à l'alignement de leurs séquences. Ces amorces, reprises dans le Tableau III.5, ont la particularité d'être dégénérées, c'est-à-dire que certaines positions de leur séquence ont plusieurs bases possibles (base remplacée par l'iosine ou mélange d'amorces). Les amorces dégénérées permettent ainsi de cibler un nombre plus important d'organismes similaires. Dans notre cas, après vérification sur PrimerBLAST, 48 *Myoviridae* infectant *Bacillus* (sur les 70 détectés lors de l'analyse BLAST) ont été ciblés par cette paire d'amorce, aucun *Siphoviridae* et aucun *Podoviridae*.

Tableau III.4 – *Myoviridae* sélectionnés suite à la comparaison dans BLAST de la séquence codant pour les protéines de la gaine de Deep-Blue. La E-value obtenue pour chacun est égale à 0.

Bacillus phage	Query cover %	Identity %	N° d'accension de la protéine
Deep-Blue	100	100	YP009285508
vBBceMBc431v3	100	94	YP007677123
PK16	100	89	ANY29422
Bcp78	100	85	YP006908049
BigBertha	99	65	YP008771108
Nemo	99	56	YP009286974

Tableau III.5 – Séquences oligonucléotidiques des amorces dégénérées conçues ciblant le gène de la gaine des *Myoviridae* infectant *Bacillus*. Les bases dégénérées sont indiquées en gras. R=A ou G, Y=C ou T, M=A ou C, W=A ou T et H=A, C, ou T

Nom	Séquence (5'-3')	Longueur de l'amplicon
MYOGF	AACCARYTACGMGGATTCGT	455 pb
MYOGR	GATRGAWGCAGAHGTGTTACG	

D'autres gènes conservés chez les *Myoviridae* pourraient également être utilisés. Selon une étude visant à comparer les génomes des phages de *Pseudomonas aeruginosa*, les gènes les plus conservés sont ceux impliqués dans la réplication de l'ADN du phage et la morphologie du virion (Hertveldt *et al.*, 2005). En effet, suite à différentes comparaisons BLAST, il semblerait que les gènes de Deep-Blue encodant pour l'ADN polymérase I/II, les hélicases I/II ainsi qu'une primase soient conservés chez les *Myoviridae*.

Chapitre IV

Conclusions et perspectives

B. cereus est une bactérie pathogène régulièrement incriminée dans des cas d'intoxication alimentaire. Le syndrome émétique occasionné par cette bactérie est dû à une toxine thermostable, le céréulide, dont l'ingestion s'est avérée létale à plusieurs reprises. Le contrôle de cette bactérie tout au long de la filière agro-alimentaire s'avère donc primordial. Cependant, les méthodes de préservation actuelles présentent de nombreux désavantages et se montrent notamment inefficaces contre les bactéries sporulantes telles que *B. cereus*. Par ailleurs, certaines souches de cette bactérie sont psychrotolérantes ce qui, au vu de la demande croissante des consommateurs pour des produits réfrigérés et prêts-à-manger, constitue un enjeu supplémentaire pour les industriels. Les bactériophages, dû à leur étroite spécificité, présentent plusieurs avantages et apparaissent comme des outils propices au contrôle des bactéries pathogènes au sein de la filière agro-alimentaire.

Le bactériophage Deep-Blue est un candidat prometteur pour l'élaboration d'un cocktail visant à contrôler les souches émétiques du groupe *Bacillus*. En effet, Deep-Blue ne possède aucune des caractéristiques génétiques propres aux phages tempérés tels que les gènes de maintenance de la lysogénie ou le gène codant pour l'intégrase. Ce *Myoviridae* est spécifique au groupe *B. cereus* et possède une activité lytique contre 74% des souches émétiques de *B. cereus* et *B. weihenstephanensis* du laboratoire MIAE. Par ailleurs, le phage est stable sous différentes conditions de stockage. En effet, Deep-Blue tolère une gamme de pH allant de 5 à 10 et reste stable en solution pendant plusieurs mois à 4°C. Enfin, l'application de Deep-Blue est considérée comme sans danger étant donné que son innocuité envers les cellules de mammifères a été démontrée et que son génome est exempt de séquences codant pour des facteurs de virulence. Deep-Blue s'est déjà avéré efficace pour contrôler BtB2-4, une souche émétique psychrotolérante de *B. cereus* en conditions de laboratoire. Le but de ce travail était donc d'étudier l'efficacité du phage comme agent de biocontrôle de *B. cereus* dans les matrices alimentaires ainsi que comme moyen de lutte contre les biofilms pouvant se former à la surface des installations en IAA. Parallèlement, l'objectif poursuivi consistait en l'isolement d'autres candidats pouvant être intégrés au sein d'un cocktail avec Deep-Blue.

Le premier objectif de ce mémoire visait à évaluer la capacité de Deep-Blue à contrôler la croissance de trois souches psychrotolérantes de *B. cereus* (BtB2-4, Cer057 et Cer074) dans différentes matrices alimentaires contaminées artificiellement. Chaque matrice a été traitée par Deep-Blue à une MOI de 1000 et incubée à 7°C et 20°C. Ces deux températures ont été choisies car les cas d'intoxications émétiques sont fréquemment liés au stockage inapproprié des aliments à l'air ambiant et parce que les souches psychrotolérantes de *B. cereus* peuvent se multiplier et produire le céréulide dans les produits réfrigérés. Dans un premier temps, deux matrices liquides (LB et lait) ont été testées. Elles ont vu leur concentration en *B. cereus* diminuer considérablement par rapport au contrôle suite à l'application de Deep-Blue aussi bien à température ambiante qu'à température de réfrigération. En plus de contrôler la croissance des bactéries, le traitement a pu réduire leur concentration sous le seuil de contamination initial. Il a même été en mesure de rendre indétectable la présence de *B. cereus* dans le lait après 48h à 20°C. De la même manière, Deep Blue s'est montré efficace dans le riz où il a pu inhiber la croissance de *B. cereus*. Cependant, les réductions décimales obtenues étaient moindres que dans les matrices liquides et la charge finale en bactéries restait supérieure au niveau initial d'inoculation. Il semblerait que cette baisse d'efficacité soit liée à la nature plus complexe de la matrice qui limite la diffusion des particules phagiques, matrice sur laquelle les phages peuvent également s'adsorber et devenir inactifs. Cette limitation pourrait être contrée par l'application d'une solution plus concentrée en phages. En effet, l'efficacité du traitement dans une matrice solide dépend principalement de la quantité initiale de phage ajoutée et non pas de la quantité de nouveaux phages produits car ceux-ci sont incapables de se mouvoir correctement pour atteindre une nouvelle cible. Par ailleurs, une optimisation de la méthode d'application des phages permettant d'augmenter l'uniformité du traitement et la probabilité de rencontre avec les bactéries devrait être envisagée. Dans cette optique, il serait intéressant de réitérer l'expérience de biocontrôle en immergeant le riz après sa cuisson dans une solution contenant Deep-Blue. Enfin, la dernière matrice étudiée consistait en l'application de Deep-Blue à la surface du riz au lait. La croissance bactérienne a pu être ralentie mais la concentration en *B. weihenstephanensis* est restée largement supérieure à la contamination initiale, notamment à 7°C. La présence d'une flore externe en forte concentration ainsi que les mêmes raisons énoncées pour le riz peuvent être mises en cause ici. Notons que lors de ce travail, les phages ont été appliqués conjointement avec les bactéries. Or il serait intéressant d'étudier la capacité de Deep-Blue à protéger contre la contamination des denrées alimentaires par *B. cereus* et donc d'appliquer le phage en prévention avant contamination avec les bactéries. Cette expérience aurait pour avantage d'évaluer le réel potentiel de Deep-Blue comme conservateur alimentaire.

Le deuxième objectif était d'évaluer la capacité de Deep-Blue à lutter contre les biofilms. Pour ce faire, une suspension bactérienne, composée de BtB2-4 seul ou des trois souches de *B. weihenstephanensis*, a été injectée dans une cellule à flux et un milieu de culture (LB ou lait) a été ajouté en continu pendant 24 h pour permettre la formation d'un biofilm sur une surface en verre. Deux traitements ont été testés : un préventif et un curatif. Dans le LB, le premier traitement s'est avéré efficace pour prévenir la formation d'un biofilm (réduction d'environ 4 log

CFU/mm² par rapport au contrôle). De la même manière, suite à l'application de Deep-Blue durant 4h sur un biofilm déjà formé, la densité bactérienne s'est vue diminuée de 2 log en moyenne. Bien que cette expérience ait démontré le potentiel de Deep-Blue à éradiquer un biofilm, les réductions obtenues sont moindres que celles du traitement préventif. Cette baisse d'efficacité est sans doute liée à la présence d'une matrice complexe qui constitue un frein à la destruction des biofilms par les bactériophages. Il est possible qu'une application de Deep-Blue sur une période de temps plus étendue permette au phage de dégrader davantage cette matrice et d'atteindre sa cible. Par ailleurs, afin d'améliorer l'efficacité du traitement curatif, les phages pourraient être utilisés en combinaison avec d'autres méthodes de désinfection ou d'élimination des biofilms. En effet, l'application au préalable d'enzymes ou d'un traitement mécanique aurait pour conséquence de fragiliser le biofilm et de permettre aux phages d'accéder plus aisément aux bactéries cibles. Zhang et Hu (2013) ont montré que l'effet d'un phage combiné avec du chlore était plus efficace que chacun des traitements appliqués seuls pour éradiquer un biofilm formé par *P. aeruginosa*. Les mêmes observations ont été faites pour le lait bien que, de manière générale, le potentiel de Deep-Blue comme agent de désinfection s'est avéré moindre dans cette matrice que dans le LB. Au delà du fait que le LB soit un milieu optimal, cela peut être lié à la présence de molécules dans le lait qui peuvent, d'une part, interagir avec le phage et, d'autre part, apporter une protection supplémentaire aux bactéries retenues au sein du biofilm. En outre, l'obtention de biofilms moins denses dans cette matrice pourrait également expliquer cette baisse d'efficacité. Il faut garder à l'esprit que la formation d'un biofilm dépend de nombreux facteurs et les systèmes expérimentaux actuels ne permettent pas d'appréhender l'ensemble des processus qui régulent leur développement. Néanmoins, afin d'obtenir un biofilm plus conséquent, la surface en verre aurait pu être remplacée par de l'inox. En effet, Hayrapetyan *et al.* (2015) ont montré que *B. cereus* formait des quantités de biofilm plus importantes sur de l'acier inoxydable. En outre, l'utilisation de cette surface permettrait de nous rapprocher des conditions retrouvées en IAA. Une autre solution aurait été de faire passer le lait avant l'ajout de bactéries afin de créer un film de conditionnement et de faciliter l'adhésion des cellules. Par ailleurs, les spores de *B. cereus* par leur caractère hydrophobe ont un plus grand potentiel d'adhésion que les cellules en croissance et sont donc plus propices à initier la formation d'un biofilm. C'est d'ailleurs préférentiellement sous cette forme que *B. cereus* s'attache aux surfaces des tanks et des canalisations en industrie laitière (Kumari et Sarkar, 2016). Enfin, il est à noter que Deep-Blue a été autant efficace sur des biofilms formés d'une seule que de plusieurs souches de *B. cereus*. Cependant, les biofilms rencontrés en IAA sont généralement formés par plusieurs espèces. Il serait donc intéressant de réitérer les expériences sur des biofilms formés de *B. cereus* conjointement avec d'autres espèces bactériennes.

Le dernier objectif de ce travail était d'isoler dans l'environnement un phage lytique de la famille des *Myoviridae* et infectant un spectre d'hôte complémentaire à Deep-Blue dans le but de concevoir un cocktail de phages capable de couvrir une gamme d'hôtes plus étendue. Pour ce faire, des échantillons ont été enrichis avec des souches émétiques insensibles à Deep-Blue et les plaques de lyse obtenues ont été soumises à une PCR utilisant une paire d'amorces ciblant une région conservée du

génomique de sept myovirus infectant *Bacillus*. Malheureusement, aucun *Myoviridae* n'a pu être détecté par cette technique ce qui peut s'expliquer par un mauvais design des amorces qui seraient trop spécifiques. Une solution serait donc d'optimiser la conception des amorces afin de cibler un plus grand nombre de phages notamment en utilisant des amorces dégénérées qui permettraient une plus grande flexibilité. Une paire d'amorces ciblant la gaine contractile des *Myoviridae*, absente chez les autres phages, a donc été conçue et leur spécificité vérifiée. Celle-ci permet de détecter 48 *Myoviridae* infectant *Bacillus* contre 7 pour les amorces utilisées initialement. Par ailleurs, d'autres gènes tels que ceux encodant des ADN polymérases ou des hélicases semblent également conservés chez les *Myoviridae*. Plusieurs paires d'amorces pourraient dès lors être conçues et utilisées parallèlement afin d'augmenter la probabilité d'isoler un nouveau *Myoviridae*.

En conclusion, les expériences menées avec Deep-blue dans le cadre de ce travail ont montré le potentiel du phage à contrôler activement les souches psychrotolérantes de *B. cereus* dans les denrées alimentaires. Par ailleurs, l'efficacité de Deep-Blue en tant qu'agent anti-microbien en matière de lutte contre les biofilms a été prouvée. Ces résultats renforcent l'idée que Deep-Blue est un candidat réel à l'élaboration d'un produit phagique destiné à prévenir les intoxications émétiques liées à la présence de *B. cereus* dans les aliments. Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement de nouvelles méthodes de préservation et de désinfection faisant appel à des composés naturels et visant à pallier aux désavantages des méthodes conventionnelles qui ne répondent plus aux attentes des consommateurs. Il est fort probable qu'à l'avenir l'utilisation des phages constituera une partie intégrante des stratégies d'intervention en matière de salubrité mises en œuvre au sein de la filière agro-alimentaire, de la production primaire aux produits alimentaires finaux.

Bibliographie

- ABULADZE, T., LI, M., MENETREZ, M. Y., DEAN, T., SENEAL, A. et SULAKVELIDZE, A. (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* o157 : H7. *Applied and environmental microbiology*, 74(20):6230–6238.
- ACKERMANN, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2):90–94.
- ACKERMANN, H.-W. et PRANGISHVILI, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of virology*, 157(10):1843–1849.
- ADRIAENSSENS, E. et BRISTER, J. R. (2017). How to name and classify your phage : an informal guide. *Viruses*, 9(4):70.
- AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. et ISOBE, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 129(1): 17–19.
- AKBAS, M. Y. (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. *The Battle Against Microbial Pathogens : Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, Badajoz : Formatex*, pages 383–394.
- ALTAYAR, M. et SUTHERLAND, A. (2006). *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *Journal of applied microbiology*, 100(1):7–14.
- AN, S., WU, J. et ZHANG, L.-H. (2010). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-gmp phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Applied and environmental microbiology*, 76(24):8160–8173.
- ATTERBURY, R. J., CONNERTON, P. L., DODD, C. E., REES, C. E. et CONNERTON, I. F. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*, 69(10):6302–6306.
- AUGER, S., GALLERON, N., BIDNENKO, E., EHRLICH, S. D., LAPIDUS, A. et SOROKIN, A. (2008). The genetically remote pathogenic strain nvh391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and environmental microbiology*, 74(4):1276–1280.

- BAI, J., KIM, Y.-T., RYU, S. et LEE, J.-H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in microbiology*, 7:474.
- BARTOSZEWICZ, M., HANSEN, B. M. et SWIECICKA, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*, 25(4):588–596.
- BIGWOOD, T., HUDSON, J., BILLINGTON, C., CAREY-SMITH, G. et HEINEMANN, J. (2008). Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology*, 25(2):400–406.
- BORIE, C., SÁNCHEZ, M., NAVARRO, C., RAMÍREZ, S., MORALES, M., RETAMALES, J. et ROBESON, J. (2009). Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella Enteritidis* infection in chickens. *Avian diseases*, 53(2):250–254.
- BORYSOWSKI, J., MIĘDZYBRODZKI, R. et GÓRSKI, A. (2014). *Phage Therapy : Current Research and Applications*. Caister Academic Press.
- BOTTONE, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 23(2):382–398.
- BOUTALEB, N. (2007). *Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable*. Thèse de doctorat, Lorient.
- BRANGER, A. (2007). *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions.
- BRAVO, A., GILL, S. S. et SOBERON, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4):423–435.
- BREN, L. (2007). Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA consumer*, 41(1):20–22.
- BRIANDET, R., FECHNER, L., NAITALI, M. et DREANNO, C. (2012). *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Editions Quae.
- BRIDIER, A., SANCHEZ-VIZUETE, P., GUILBAUD, M., PIARD, J.-C., NAÏTALI, M. et BRIANDET, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology*, 45:167–178.
- BROOKS, J. D. et FLINT, S. H. (2008). Biofilms in the food industry : problems and potential solutions. *International journal of food science & technology*, 43(12):2163–2176.
- CARLTON, R., NOORDMAN, W., BISWAS, B., DE MEESTER, E. et LOESSNER, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods : genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3):301–312.

- CARTER, C. D., PARKS, A., ABULADZE, T., LI, M., WOOLSTON, J., MAGNONE, J., SENECA, A., KROPINSKI, A. M. et SULAKVELIDZE, A. (2012). Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157 : H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophage*, 2(3):178–185.
- CARVALHO, C. M., GANNON, B. W., HALFHIDE, D. E., SANTOS, S. B., HAYES, C. M., ROE, J. M. et AZEREDO, J. (2010). The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC microbiology*, 10(1):232.
- CARVALHO, C. M., SANTOS, S. B., KROPINSKI, A. M., FERREIRA, E. C. et AZEREDO, J. (2012). Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens : *Campylobacter* and *salmonella*. In *Bacteriophages*. InTech.
- CATALAO, M. J., GIL, F., MONIZ-PEREIRA, J., SAO-JOSE, C. et PIMENTEL, M. (2013). Diversity in bacterial lysis systems : bacteriophages show the way. *FEMS microbiology reviews*, 37(4):554–571.
- CHANG, H.-j., LEE, J.-h., HAN, B.-r., KWAK, T.-k. et KIM, J. (2011). Prevalence of the levels of *Bacillus cereus* in fried rice dishes and its exposure assessment from Chinese-style restaurants. *Food Science and Biotechnology*, 20(5):1351.
- CHATAIN-LY, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in microbiology*, 5:51.
- CHMIELEWSKI, R. et FRANK, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1):22–32.
- COHEN, Y. (2002). Bioremediation of oil by marine microbial mats. *International Microbiology*, 5(4):189–193.
- COMMISSION EUROPÉENNE (2006). Interdiction des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux. Rapport technique, Commission Européenne.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. et GREENBERG, E. P. (1999). Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418):1318–1322.
- de ARAUZ, L. J., JOZALA, A. F., MAZZOLA, P. G. et PENNA, T. C. V. (2009). Nisin biotechnological production and application : a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4):146–154.
- DIERICK, K., VAN COILLIE, E., SWIECICKA, I., MEYFROIDT, G., DEVLIEGER, H., MEULEMANS, A., HOEDEMAEKERS, G., FOURIE, L., HEYNDRIKX, M. et MAHILLON, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of clinical microbiology*, 43(8):4277–4279.
- DUBLANCHET, A. (2014). Qu'est-ce que la phagothérapie ? *HEGEL [ISSN 2269-0530]*, 2014, 04.

- EFSA (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14:4524–1.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. et SCHERER, S. (2004a). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS microbiology letters*, 232(2):189–195.
- EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. et SCHERER, S. (2004b). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular nutrition & food research*, 48(7):479–487.
- EHLING-SCHULZ, M., VUKOV, N., SCHULZ, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M., MÄRTLBAUER, E. et SCHERER, S. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1):105–113.
- ENDERSEN, L., O’MAHONY, J., HILL, C., ROSS, R. P., MCAULIFFE, O. et COFFEY, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual review of food science and technology*, 5:327–349.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. et ISHIZAKI, A. (2000). Class iia bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS microbiology reviews*, 24(1):85–106.
- FENTON, M., KEARY, R., MCAULIFFE, O., ROSS, R. P., O’MAHONY, J. et COFFEY, A. (2013). Bacteriophage-derived peptidase eliminates and prevents *Staphylococcal* biofilms. *International journal of microbiology*, 2013.
- FERGUSON, S., ROBERTS, C., HANDY, E. et SHARMA, M. (2013). Lytic bacteriophages reduce escherichia coli o157 : H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination. *Bacteriophage*, 3(1):e24323.
- FIorentin, L., VIEIRA, N. D. et BARIONI JR, W. (2005). Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian pathology*, 34(3):258–263.
- FISCHETTI, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins : a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6):357–362.
- FISTER, S., ROBBEN, C., WITTE, A. K., SCHODER, D., WAGNER, M. et ROSSMANITH, P. (2016). Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage p100. *Frontiers in microbiology*, 7:1152.
- FLEMMING, H.-C. et WINGENDER, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9):623.

- GARCÍA, P., MADERA, C., MARTINEZ, B., RODRÍGUEZ, A. et SUAREZ, J. E. (2009). Prevalence of bacteriophages infecting staphylococcus aureus in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *Journal of dairy science*, 92(7):3019–3026.
- GARCIA, P., MARTINEZ, B., OBESO, J. et RODRIGUEZ, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in applied microbiology*, 47(6):479–485.
- GARCÍA, P., MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, L. et RODRÍGUEZ, A. (2010). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International journal of food microbiology*, 141(3):151–155.
- GARCIA, P., RODRIGUEZ, L., RODRIGUEZ, A. et MARTINEZ, B. (2010). Food biopreservation : promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8):373–382.
- GARRY, P., CHRISTIEANS, S. et CARTIER, P. (2008). Les procédés de biopréservation alimentaire. *Sciences des Aliments*, 28(4):327.
- GHIGO, J.-M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845):442.
- GILL, J., SABOUR, P., LESLIE, K. et GRIFFITHS, M. (2006). Bovine whey proteins inhibit the interaction of staphylococcus aureus and bacteriophage k. *Journal of applied microbiology*, 101(2):377–386.
- GILLIS, A. et MAHILLON, J. (2014). Phages preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* : past, present and future. *Viruses*, 6(7):2623–2672.
- GOODRIDGE, L. D. et BISHA, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3):130–137.
- GRANUM, P. E., DOYLE, M., BEUCHAT, L. et MONTVILLE, T. (2005). *Bacillus cereus*. *Foodborne pathogens : microbiology and molecular biology*, pages 409–419.
- GREER, G. G. (2005). Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of food protection*, 68(5):1102–1111.
- GRIFFITHS, M. W. (2010). *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* spp. In *Pathogens and Toxins in Foods*, pages 1–19. American Society of Microbiology.
- GUENTHER, S., HUWYLER, D., RICHARD, S. et LOESSNER, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and environmental microbiology*, 75(1):93–100.
- GUINEBRETIERE, M.-H., AUGER, S., GALLERON, N., CONTZEN, M., DE SARRAU, B., DE BUYSER, M.-L., LAMBERET, G., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E., LERECLUS, D. et al. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1):31–40.

- GUTIERREZ, D., RUAS-MADIEDO, P., MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, A. et GARCÍA, P. (2014). Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS One*, 9(9):e107307.
- HAGENS, S. et LOESSNER, M. J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens : calculations and considerations. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1):58–68.
- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W. et STOODLEY, P. (2004). Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2):95.
- HARPER, D. R., PARRACHO, H. M., WALKER, J., SHARP, R., HUGHES, G., WERTHÉN, M., LEHMAN, S. et MORALES, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 3(3):270–284.
- HAUGE, S. (1955). Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 18(3):591–595.
- HAYRAPETYAN, H., MULLER, L., TEMPELAARS, M., ABEE, T. et GROOT, M. N. (2015). Comparative analysis of biofilm formation by bacillus cereus reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *International journal of food microbiology*, 200:72–79.
- HERSHEY, B. A. D. et CHASE, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*
- HERTVELDT, K., LAVIGNE, R., PLETENEVA, E., SERNOVA, N., KUROCHKINA, L., KORCHEVSKII, R., ROBBEN, J., MESYANZHINOV, V., KRYLOV, V. N. et VOLCKAERT, G. (2005). Genome comparison of pseudomonas aeruginosa large phages. *Journal of molecular biology*, 354(3):536–545.
- HEYNDRIKX, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011.
- HOCK, L., GILLIS, A. et MAHILLON, J. (2016). Complete genome sequence of bacteriophage Deep-Blue infecting emetic *Bacillus cereus*. *Genome announcements*, 4(3):e00115–16.
- HOTON, F. M., ANDRUP, L., SWIECICKA, I. et MAHILLON, J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology*, 151(7):2121–2124.
- HOTON, F. M., FORNELOS, N., N’GUESSAN, E., HU, X., SWIECICKA, I., DIERICK, K., JÄÄSKELÄINEN, E., SALKINOJA-SALONEN, M. et MAHILLON, J. (2009). Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environmental microbiology reports*, 1(3):177–183.

- HOWARD-VARONA, C., HARGREAVES, K. R., ABEDON, S. T. et SULLIVAN, M. B. (2017). Lysogeny in nature : mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME journal*, 11(7):1511.
- HUDSON, J., BILLINGTON, C., CAREY-SMITH, G. et GREENING, G. (2005). Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of food protection*, 68(2):426–437.
- HUNT, S. M., WERNER, E. M., HUANG, B., HAMILTON, M. A. et STEWART, P. S. (2004). Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and environmental microbiology*, 70(12):7418–7425.
- HYMAN, P. et ABEDON, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. In *Advances in applied microbiology*, volume 70, pages 217–248. Elsevier.
- INTRALYTIX (2009). Intralytix, safety by nature.
- JENSEN, G., HANSEN, B., EILENBERG, J. et MAHILLON, J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental microbiology*, 5(8):631–640.
- JERNIGAN, D. B., RAGHUNATHAN, P. L., BELL, B. P., BRECHNER, R., BRESNITZ, E. A., BUTLER, J. C., CETRON, M., COHEN, M., DOYLE, T., FISCHER, M. et al. (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, united states, 2001 : epidemiologic findings. *Emerging infectious diseases*, 8(10):1019.
- KAPLAN, J. B. et FINE, D. H. (2002). Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 68(10):4943–4950.
- KAZI, M. et ANNAPURE, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of food science and technology*, 53(3):1355–1362.
- KING, A. M., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. et CARSTENS, E. B. (2011). *Virus taxonomy : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- KLAUSEN, M., HEYDORN, A., RAGAS, P., LAMBERTSEN, L., AAES-JØRGENSEN, A., MOLIN, S. et TOLKER-NIELSEN, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular microbiology*, 48(6):1511–1524.
- KRETZER, J. W., LEHMANN, R., SCHMELCHER, M., BANZ, M., KIM, K.-P., KORN, C. et LOESSNER, M. J. (2007). Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Applied and environmental microbiology*, 73(6):1992–2000.
- KROTEN, M. A., BARTOSZEWICZ, M. et SWIECICKA, I. (2010). Cereulide and valinomycin, two important natural dodecadeptideptides with ionophoretic activities. *Pol J Microbiol*, 59(1):3–10.

- KUMARI, S. et SARKAR, P. K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial processing environment. *Food Control*, 69:20–29.
- KUTTER, E. et SULAKVELIDZE, A. (2004). *Bacteriophages : biology and applications*. CRC Press.
- LABRIE, S. J., SAMSON, J. E. et MOINEAU, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5):317.
- LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K. P., PRÜ, B. M., KAPLAN, T., WIESSNER-GUNKEL, E., STEWART, G. S. et SCHERER, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4):1373–1382.
- LEE, W.-J., BILLINGTON, C., HUDSON, J. et HEINEMANN, J. (2011). Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*. *Letters in applied microbiology*, 52(5):456–464.
- LEMONS, M., GOMES, I., MERGULHÃO, F., MELO, L. et SIMÕES, M. (2015). The effects of surface type on the removal of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single and dual species biofilms. *Food and Bioproducts Processing*, 93:234–241.
- LEPRINCE, A. (2017). The biocontrol of pathogens in food industries : an assessment of bacteriophages potential against emetic *Bacillus cereus*. Mémoire de D.E.A., Université Catholique de Louvain.
- LEVERENTZ, B., CONWAY, W. S., CAMP, M. J., JANISIEWICZ, W. J., ABULADZE, T., YANG, M., SAFTNER, R. et SULAKVELIDZE, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and environmental microbiology*, 69(8):4519–4526.
- LEVERENTZ, B., CONWAY, W. S., JANISIEWICZ, W. et CAMP, M. J. (2004). Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *Journal of food protection*, 67(8):1682–1686.
- LEWIS, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In *Bacterial Biofilms*, pages 107–131. Springer.
- LU, T. K. et KOERIS, M. S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current opinion in microbiology*, 14(5):524–531.
- MAHLER, H., PASI, A., KRAMER, J. M., SCHULTE, P., SCOGING, A. C., BÄR, W. et KRÄHENBÜHL, S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine*, 336(16):1142–1148.
- MANUEL, S. G., RAGUNATH, C., SAIT, H. B., IZANO, E. A., KAPLAN, J. B. et RAMASUBBU, N. (2007). Role of active-site residues of dispersin B, a biofilm-releasing β -hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis. *The FEBS journal*, 274(22):5987–5999.

- MARXEN, S., STARK, T. D., FRENZEL, E., RÜTSCHLE, A., LÜCKING, G., PÜRS-
TINGER, G., POHL, E. E., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M. et HOFMANN, T.
(2015). Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Analytical
and bioanalytical chemistry*, 407(9):2439–2453.
- MIKKOLA, R., SARIS, N.-E. L., GRIGORIEV, P. A., ANDERSSON, M. A. et SALKINOJA-
SALONEN, M. S. (1999). Ionophoretic properties and mitochondrial effects of
cereulide. *The FEBS Journal*, 263(1):112–117.
- MITTELMAN, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial
biofilms in fluid processing operations. *Journal of dairy science*, 81(10):2760–2764.
- MOCK, M. et FOUET, A. (2001). Anthrax. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1):647–
671.
- NAKAMURA, L. (1998). *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *International Journal of
Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3):1031–1035.
- NARANJO, M., DENAYER, S., BOTTELDOORN, N., DELBRASSINNE, L., VEYS, J.,
WAEGENAERE, J., SIRTAINÉ, N., DRIESEN, R. B., SIPIDO, K. R., MAHILLON, J.
et al. (2011). Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food
poisoning. *Journal of clinical microbiology*, 49(12):4379–4381.
- NICASTRO, J., WONG, S., KHAZAEI, Z., LAM, P., BLAY, J. et SLAVCEV, R. A. (2016).
Bacteriophage Applications-Historical Perspective and Future Potential. Springer.
- OBESO, J. M., MARTÍNEZ, B., RODRÍGUEZ, A. et GARCÍA, P. (2008). Lytic activity
of the recombinant staphylococcal bacteriophage ϕ h5 endolysin active against
Staphylococcus aureus in milk. *International journal of food microbiology*, 128(2):
212–218.
- O’FLYNN, G., ROSS, R., FITZGERALD, G. et COFFEY, A. (2004). Evaluation of
a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157 : H7.
Applied and Environmental Microbiology, 70(6):3417–3424.
- OLSON, M. E., CERİ, H., MORCK, D. W., BURET, A. G. et READ, R. R. (2002).
Biofilm bacteria : formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian
Journal of Veterinary Research*, 66(2):86.
- PAANANEN, A., MIKKOLA, R., SARENEVA, T., MATIKAINEN, S., HESS, M., AN-
DERSSON, M., JULKUNEN, I., SALKINOJA-SALONEN, M. et TIMONEN, T.
(2002). Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin
from *Bacillus cereus*. *Clinical & Experimental Immunology*, 129(3):420–428.
- PARDO-LOPEZ, L., SOBERON, M. et BRAVO, A. (2012). *Bacillus thuringiensis* insecti-
cidal three-domain Cry toxins : mode of action, insect resistance and consequences
for crop protection. *FEMS microbiology reviews*, 37(1):3–22.
- PATEL, J., SHARMA, M., MILLNER, P., CALAWAY, T. et SINGH, M. (2011). Inac-
tivation of *Escherichia coli* O157 : H7 attached to spinach harvester blade using
bacteriophage. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4):541–546.

- PERERA, M. L. et RANASINGHE, G. R. (2012). Prevalence of *Bacillus cereus* and associated risk factors in Chinese-style fried rice available in the city of Colombo, Sri Lanka. *Foodborne pathogens and disease*, 9(2):125–131.
- PIRES, D. P., MELO, L. D., BOAS, D. V., SILLANKORVA, S. et AZEREDO, J. (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Current opinion in microbiology*, 39:48–56.
- PÓSFAY-BARBE, K. M., SCHRENZEL, J., FREY, J., STUDER, R., KORFF, C., BELLI, D. C., PARVEX, P., RIMENSBERGER, P. C. et SCHÄPPI, M. G. (2008). Food poisoning as a cause of acute liver failure. *The Pediatric infectious disease journal*, 27(9):846–847.
- RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., DIERICK, K., SAMAPUNDO, S., BOTTELDOORN, N., MAHILLON, J. et HEYNDRIKX, M. (2008a). Risk profile of the *Bacillus cereus* group implicated in food poisoning. *Report for the Superior Health Council Belgium. CSS-HGR*, 8316.
- RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., OMBREGT, S.-A., JAASKELAINEN, E., SALKINOJA-SALONEN, M. et DEBEVERE, J. (2006). Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *Journal of food protection*, 69(4):847–852.
- RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., VERMEULEN, A., ANDJELKOVIC, M., FITZ-JAMES, I., DENON, Q., VÉRHE, R., DEBEVERE, J. *et al.* (2008b). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in applied microbiology*, 46(5):536–541.
- RAYA, R. R., OOT, R. A., MOORE-MALEY, B., WIELAND, S., CALLAWAY, T. R., KUTTER, E. M. et BRABBAN, A. D. (2011). Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157 : H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage*, 1(1):15–24.
- ROUX, A. et GHIGO, J.-M. (2006). Les biofilms bactériens. *Académie vétérinaire de France, Paris (FRA)*.
- SADEKUZZAMAN, M., YANG, S., MIZAN, M. F. R., KIM, H.-S. et HA, S.-D. (2017). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 78:256–263.
- SALMOND, G. P. et FINERAN, P. C. (2015). A century of the phage : past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12):777.
- SALVIN, P. (2012). *Etude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française : application aux piles à combustible microbiennes*. Thèse de doctorat, Antilles-Guyane.
- SCHMELCHER, M. et LOESSNER, M. J. (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 4(2):e28137.

- SCHMELCHER, M. et LOESSNER, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins : applications for food safety. *Current opinion in biotechnology*, 37:76–87.
- SCHMELCHER, M., SHABAROVA, T., EUGSTER, M. R., EICHENSEHER, F., TCHANG, V. S., BANZ, M. et LOESSNER, M. J. (2010). Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. *Applied and environmental microbiology*, 76(17):5745–5756.
- SCHOOLING, S., CHARAF, U., ALLISON, D. et GILBERT, P. (2004). A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms*, 1(2):91–99.
- SHARMA, M. et ANAND, S. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. *Food control*, 13(6-7):469–477.
- SHARMA, M., PATEL, J. R., CONWAY, W. S., FERGUSON, S. et SULAKVELIDZE, A. (2009). Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157 : H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *Journal of food protection*, 72(7):1481–1485.
- SHENG, H., KNECHT, H. J., KUDVA, I. T. et HOVDE, C. J. (2006). Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157 : H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8):5359–5366.
- SHIN, H., BANDARA, N., SHIN, E., RYU, S. et KIM, K.-p. (2011). Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901. *Research in microbiology*, 162(8):791–797.
- SHINAGAWA, K., KONUMA, H., SEKITA, H. et SUGII, S. (1995). Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 130(1):87–90.
- SIRINGAN, P., CONNERTON, P. L., PAYNE, R. J. et CONNERTON, I. F. (2011). Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 77(10):3320–3326.
- SLEPECKY, R. A. et HEMPHILL, H. E. (2006). The genus *Bacillus*—nonmedical. In *The prokaryotes*, pages 530–562. Springer.
- SONI, K. A. et NANNAPANENI, R. (2010a). Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *Journal of food protection*, 73(1):32–38.
- SONI, K. A. et NANNAPANENI, R. (2010b). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *Journal of Food Protection*, 73(8):1519–1524.
- SREY, S., JAHID, I. K. et HA, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries : a food safety concern. *Food control*, 31(2):572–585.
- STENFORS ARNESEN, L. P., FAGERLUND, A. et GRANUM, P. E. (2008). From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews*, 32(4):579–606.

- SULAKVELIDZE, A. (2013). Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13):3137–3146.
- SUTHERLAND, I. W., HUGHES, K. A., SKILLMAN, L. C. et TAIT, K. (2004). The interaction of phage and biofilms. *FEMS microbiology letters*, 232(1):1–6.
- TAUVERON, G., SLOMIANNY, C., HENRY, C. et FAILLE, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International journal of food microbiology*, 110(3):254–262.
- TEPLOVA, V. V., MIKKOLA, R., TONSHIN, A. A., SARIS, N.-E. L. et SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2006). The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicology and applied pharmacology*, 210(1-2):39–46.
- THALLINGER, B., PRASETYO, E. N., NYANHONGO, G. S. et GUEBITZ, G. M. (2013). Antimicrobial enzymes : an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnology journal*, 8(1):97–109.
- THORSEN, L., BUDDE, B. B., HENRICHSEN, L., MARTINUSSEN, T. et JAKOBSEN, M. (2009). Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *International journal of food microbiology*, 134(1-2):133–139.
- THORSEN, L., HANSEN, B. M., NIELSEN, K. F., HENDRIKSEN, N. B., PHIPPS, R. K. et BUDDE, B. B. (2006). Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 72(7):5118–5121.
- TODD, S. J., MOIR, A. J., JOHNSON, M. J. et MOIR, A. (2003). Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *Journal of bacteriology*, 185(11):3373–3378.
- Van der AUWERA, G. A., TIMMERY, S., HOTON, F. et MAHILLON, J. (2007). Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International journal of food microbiology*, 113(2):164–172.
- VANZIELEGHEM, T., MAHILLON, J., JEANMART, H., DEGAND, S., DUPONT, C. et LADEUZE, S. (2015). Fluidic device for studying of surface-dwelling multicellular layers and microbial biofilms. US Patent App. 14/426,177.
- VIAZIS, S., AKHTAR, M., FEIRTAG, J. et DIEZ-GONZALEZ, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157 : H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International journal of food microbiology*, 145(1):37–42.
- VILAS-BOAS, G., PERUCA, A. et ARANTES, O. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian journal of microbiology*, 53(6):673–687.

- WANNER, O. et BAUCHROWITZ, M. (2006). Les biofilms sont omniprésents. Article thématique.
- WHO (2015). Who estimates of the global burden of foodborne diseases : foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.
- WONG, A. C. L. (1998). Biofilms in food processing environments. *Journal of dairy science*, 81(10):2765–2770.
- ZHANG, D., CORONEL-AGUILERA, C. P., ROMERO, P. L., PERRY, L., MINOCHA, U., ROSENFELD, C., GEHRING, A. G., PAOLI, G. C., BHUNIA, A. K. et APPLGATE, B. (2016). The use of a novel Nanoluc-based reporter phage for the detection of *Escherichia coli* O157 : H7. *Scientific reports*, 6:33235.
- ZHANG, H., BAO, H., BILLINGTON, C., HUDSON, J. A. et WANG, R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin Lysz5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food microbiology*, 31(1):133–136.
- ZHANG, Y. et HU, Z. (2013). Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnology and bioengineering*, 110(1):286–295.
- ZHAO, X., ZHAO, F., WANG, J. et ZHONG, N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens : food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58):36670–36683.

Evaluation du potentiel du phage Deep-Blue pour le biocontrôle des souches émétiques du groupe *Bacillus cereus* dans la filière agro-alimentaire

Présenté par Mathilde Tournay

Résumé

Chaque année, les souches émétiques du groupe *B. cereus* sont responsables de nombreuses intoxications alimentaires. Bien que les symptômes occasionnés soient généralement bénins, certains cas mortels ont été rapportés et leur contrôle constitue dès lors une préoccupation majeure. Cependant, les méthodes conventionnelles de préservation des aliments présentent des inconvénients importants et ne sont pas toujours efficaces contre ces pathogènes si bien que la mise en place d'alternatives s'avère indispensable. Dans ce contexte, l'utilisation des bactériophages, ces virus capables d'infecter spécifiquement les bactéries, comme moyen de biocontrôle offre de nombreux avantages et suscite un intérêt croissant depuis quelques années.

Ce travail avait pour objectif d'évaluer le potentiel du phage Deep-Blue à contrôler trois souches émétiques psychrotolérantes de *B. cereus* à deux niveaux de la filière agro-alimentaire : tout d'abord, dans les produits finis en tant que biopréservateur, ensuite, comme agent de désinfection des biofilms pouvant se former à la surface des installations. Finalement, le dernier objectif visait à isoler d'autres *Myoviridae* pouvant être intégrés au sein d'un cocktail phagique.

Dans un premier temps, différentes matrices ont été contaminées artificiellement et traitées par Deep-Blue. Les résultats montrent que le phage a pu réduire la concentration en *B. cereus* sous le seuil de contamination initial dans du LB et dans du lait. Par ailleurs, le traitement a été en mesure de contrôler la croissance des bactéries dans du riz et à la surface du riz au lait. Ensuite, le potentiel de Deep-Blue comme agent antimicrobien contre des biofilms de *B. cereus* formés dans du LB et du lait a été appréhendé à l'aide d'un système de cellule à flux au sein duquel les bactéries peuvent adhérer. Deux traitements ont été appliqués : un préventif et un curatif. Deep-Blue s'est montré efficace pour prévenir la formation de biofilms à la fois dans le LB et le lait et des réductions allant jusqu'à 4 log CFU/mm² ont pu être obtenues par rapport au biofilm non traité. Le traitement curatif a permis quant à lui de diminuer la densité bactérienne de 2 log CFU/mm² dans le LB mais aucun effet significatif n'a pu être observé dans le lait. Le dernier objectif visait à isoler des *Myoviridae* en combinant la technique de l'enrichissement des échantillons en bactéries cibles suivie d'une PCR utilisant des amorces spécifiques à des phages similaires à Deep-Blue. Cependant, aucun *Myoviridae* n'a pu être isolé. Néanmoins, l'optimisation du design des amorces devraient permettre à l'avenir de cibler un nombre plus important de phages.

Ce travail a démontré le potentiel du phage Deep-Blue aussi bien comme agent de préservation des aliments qu'en matière de lutte contre les biofilms. Deep-Blue constitue un candidat propice à l'élaboration d'un cocktail destiné à diminuer la prévalence des d'intoxications alimentaires liées à la présence de *B. cereus* au sein de la filière agro-alimentaire.