



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 juin 2014

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à l'utilisation des phages dans les denrées alimentaires d'origine animale pour lutter
contre les *Listeria***

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 20 juin 2013 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) et la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis sur l'utilisation des phages dans les denrées alimentaires d'origine animale pour lutter contre les *Listeria*.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le statut réglementaire des bactériophages n'est pas défini au niveau européen. Depuis 2006, plusieurs autorisations ont été accordées à l'utilisation de bactériophages comme moyen de maîtrise dans l'industrie agro-alimentaire, notamment aux Etats-Unis, au Canada et en Nouvelle Zélande.

En 2009, L'Efsa a rendu un avis sur le mode d'action des bactériophages. Cet avis indique qu'il est impossible de conclure si les bactériophages permettent ou non de protéger contre la recontamination des denrées alimentaires par des pathogènes bactériens ; L'Efsa recommande également la rédaction d'un document d'orientation relatif à la soumission des données pour l'évaluation de ce type de traitement. En 2012, l'Efsa a évalué l'utilisation des bactériophages anti *Listeria* pour la décontamination des poissons. Les données soumises à évaluation n'ont pas permis de conclure à l'efficacité du traitement.

L'Anses est saisie sur l'intérêt et les limites liés à l'usage des bactériophages dans les denrées alimentaires d'origine animale. La saisine comporte deux groupes de questions :

Partie 1 :

- L'efficacité du bactériophage LISTEX P100 (sur la base du dossier technique et de la bibliographie) sur la réduction de *L. monocytogenes* dans les fromages et autres denrées alimentaires d'origine animale testés ;
- L'utilisation de ce type de bactériophage aux conditions préconisées par le fabricant constitue-t-elle, en complément des bonnes pratiques d'hygiène, un moyen de maîtrise supplémentaire du danger *Listeria* ?
- Quels seraient les facteurs limitant l'action des bactériophages en agroalimentaire ?

- Le bactériophage peut-il constituer un vecteur de matériel génétique dans des phénomènes non maîtrisés (acquisition de pathogénicité des bactéries par exemple) ?
- A-t-on (ou peut-on avoir) des garanties sur le maintien de la spécificité des bactériophages et sur la pérennité de leur absence de pathogénicité ?

Partie 2 :

Quelles sont les interactions possibles entre les bactériophages utilisés dans les denrées d'origine animale et les flores internes du consommateur, notamment en termes d'écologie microbienne et de risque de transferts de matériels génétiques inadaptés (plasmides) ? Quels sont les impacts avérés et/ou potentiels sur les flores environnementales ?

Le présent avis porte sur la 1^{ère} partie de la saisine.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le(s) comité(s) d'experts spécialisé(s) (CES) «Evaluation des risques biologiques dans les aliments» (BIORISK) sur la base d'un rapport initial rédigé par quatre rapporteurs. L'expertise s'est appuyée sur le dossier technique du pétitionnaire et des articles scientifiques référencés.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1. Présentation générale du bactériophage P100

- Classification et structure du phage

Le phage P100 appartient à l'ordre des *Caudovirales* et à la famille des *Myoviridae*. Cette famille de phages possède comme caractéristique générale d'avoir une tête et une queue contractile. La queue, composée par un « core » central construit autour d'une gaine hélicoïdale contractile, est séparée de la tête par un collet. Généralement cette famille de phages possède une tête plus grande, plus d'ADN et un poids moléculaire supérieur par rapport aux autres familles de phages. Les phages de cette famille sont souvent sensibles à la congélation-décongélation et aux chocs osmotiques. Les différents genres de la famille des *Myoviridae* sont différenciés par leur organisation génétique, le mécanisme de réplication de l'ADN et la présence de bases ou d'ADN polymérase inhabituelle.

Klump et al. (2008) placent le phage P100 dans le groupe des SPO1-like myovirus (*Bacillus subtilis* phage SPO1) sur des bases de morphologie, de bactéries hôtes (Gram+ à faible GC %), d'un spectre d'hôte large, de leur caractère strictement virulent et de la similarité dans leurs séquences d'ADN. Le phage le plus proche d'un point de vue morphologique et d'organisation génétique est le phage A511.

Le phage P100 a une queue longue (198nm) contractile et non flexible et une tête icosaédrique (90nm). Klump *et al.* (2008) montrent pour la première fois au microscope électronique de longues fibres associées à la partie terminale de la queue en plus des fibres courtes qui sont plus facilement visibles. Le phage P100 est constitué d'un ADN double brin de 131384 pb (137619 pb pour A511) avec des séquences terminales redondantes, invariables et non cohésives de 6kb (3,1kb pour A511). Sur l'ensemble des critères les phages P100 et A511 pourraient être classés dans la sous-famille des *Spounavirinae*.

- Hôtes spécifiques

P100, comme A511, a un spectre d'hôte large dans le genre *Listeria* (P100 ayant cependant un spectre plus large que A511). Plus de 95% des 250 souches de *Listeria* testées (*Listeria monocytogenes* serogroupe 1/2, 4, *Listeria ivanovii* 5, et vraisemblablement (données non publiées) *L. innocua* 6) sont sensibles à ce phage (Loessner *et al.* cité par Carlton *et al.* 2005). Une étude OFIMER en 2011, utilisant un test in vitro, montre que 78% des 42 souches de *L. monocytogenes* isolées de saumons et truites fumés sont sensibles au

phage P100, tandis que 12% sont classées comme intermédiaires et 10% comme résistantes. Aucun autre genre bactérien ne semble être affecté, ce qui assure une maîtrise du traitement (Carlton et al., 2005).

Cependant, il n'existe pas d'étude sur la sensibilité au phage P100 des principaux complexes clonaux obtenus par MLST (MultiLocus Sequence Typing) et des principaux clones épidémiques constituant la structure de la population des *Listeria monocytogenes*. 95% des souches humaines de *L. monocytogenes* appartiennent au séro groupe 1/2 et au sérotype 4b (Doumith et al., 2004) et la majorité des souches épidémiques appartiennent aux sérotypes 1/2a et 4b. Cependant, aucun lien n'a été établi entre sérotype et virulence de *Listeria monocytogenes* en dehors des sérotypes 3a, 3b, 3c, 4c, 4d, 4e qui sont rarement impliqués dans des cas humains (Liu et al., 2007).

- Cycle d'infection

La majorité des phages connus (>400 phages) du genre *Listeria* s'intègrent dans l'ADN de la cellule hôte (phages tempérés) (Carlton et al., 2005). Pour ces phages, une cassette au niveau de l'ADN contrôle la lysogénie. Cette cassette est absente dans le génome du phage P100 et A511. Le cycle de ces phages est donc purement lytique.

Les longues et les courtes fibres caudales reconnaissent des récepteurs bactériens spécifiques (peptidoglycane, acides teichoïques) qui permettent l'adsorption sur la paroi. La queue contractile permet l'injection de l'ADN dans la bactérie. Le génome du phage peut alors être transcrit en ARNm et les protéines phagiques sont exprimées. Les gènes précoces codent notamment les fonctions de réplication et réparation de l'ADN. Parmi les gènes plus tardifs on trouve des régions dédiées aux protéines structurales qui sont exprimées puis des gènes de lyse.

Les protéines phagiques permettent ainsi la formation de nouvelles particules phagiques et la lyse cellulaire. En effet, une enzyme particulière dégradant la paroi de la bactérie est synthétisée pour lyser la bactérie en fin de cycle. Tout comme les récepteurs, cette autolysine est spécifique au genre *Listeria*. Aucun effet de cette enzyme n'est observé sur 20 espèces de genres très différents comme *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Brochothrix* (Schmelcher et al. 2010).

Le cycle d'infection du phage aboutira à la lyse bactérienne ainsi qu'à la production de bactériophages.

- Mode d'action et conditions d'application dans les aliments

La présence d'eau libre semble nécessaire pour que le phage puisse s'orienter et atteindre sa cible. L'état physiologique de la bactérie est également un facteur clé. L'infection peut en effet dépendre du nombre de récepteurs phagiques exprimés en surface qui peut ou non favoriser l'adsorption et donc la pénétration du phage. L'activité métabolique de la bactérie influence aussi directement la cinétique de réplication des phages. L'idéal pour la réplication du phage est donc la phase exponentielle mais certains phages peuvent infecter les bactéries en phase stationnaire. Le phage P100 a été isolé de l'environnement agro-alimentaire (Loessner M.J., données non publiées) et les études menées sur ce phage montrent que celui-ci est capable d'infecter *Listeria* dans les matrices alimentaires quelle que soit l'activité métabolique de la bactérie. La cinétique de production des phages est simplement moins rapide.

Une fois que le phage est adsorbé sur la matrice alimentaire celui-ci devient incapable d'infecter la bactérie hôte. C'est ce qui pourrait être décrit comme de « l'inactivation par adsorption ». La diffusion limitée et l'inactivation par adsorption obligent à appliquer les phages en large excès par rapport à la bactérie cible : MOI (multiplicity of infection) de l'ordre de 10^4 correspondant par exemple à 10^7 phages /cm² pour 10^3 UFC/cm² de *Listeria*. Des concentrations allant jusqu'à 10^9 UFP/g pourraient être utilisées selon le dossier technique.

Le phage P100 est sensible à la congélation, aux enzymes protéolytiques, à l'acidité, au sel, aux UV et aux températures > 50°C (Greer, 2005; Hudson et al., 2005).

3.2. Efficacité du bactériophage Listex P100

3.2.1. Données d'efficacité sur les fromages et autres produits d'origine animale

L'ensemble des études démontrent que l'action des bactériophages sur *Listeria* est très dépendante du type de matrice, de la dose de phage et de la concentration initiale en bactéries (Sulakvelidze, 2013). Selon Sillankorva et al. (2012), chaque association phage/matrice/bactérie est un cas unique en termes d'efficacité et de conditions expérimentales.

A titre d'exemple, l'efficacité du traitement a été démontrée sur des « hot dogs » (*L. monocytogenes* inoculé à 10^3 UFC/g n'est plus détectable 6h après un traitement avec du phage P100 et A 511 à une concentration de $3 \cdot 10^8$ PFU/g) (Guenther et al., 2009) et sur de la viande hachée (Annexe du dossier). Sur du saumon fumé ou le jambon cuit, le traitement aboutit à une réduction décimale de la concentration en *L. monocytogenes* quelle que soit la durée choisie pour des échantillonnages échelonnés entre 6h et 6 jours de conservation. Un résultat intermédiaire est constaté sur des fruits de mer. Ces auteurs signalent que les différences dans la composition, le pH et la force ionique de ces produits pourraient être à l'origine des différences constatées. En fait, il semble que ce soient les produits présentant les plus grandes surfaces exposées, les plus difficiles à traiter de manière régulière, qui donnent des résultats médiocres ou limités avec ce procédé et cela que le produit soit d'origine animale (fruits de mer, jambon, roastbeef, tranche de dinde) ou végétale (salades ou choux).

L'effet du phage P100 est clairement dose dépendant. Les phages pouvant difficilement se propager sur les matrices alimentaires solides, l'efficacité du traitement dépendra de la quantité initiale de phage ajoutée et non pas de la quantité de phage produite par les bactéries dans l'aliment. L'administration de $1.5 \cdot 10^8$ UFP/mL de phage sur du munster ($2 \cdot 10^6$ /cm²) permet d'obtenir 2 à 3 réductions décimales de *Listeria* alors qu'avec 10^9 UFP/mL ($6 \cdot 10^7$ /cm²), *Listeria* n'est plus détectée après traitement. La contamination initiale en *Listeria* est de 20 UFC/cm² et est de 10^5 UFC/cm² après 10-16 jours avec une dose de phage de 10^8 UFP/ml. En effet, une fois que le phage est adsorbé, les bactéries ayant échappé au traitement sont capables de croître dans certains cas. Il est également souligné que l'importance de la population initiale de *L. monocytogenes* est un facteur favorable à l'efficacité du traitement puisque le phage se multiplie à l'intérieur des bactéries infectées (Greer, 2005; Hudson et al., 2005). Ceci est d'autant plus vrai dans des matrices liquides. Une flore annexe en forte concentration dans le produit traité peut également interférer avec l'action du phage (Greer, 2005; Hudson et al., 2005).

Les conditions d'utilisation des phages (concentrations initiales, modalités d'application), les matrices ciblées (nature et composition physico-chimique) et les données d'efficacité relevées dans la littérature sont extrêmement diverses. Pour chaque application, il convient d'adapter et de valider la dose du phage à utiliser qui peut varier d'un à plusieurs log d'UFP/ml selon les aliments.

3.2.2. Résistance des bactéries

De par la diversité des mécanismes de résistance décrits chez *Listeria* (CRISPR-Cas, restriction-modification, multiplication abortive etc.), il est possible que des résistances bactériennes apparaissent pour ce phage.

Il est indiqué dans le dossier que, parmi les 5% des souches considérées comme résistantes au phage, le mécanisme de résistance était principalement relié à un mécanisme d'infection abortive. Dans ce cas la bactérie infectée par un phage programme sa propre lyse empêchant de ce fait la réplication du phage en question. Que le cycle soit productif ou abortif, cela permet finalement d'aboutir à l'objectif souhaité c'est-à-dire la lyse bactérienne.

Un système de restriction-modification de type II a été décrit pour une souche épidémique issue du clone II de *Listeria monocytogenes*. Ce système, exprimé pour des températures inférieures à 25°C rend la souche insensible à l'infection de phages. Il n'est pas exprimé pour des températures supérieures à 25°C et la bactérie est donc sensible aux phages à 37°C par exemple (Denes & Wiedmann, 2014).

Un système CRISPR-Cas a aussi été décrit chez *Listeria*. Le Système CRISPR-Cas confère à la bactérie une immunité adaptative qui la protège contre l'invasion des phages et des plasmides. En étudiant les souches séquencées de *L. monocytogenes* dont celles du sérotype 1/2 et du sérotype 4b, Sesto et al. (2014) ont identifié un élément CRISPR (Rlib). Cet élément contient des « spacers¹ » qui sont dirigés entre autre contre des phages de *Listeria*, en particulier les phages virulents A115, P35, P70, et P100 (Sesto et al., 2014).

Des mécanismes de résistance dans les bactéries hôtes du phage P100 existent donc et il conviendrait d'étudier leurs taux d'apparition sous une pression de sélection. Même si le mécanisme de résistance aux phages des sérotypes 1/2c et 3 reste inconnu, les acides teichoïques de la paroi bactérienne et la glucosamine en particulier ont été démontrés comme des récepteurs des listeriaphages, et l'absence ou l'altération de ces acides teichoïques peuvent conduire à la résistance aux phages (Wendlinger et al., 1996).

Aucune bactérie initialement sensible puis devenue résistante à l'infection du phage P100 n'a pu être décrite pour l'instant dans les matrices alimentaires artificiellement contaminées. La concentration en *Listeria* dans

¹ Séquence d'ADN non transcrit, séparant les gènes à l'intérieur des unités répétées

les fromages est souvent faible et donc la probabilité d'apparition de mutants ponctuels résistants au phage est réduite. Comme cela a déjà été abondamment décrit dans la littérature notamment chez les phages infectant les bactéries lactiques, il est aussi vraisemblable que le bactériophage pourra s'adapter à la nouvelle souche résistante (Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013). La probabilité d'apparition de variants de *Listeria* résistants au phage est d'autant plus importante que le nombre de cellules de *Listeria* est important. Par conséquent le phage doit être appliqué uniquement sur les aliments contaminés et en aucun cas se retrouver ailleurs dans l'environnement agroalimentaire où il pourrait infecter des biofilms de *Listeria* qui seraient plus propices à l'apparition de ces variants. Une étude permettant d'évaluer l'apparition de variants résistants aux phages aurait pu être réalisée en laboratoire en cultivant des souches de *Listeria* avec le phage P100 plutôt qu'uniquement sur des aliments où le phage est finalement inactif (car adsorbé) lors de la croissance de la bactérie. De ce fait aucune bactérie résistante n'est observée car la croissance s'est effectuée sans la pression de sélection du phage.

3.3. Innocuité du bactériophage P100 et des bactéries hôtes

- Toxicité par voie orale et allergénicité

Carlton *et al.* (2005) ont démontré l'innocuité du phage P100 chez le rat. L'administration du phage à ces rongeurs à des doses qui sont 10 000 fois supérieures à celles que l'homme ingérerait, ne montre aucun impact ni sur leur poids ni sur des coupes d'intestin. D'autres études démontrent l'innocuité par voie orale des phages. Par exemple, l'administration à des humains du phage T4 n'a montré aucun anticorps sérique contre les phages (Bruttin & Brüssow, 2005). Ils ne semblent donc pas être absorbés au niveau de l'intestin ou induire de réaction immunologique décelable. Le phage T4 est détecté dans les selles dès le premier jour après administration à des humains. Dans ce cas *E. coli*, hôte de ce phage, est présent dans le tractus intestinal. Il n'est donc pas possible de déduire si le phage est excrété de manière passive suite à l'ingestion ou si le phage est réellement capable de se répliquer dans le microbiote digestif.

L'alignement des séquences des 174 protéines du phage P100 dans la base de données des allergènes alimentaires donne un seul résultat pour la protéine gp71 (ORF71). Les homologies concernent une petite partie de la portion Ct d'une protéine du blé. Les similitudes observées ne semblent pas donner lieu à des réactions immunologiques croisées.

- Lysogénie

La lysogénie est répandue dans le genre *Listeria* mais aucune corrélation n'a été faite à ce jour entre la présence de prophages et la survenue de clones épidémiques (Klumpp & Loessner, 2013). Les phages tempérés de *Listeria* codent une intégrase qui contrôle l'insertion/excision de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien. Il s'agit essentiellement de sérine ou de tyrosine recombinase. Selon les études scientifiques et le dossier du pétitionnaire, la structure génétique du génome du phage P100 ne suggère aucune présence possible d'un module lysogénique dont le gène codant l'intégrase.

- Capacité de transduction

Lors d'une infection phagique, du matériel génétique bactérien incluant potentiellement des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques peut être transféré à la bactérie sur laquelle le phage est adsorbé: c'est la transduction. Celle-ci peut être spécialisée (le prophage emporte un segment d'ADN bactérien au cours de son excision) ou généralisée (encapsidation d'ADN bactérien par les particules phagiques).

Seuls les phages tempérés sont capables de transduction spécialisée mais la transduction généralisée reste possible lors d'un cycle lytique. Dans ce dernier cas, le mécanisme d'empaquetage du génome dans la tête du phage est le facteur clé. Des phages capables de circulariser leur génome lors de l'entrée dans la cellule grâce à des extrémités cohésives peuvent réaliser ce type de transduction car la terminase phagique responsable de l'empaquetage n'exprime qu'une très faible spécificité pour l'ADN, elle peut donc empaqueter par erreur des fragments de l'ADN bactérien. A l'inverse, les phages dont l'ADN possède des extrémités invariables redondantes non cohésives sont incompatibles avec une transduction car la terminase reconnaît spécifiquement l'ADN phagique. Le phage P100 faisant partie de cette dernière catégorie, le transfert de gènes bactériens par transduction semble peu probable (Klumpp & Loessner, 2013).

- Existence de facteurs de virulence

Parmi les nombreux phages de *Listeria* qui ont été séquencés, aucun lien avec les facteurs de virulence de *Listeria* n'a pu être clairement identifié à ce jour (Klumpp & Loessner, 2013). Néanmoins, une étude récente

met en évidence le rôle du prophage de *L. monocytogenes* A118-like intégré dans le gène *comK* dans la régulation de l'échappement aux phagolysosomes de l'organisme durant l'infection (Rabinovich et al., 2012). Une autre étude suggère l'implication d'un prophage intégré dans le gène *comK* dans la persistance de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de production (Verghese et al., 2011). Ce prophage est entre autre présent dans des souches épidémiques (Knabel et al., 2012).

Le génome du phage P100 a été déposé sur Genbank sous la référence DQ004.855. 174 cadres ouverts de lecture (ORF) sont identifiés avec en plus 18 ARNt. Seuls 25 gènes ont pu être associés à des fonctions connues, les autres constituent de nouvelles entrées dans la base de données. Aucune fonction n'a pu être associée à des facteurs de pathogénicité ou de virulence connus pour *Listeria monocytogenes* et aucun autre microorganisme pathogène connu (Carlton et al., 2005). Les bases de données s'étant considérablement étoffées depuis 2005, ce travail de recherche de séquences homologues chez les microorganismes pathogènes (dont *Listeria*) devrait être à présent réitéré.

- Possibilité de libération d'endotoxines de *L. monocytogenes* lors de la lyse bactérienne

A ce jour, la lyse bactérienne de *L. monocytogenes* ne provoque pas de libération d'endotoxines bactériennes. Cependant, il est suspecté que le mécanisme des gastro-entérites à *L. monocytogenes* implique une ou des toxines non décrites à ce jour.

- Innocuité de la souche de propagation (*L. innocua*)

Le dossier technique fait état de l'utilisation pour propager le phage P100 d'une souche de *L. innocua* qui n'est pas complètement séquencée à ce jour. Il est indispensable de séquencer cette souche pour estimer la présence des prophages et les risques induits par leur présence.

La souche CLIP 11262 de *Listeria innocua* qui est entièrement séquencée et annotée peut contenir jusqu'à 6 prophages alors que la souche EGD-e peut en contenir parfois 2 et la souche du serogroupe 3 aucun (WSLC1001) (Klumpp & Loessner, 2013). L'utilisation pour la propagation de souches bactériennes contenant un ou plusieurs prophages expose au risque d'une production simultanée de phage P100 et d'un autre phage qui sera cette fois-ci tempéré. De même, il peut se produire des recombinaisons entre le P100 et un ou plusieurs prophages conduisant à l'apparition de nouveaux variants.

3.4. Limites/ interrogations sur les conséquences de l'usage des bactériophages

- Au regard des doses utilisées, les effets potentiels sur le microbiome intestinal et l'écosystème de *Listeria*

Vongkamjan et al., (2012) ont étudié 134 ensilages de fermes laitières dont 47,8% étaient positifs pour les listériophages (140 phages identifiés) avec des concentrations de plus de $1,5 \times 10^4$ PFU/g. Les listériophages sont donc abondants dans les ensilages et agissent naturellement contre les sérogroupes 4 des *L. monocytogenes*. Les souches de *L. monocytogenes* contaminant le lait sont donc déjà naturellement en contact avec des concentrations élevées et une diversité de phages, chacun ayant une diversité d'hôtes.

Compte tenu de la MOI très élevée utilisée dans les aliments, il est peu probable que des souches de *Listeria* résistantes apparaissent lors du traitement. Néanmoins, la concentration utilisée étant très importante (10^9 UFP/mL), des quantités non négligeables de phages peuvent se retrouver dans l'environnement proche des sites de production, dans les selles des personnes qui consomment l'aliment puis dans l'environnement en général. C'est donc dans ces environnements secondaires non maîtrisés qu'il peut y avoir une émergence de souches résistantes. Il est donc légitime de se poser des questions sur l'interaction avec la flore intestinale et le devenir des phages une fois qu'ils sont excrétés dans l'environnement.

Chibeu et al. (2013) ont montré que les phages désorbés de la matrice retrouvent leur capacité à infecter une bactérie. Ainsi ces auteurs soulignent que le phage est stable pendant près de 28 jours dans de la viande à 4°C ou 10°C. Les différents éléments de la littérature et des données de producteurs de phages ne permettent pas d'estimer de façon satisfaisante l'ensemble des conditions qui permet la désorption des phages. Il est possible que lors de l'ingestion des aliments contenant de grandes quantités de phages adsorbés ceux-ci soient libérés de la matrice retrouvant donc ainsi leur capacité à infecter leur hôte. Des phages de la même famille (phage T4) résistent à l'acidité gastrique et sont retrouvés dans les selles des personnes traitées par voie orale avec ce phage.

Les conséquences sur le microbiote intestinal semblent limitées puisque *Listeria* n'est pas un genre bactérien reconnu comme faisant partie de la flore commensale de l'intestin. Il existe peu d'études sur le

portage asymptomatique de *Listeria* et il s'agit plus d'un portage transitoire lié à l'ingestion d'un aliment contaminé.

Dans l'environnement agroalimentaire, la présence de phages impacterait la majorité des souches (pathogènes ou non) de *Listeria* en tant que pression de sélection et pourrait libérer des niches écologiques pour des souches de *Listeria* pathogènes et résistantes au phage. L'écologie entre les sérogroupes et les sérotypes est mal connue. Il n'est donc pas possible de prévoir les conséquences d'une diminution de certains sérogroupes ou sérotypes sensibles aux phages sur le comportement des autres groupes plus pathogènes ou résistants aux phages.

- Possibilité de conversion lysogénique du phage P100

La majorité des phages de *Listeria* sont tempérés. Le phage P100 et le phage A511 qui sont lytiques ont-ils évolué à partir d'un ancêtre tempéré après avoir perdu la capacité à intégrer leur génome à celui de la bactérie ou s'agit-il de phages lytiques très différents d'un point de vue génétique par rapport aux phages lysogènes ? En d'autres termes est-il possible que ces phages retrouvent leur caractère lysogénique par l'intégration, via des éléments génétiques mobiles, d'une cassette qui contrôle la lysogénie (module lysogénique) ? Des éléments de réponse pourraient être apportés par des arbres phylogénétiques des phages de *Listeria* s'ils existent.

Au regard des interrogations soulevées, il s'avère nécessaire de disposer des compléments d'information de la part du pétitionnaire :

- Des données d'efficacité relatives à l'usage du phage P100 en conditions industrielles sur des produits naturellement contaminés (le traitement est autorisé depuis 2006 dans certains pays).
- Des informations sur l'apparition de bactéries résistantes en conditions industrielles dans l'aliment ou dans l'environnement de production. Une recherche de variants de *Listeria* résistants au phage P100 dans les entreprises ayant utilisées ce phage recherche a-t-elle été effectuée ? si oui, quels sont les résultats ?
- Des données expérimentales sur les conditions permettant la sélection de bactéries résistantes (p. ex : dose de phage, concentration en bactéries): Est-il possible, et à quelle fréquence, d'isoler des variants de *Listeria* résistants au phage P100 en cultivant la bactérie en milieu liquide en présence du phage? Quelles sont les caractéristiques de ces variants ?
- Des informations sur les modalités de production de nouveaux cocktails de phages en cas de diminution de l'efficacité des bactériophages.
Existe t-il d'autres phages ayant un spectre d'adsorption tout aussi large que celui du P100 ? Existe t-il une bonne diversité de phages pouvant être utilisés en cocktail pour lyser toutes les souches de *Listeria monocytogenes* ? Ces phages peuvent-ils être produits à partir de souches non lysogènes ou curées de leurs prophages ?
- Des données expérimentales permettant d'évaluer la sensibilité des phages à l'acidité gastrique (expérimentations sur l'excrétion fécale des phages P100 chez des personnes qui consomment les produits traités).

CONCLUSIONS DU CES BIORISK

- **L'efficacité du bactériophage LISTEX P100 (sur la base du dossier technique et de la bibliographie) sur la réduction de *L. monocytogenes* dans les fromages et autres denrées alimentaires d'origine animale testés ;**

Les résultats des études présentées démontrent l'efficacité du Listex P100 pour la réduction de la *L. monocytogenes* dans les denrées testées. L'efficacité du bactériophage LISTEX P100 semble dépendante de la concentration utilisée et du choix de l'étape du process où il est inoculé. Chaque catégorie d'aliments semble avoir une dose spécifique d'application ce qui nécessite une validation de l'efficacité du traitement pour une production donnée. Selon le type de produits traités, une application ou plusieurs applications répétées peuvent être nécessaires pour atteindre l'effet antimicrobien désiré.

- **L'utilisation de ce type de bactériophage aux conditions préconisées par le fabricant constitue-t-elle, en complément des bonnes pratiques d'hygiène, un moyen de maîtrise supplémentaire du danger *Listeria* ?**

L'utilisation du P100 peut constituer un outil additionnel qui peut être utilisé pour la maîtrise du danger *Listeria* dans les aliments mais pas dans l'environnement agro-alimentaire ou en cas de recontamination du produit. Il peut compléter les bonnes pratiques de fabrication et l'HACCP mais ne peut être considéré comme un moyen d'allonger la durée de vie des produits ou d'obtenir un produit complètement assaini en cas de contamination par *Listeria* d'un atelier de production. Il est possible en outre que ce traitement n'ait pas réellement d'effet notamment dans le contexte où la contamination par *Listeria* se produit en aval du traitement par les phages ou dans certaines matrices particulières.

- **Quels seraient les facteurs limitant l'action des bactériophages en agroalimentaire ?**

La teneur en eau libre d'un aliment et l'état libre ou adsorbé du phage sont des points clés de son activité. Les phages P100 n'ont aucun effet une fois adsorbés sur la matrice en cas de recontamination post-traitement par *Listeria*. Le phage désorbé de la matrice alimentaire peut redevenir actif chez l'hôte ou dans l'environnement.

Compte tenu des concentrations utilisées, l'émergence de bactéries résistantes au phage P100 dans l'environnement agroalimentaire est fort probable et pourrait à long terme conduire à une diminution de l'efficacité du traitement. L'utilisation de cocktails de phages ou la rotation des phages sont des stratégies pouvant permettre de limiter le développement de souches résistantes aux phages.

- **Le bactériophage peut-il constituer un vecteur de matériel génétique dans des phénomènes non maîtrisés (acquisition de pathogénicité des bactéries par exemple) ?**

Dans les matrices alimentaires cela semble peu probable à la vue de l'ensemble des données. En revanche dans l'environnement proche des sites industriels, chez l'hôte ou dans l'environnement après relargage via les eaux usées cela n'est pas impossible.

- **A-t-on (ou peut-on avoir) des garanties sur le maintien de la spécificité des bactériophages et sur la pérennité de leur absence de pathogénicité ?**

Le phage P100 comme tous les phages de *Listeria* semble spécifique du genre. Les phages constituent les organismes les plus abondants sur terre (Sulakvelidze, 2013). Malgré cela aucun phage n'a jamais provoqué d'infection chez l'homme et aucune séquence de phage n'a pu être identifiée dans le génome humain. Des phages ont déjà été administrés à l'homme dans le cadre de phagothérapies (voie orale ou rectale, en topique) sans aucun effet négatif pour la santé. Les effets négatifs potentiels de l'utilisation des phages en agro-alimentaire ne peuvent donc être que secondaires par modification de la flore intestinale, de la bactérie hôte ou de l'équilibre de l'écosystème dans lequel *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* évoluent.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES BIORISK.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Bactériophage ; *Listeria* ; procédés de décontamination

BIBLIOGRAPHIE

- Bruttin, A., Brüssow, H., 2005. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2874–2878.
- Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., Loessner, M.J., 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 43, 301–312
- Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P.M., Kropinski, A.M., Balamurugan, S., 2013. Efficacy of bacteriophage LISTEXTMP100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 208–214.
- Denes, T., Wiedmann, M., 2014. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 45–49.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819–3822.
- Greer, G.G., 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 68, 1102–1111.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M.J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 93–100.
- Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G., Greening, G., 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. Food Prot.* 68, 426–437.
- Klumpp, J., Dorscht, J., Lurz, R., Biemann, R., Wieland, M., Zimmer, M., Calendar, R., Loessner, M.J., 2008. The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 190, 5753–5765.
- Klumpp, J., Loessner, M.J., 2013. *Listeria* phages: Genomes, evolution, and application. *Bacteriophage* 3, e26861.
- Knabel, S.J., Reimer, A., Verghese, B., Lok, M., Ziegler, J., Farber, J., Pagotto, F., Graham, M., Nadon, C.A., the Canadian Public Health Laboratory Network (CPHLN), Gilmour, M.W., 2012. Sequence Typing Confirms that a Predominant *Listeria monocytogenes* Clone Caused Human Listeriosis Cases and Outbreaks in Canada from 1988 to 2010. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1748–1751.
- Kuenne, C., Billion, A., Mraheil, M.A., Strittmatter, A., Daniel, R., Goesmann, A., Barbuddhe, S., Hain, T., Chakraborty, T., 2013. Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics* 14, 47.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 101–115.
- Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Nir-Paz, R., Herskovits, A.A., 2012. Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell* 150, 792–802.
- OFIMER, 2011. Use of phages to control *Listeria monocytogenes* in smoked salmon: summary of results – January 2011, 16 pp.
- Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., Moineau, S., 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 675–687.

Sesto, N., Touchon, M., Andrade, J.M., Kondo, J., Rocha, E.P.C., Arraiano, C.M., Archambaud, C., Westhof, É., Romby, P., Cossart, P., 2014. A PNPase dependent CRISPR System in *Listeria*. *PLoS Genet.* 10, e1004065.

Sillankorva, S.M., Oliveira, H., Azeredo, J., 2012. Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *Int. J. Microbiol.* 2012, 1–13.

Sulakvelidze, A., 2013. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens: Bacteriophages and food safety. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3137–3146.

Verghese, B., Lok, M., Wen, J., Alessandria, V., Chen, Y., Kathariou, S., Knabel, S., 2011. comK Prophage Junction Fragments as Markers for *Listeria monocytogenes* Genotypes Unique to Individual Meat and Poultry Processing Plants and a Model for Rapid Niche-Specific Adaptation, Biofilm Formation, and Persistence. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3279–3292.

Vongkamjan, K., Switt, A.M., den Bakker, H.C., Fortes, E.D., Wiedmann, M., 2012. Silage collected from dairy farms harbors an abundance of listeriaphages with considerable host range and genome size diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8666–8675.

Wendlinger, G., Loessner, M.J., Scherer, S., 1996. Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiol. Read. Engl.* 142 (Pt 4), 985–992.