

*Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier*

**DEVELOPPEMENT D'UN KIT D'IMMUNO-DETECTION RAPIDE ET
SPECIFIQUE DE *L. MONOCYTOGENES* SUR UNE MEMBRANE A
BASE DE BIOPOLYMERE POUR LES SURFACES EN INDUSTRIE
ALIMENTAIRE**

Par
Marie-Christine ETTY

**Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie
appliquées**

Jury d'évaluation

Président du jury et Examineur interne	Jonathan Perreault Microbiologie appliquée INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	George Szatmari Département de microbiologie, infectiologie et immunologie Université de Montréal
Directeur de recherche	Monique Lacroix Microbiologie appliquée INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Sabato D'Auria Laboratoire de détection moléculaire Institute of Food Science -CNR (Italie)

AVANT-PROPOS

À grand-maman Denise Cléroux, une femme exceptionnelle et une grand-mère aimante qui m'a beaucoup encouragée durant ma maîtrise.

À mes parents, Alain et Georgette ETTY qui se sont sacrifiés pour mon éducation et qui ne cessent de m'encourager à développer mon savoir.

À mon époux, Mathieu Gendron, ma source de motivation, mon écoute et mon modèle de persévérance en recherche.

Philippiens 4 verset 13 : <<Je puis tout par celui qui me fortifie.>>

REMERCIEMENTS

Je voudrais à travers mon mémoire remercier le professeur Monique Lacroix pour sa confiance, son encadrement, ses conseils et ses encouragements.

Merci également au Professeur Sabato D'Auria, à Stéphane Salmieiri, Majid Jamshidan et Behnoush Maherani pour leurs disponibilités et leurs conseils tout au long de ce projet de recherche.

Mes remerciements vont à l'endroit de mes frères, Thomas, Yves-Antoine, Arthur, Christian, Emmanuel et Yann-axel et ma belle-famille, Alain, Lucie, Simon, Pierre et grand-papa Roland. Merci pour vos encouragements et votre soutien constant.

Je voudrais également remercier mes ami(e)s Anne, Manassé, véronique, Kim-Ly, Anne-Tifaine et Yves-Daniel, mes collègues de recherche Afia, Julie, Maria-Paula, Amina, Olivier, Dali et mes stagiaires Mayra, Adeline, Laurine et Eunice. Merci pour vos conseils, votre disponibilité, vos solutions, votre aide et vos encouragements.

Enfin, j'aimerais dire merci au personnel du centre Armand-Frappier, Michel Courcelle, Diane Sauvé, Karine Labelle, Josée Labonne, Josée Bourdages, Anne Phillipon, Anastasia Nikolakakis et Louise Savard pour votre disponibilité et votre aide à la résolution des problèmes que j'ai pu rencontrer tout au long de ces années en recherche.

Sans vous tous, ces années en maîtrise n'auraient pas été si enrichissantes.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ÉQUATIONS.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	16
CHAPITRE I: SYNTHÈSE.....	18
1. La sécurité sanitaire des aliments.....	18
1.1. Définition et importance de la sécurité sanitaire des aliments.....	18
1.2. La qualité microbiologique des aliments.....	18
1.3. Les pathogènes et les maladies d'origine alimentaires.....	20
1.4. Les méthodes de détection conventionnelles des bactéries pathogènes.....	23
1.5. Les méthodes émergentes : développement d'un biocapteur de détection..	27
2. Listeria monocytogenes.....	29
2.1. Caractéristiques microbiologiques.....	29
2.2. La listériose.....	30
2.3. Méthodes traditionnelles de détection de L. monocytogenes.....	32
2.4. Méthodes de détection rapides de L. monocytogenes.....	37
3. Développement d'une méthode compétitive de détection de L. monocytogenes....	42
3.1. Choix de la méthode.....	42
3.2. Le choix de l'antigène : La protéine p60.....	43
3.3. Le choix du bio récepteur.....	45
3.4. Le choix du support de détection.....	45
3.5. La méthode de détection : révélation colorimétrique.....	49
4. Problématique, hypothèses, objectifs et résultats.....	50
4.1. Problématique.....	50
4.2. Hypothèse.....	50
4.3. Objectifs.....	51
4.4. Méthodologie.....	51
4.5. Résultats.....	55
Chapitre II: Articles.....	78
Article 1.....	79

Effect of the optimize selective enrichment medium on the expression of the p60 protein using as <i>L. monocytogenes</i> antigen in specific sandwich ELISA	79
Article 2	112
Development of a support based on chitosan and cellulose nanocrystals for the rapid and specific Detection of <i>Listeria monocytogenes</i> using anti-PepD monoclonal antibodies.....	112
Part A: Optimization of the Antibody Immobilization Method.....	112
Article 3	149
Development of a support based on chitosan and cellulose nanocrystals for the rapid and specific detection of <i>Listeria monocytogenes</i> p60 protein using anti-PepD monoclonal antibodies.	149
Part B: Detection of <i>Listeria monocytogenes</i> from environmental samples in contact with minced pork	149
Chapitre III: Discussion Générale	175
1. Mise au point et optimisation d'une méthode de détection pour <i>L. monocytogenes</i>	175
2. Optimisation d'un milieu d'enrichissement sélectif pour la croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> et l'expression de la protéine p60 dans un court délai de croissance	176
3. Développement et optimisation d'un support de détection de la protéine p60 de <i>L. monocytogenes</i> transférable vers la version définitive du kit commercialisable	177
4. Transfert de la membrane CCG optimisée vers la version définitive du kit de détection.....	182
Chapitre IV: Conclusion Générale.....	187
Références bibliographiques	189

RÉSUMÉ

Face au défi que représente le temps d'analyse des méthodes de détection officielles existantes, le développement d'une méthode de détection basée sur le couplage de l'étape d'enrichissement sélectif de *Listeria monocytogenes* et de sa détection spécifique représente une solution potentielle à l'amélioration de sa surveillance en santé publique. Dans cette optique, des travaux de recherche ont été effectués sur la protéine p60 impliquées dans la virulence et la croissance de *L. monocytogenes*. Cette protéine p60 a été choisie puisqu'elle contient une séquence de 11 acides aminés (peptide D ou PepD : QQQTAPKAPTE) unique à l'espèce *Listeria monocytogenes*. Ainsi, les résultats obtenus permettent de montrer que le milieu *Listeria* enrichment broth (LEB) est le meilleur milieu d'enrichissement sélectif favorisant une meilleure croissance de *L. monocytogenes* et une meilleure expression de la protéine p60 (Beauchamp et al., 2012b; Coutu et al., 2014). Néanmoins, l'expression de la protéine p60 dans le LEB est retardée par la présence d'agent sélectif. D'où, la modification du LEB à une concentration optimale de 0,5% de dextrose (LEB modifié) a été effectuée afin de favoriser l'expression précoce de la protéine p60. Par la suite, une membrane (CCG) à base de chitosane (Cs), de nanocristaux de cellulose (CNC) et de glycérol (Gly) a été développée dans le but d'immobiliser des anticorps monoclonaux anti-peptide D de la protéine p60 de *L. monocytogenes* (mAb anti-PepD). La caractérisation des composantes de la membrane CCG a permis de mettre en évidence la présence de groupements amines (NH₂) provenant du chitosane. Par ces groupements amines, une liaison covalente entre la membrane CCG et les groupements amines présents dans mAb anti-PepD a été mis en place via le glutaraldéhyde. L'optimisation de cette méthode a mis en évidence l'importance du renforcement de la résistance de la membrane CCG par la CNC sur l'efficacité d'immobilisation. La validation du support optimisé pour l'immobilisation de mAb anti-PepD dans le LEB modifié a montré que la détection spécifique de la protéine p60 de *L. monocytogenes* n'est pas affectée sur la membrane CCG et est plus efficace que la méthode faisant intervenir l'utilisation d'une microplaque standard. Enfin, le transfert de la membrane CCG en une version applicable dans une

trousse de détection des échantillons environnementaux a permis de réduire le temps d'analyse à moins de 48 heures pour une contamination de 10^2 UFC/900cm² de *L. monocytogenes*. Néanmoins, une réduction des interactions non-spécifiques est nécessaire sur cette version potentielle de la membrane CCG de la trousse de détection afin que la spécificité de mAb anti-PepD ne soit pas affectée.

ABSTRACT

In order to overcome the problems associated with the time of analysis using the standard methods of detection, the development of a detection method based on the coupling of the selective enrichment step of *L. monocytogenes* and its specific sensing represents a potential solution to improve its surveillance in public health. To this end, this research has been performed on the p60 protein involved in the virulence and growth of *L. monocytogenes*. This p60 protein was also chosen because it contains a short sequence of eleven amino acids (peptide D or pepD: QQQTAPKAPTE) unique to *L. monocytogenes*. The results obtained showed that *Listeria* Enrichment Borth (LEB) is the best selective enrichment medium to improve the growth of *L. monocytogenes* and the expression of its p60 protein (Beauchamp et al 2012b; Coutu et al, 2014). This p60 protein is suitable for the detection of *L. monocytogenes* due to its involvement in growth and virulence. However, the expression of the p60 protein in LEB is delayed by the presence of selective agents. Hence, the modification of LEB at an optimal concentration of 0.5% dextrose (modified LEB) was performed to promote an early expression of the p60 protein. Subsequently, a membrane (CCG) based on chitosan (Cs), cellulose nanocrystal (CNC) and glycerol (Gly) was developed in order to immobilize a monoclonal antibody that recognizes peptide D of the *L. monocytogenes* p60 protein (anti-PepD mAb). The chemical characterization of the CCG membrane confirmed the presence of free amino groups provided by chitosan. With these free amino groups on the surface of the CCG membrane, a covalent link between the free amino groups on the surface of the CCG membrane and the free amino groups of the anti-PepD mAb was established using glutaraldehyde. The optimization of this immobilization method was performed and showed that the reinforcement of the CCG membrane by CNC is important for the immobilization efficiency. The use of the optimized support in the modified LEB for the detection of *L. monocytogenes* p60 protein was not affected on the CCG membrane and was more effective than the standard microplate detection

method. Finally, the transfer of the CCG membrane to an applicable version of a detection kit for an environmental sample resulted in a reduction of the detection time to less than 48 hours for a contamination of 10^2 CFU/900cm² of *L. monocytogenes*. However, a reduction in non-specific reactions is required on this potential version of the CCG membrane to improve the specificity of detection with anti-PepD mAb.

Marie-Christine ETTY, étudiante

Monique Lacroix, directeur

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Données générales sur les normes en matière de concentration acceptable de quelques microorganismes au Québec.	19
Tableau 2: Données du MAPAQ sur la dose infectieuse des bactéries pathogènes les plus retrouvées dans les aliments et les maladies engendrées.	22
Tableau 3: Les principales méthodes officielles utilisées pour la surveillance de <i>L. monocytogenes</i> dans des échantillons d'origine alimentaire.	34
Tableau 4: profil biochimique des <i>Listeria spp</i>	36
Tableau 5: Liste de quelques protéines de surface utilisée dans la littérature comme antigène de détection de <i>Listeria monocytogenes</i>	40
Tableau 6: Données supplémentaires sur l'utilisation de la membrane CCG fonctionnalisée pour la détection de la protéine p60 de <i>L. monocytogenes</i> dans différents échantillons alimentaires et selon la méthode officielle MFPHPB30. ...	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition des 31 agents pathogènes d'origine alimentaire selon l'Organisation mondiale de la santé (Organisation mondiale de la santé, 2015a).	21
Figure 2 : Estimation de la proportion d'impact en santé publique des trois bactéries pathogènes les plus importantes au Canada : E. coli O157, L. monocytogenes et Salmonella spp. non typhique (Public Health Agency of Canada, 2016).....	32
Figure 3: Illustration comparative de l'îlot de pathogénicité du gène prfA des espèces Listeria spp. (Vazquez-Boland et al., 2001).....	39
Figure 4: Illustration de la méthode de détection développée et basée sur le principe d'un biocapteur immunologique.....	53
Figure 5: Réaction ayant lieu lors du test de purpald pour la quantification des aldéhyde libres en solution. (Cournoyer et al., 2002).....	55
Figure 6: Effet des traitements sur le poids de la membrane CCG et sur son absorption en eau.	62
Figure 7: Effet visuel des traitements d'insolubilisation au TPP et de réticulation au glutaraldéhyde (GA) de la membrane à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol (CCG).	63
Figure 8: Effet du glutaraldéhyde sur le signal d'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-PepD (mAb anti-PepD) sur la membrane à base de chitosane, de nanocristaux de cellulose et de glycérol (m-CCG) en présence et absence d'une solution de tripolyphosphate de sodium (TPP).....	64
Figure 9: Effet visuel des nanocristaux de cellulose sur le traitement d'insolubilisation au tripolyphosphate de sodium (TPP) de différentes membranes à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol.	65
Figure 10: Courbe Standard de quantification des aldéhydes libres dans une solution de glutaraldéhyde à différentes concentrations.	66
Figure 11: Effets du tripolyphosphate de sodium et du glutaraldéhyde sur la quantification des aldéhydes et sur l'immobilisation des anticorps monoclonal anti-p60 à la membrane CCG.	69
Figure 12: Évaluation de l'effet de la concentration et du temps de réaction du tripolyphosphate de sodium (TPP) avec la membrane CCG sur la détection de la protéine p60 en ELISA en sandwich.	71
Figure 13 : Méthode d'ELISA indirecte pour la détermination des sources d'interactions non spécifiques entre la protéine p60 et la membrane CCG bloquée au préalable avec de l'albumine sérum bovin (BSA).....	73
Figure 14: Optimisation de l'étape de détection de la capture de la protéine p60 par les anticorps polyclonaux anti-p60 de lapin et l'étape de révélation du	

sandwich par les anticorps monoclonaux secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort 74

Figure 15: Utilisation de la membrane CCG fonctionnalisée pour la détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* dans différents échantillons alimentaires et selon la méthode officielle MFPHPB30..... 76

Figure 16: Illustration de la méthode d'échantillonnage environnemental et du format final du kit de détection en développé pour la capture de la protéine p60 de *L. monocytogenes* durant sa croissance (Public health agency of Canada; 2011Canadian Food Inspection Agency, 2013; Lahou & Uyttendaele, 2014)... 185

LISTE DES ÉQUATIONS

Equation 1: $y = 3,37x + 0,2405$ 66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ala: alanine
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
BHI: brain heart infusion
CNC : nanocristaux de cellulose
Cs : chitosane
FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FB: Fraser broth
FDA: Food and Drug Administration
FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy, spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier
g: gramme
GA: Glutaraldéhyde.
Gln: glutamine
Gly : glycérol
HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point
ISO/TC: International Organization for Standardization Technical Committee
kGy: kilogray
LEB: Listeria enrichment broth
Lys: Lysine
mAb anti-PepD: Anticorps monoclonal anti-PepD de la protéine p60.
m-CCG ou CCG: membrane à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol
p/v: poids sur volume
pAb anti-p60 : anticorps polyclonaux anti-p60, anticorps de détection de la capture de la protéine p60
PAM : prêt-à-manger
PCR : polymerase chain reaction
PepD : peptide D
pH: Potentiel hydrogène
Pro: proline
QCM : quartz crystal microbalance
RNS : réactions non spécifiques
RSM : Response surface methodology, méthodologie de surface réponse
sAb-HRP : anticorps secondaires couplé à la peroxydase de Raifort, anticorps de révélation de la détection
SEM : Scanning Electron Microscopy, microscopie électronique à balayage à sp : espèces au singulier
spp : espèces au pluriel
Thr: thréonine
TIA: toxiinfections d'origine alimentaire
Tim mAb anti-PepD : Temps de la réaction d'immobilisation de mAb anti-PepD sur m-CCG.
TPP: Tripolyphosphate de sodium.
TSB: trypticase soy broth

UFC: Unité Formatrice de Colonies

USDA-FSIS:United States Department of Agriculture- Food Safety and Inspection Service

UVM: university of Vermont medium

v/v: Volume/Volume

WHO : World Health Organization

CHAPITRE I: SYNTHÈSE

1. La sécurité sanitaire des aliments

1.1. Définition et importance de la sécurité sanitaire des aliments

La sécurité sanitaire des aliments est un ensemble de réglementations et d'actions légales dont le but est d'assurer à tous les êtres humains, l'accès à des aliments suffisants, sains et nutritifs (Fao and OMS 2005). Or de nos jours, la quantité et la qualité sanitaire et nutritive des aliments peuvent être compromises par le besoin principal de l'industrialisation et la croissance rapide des populations dans les villes développées. Ce besoin étant entre autres, l'augmentation de la productivité alimentaire dans un délai plus court (rapide) de livraison. Cette augmentation rapide de la productivité alimentaire implique un développement de procédés de fabrication et de conservation qui peuvent représenter un danger potentiel d'introduction de pathogènes à tous les niveaux de la fabrication (Forsythe, 2011 ; Doyle et al., 2001). La surveillance sanitaire des aliments à travers le développement de tests microbiologiques ou toxicologiques rapides et efficaces devient donc une nécessité.

1.2. La qualité microbiologique des aliments

La qualité sanitaire des aliments se définit par un ensemble de critères permettant d'assurer l'innocuité des aliments jusqu'à leur expiration et la santé du consommateur (CECMA, 2009). Ces critères sont basés sur l'absence ou la présence, et/ou la quantité de microorganismes, de toxines et de métabolites (par gramme ou par millilitre) évaluées au cours des étapes d'un procédé de transformation, sur un produit, ou sur un lot de produits (CECMA 2009). L'évaluation de ces critères est divisée en deux plans d'échantillonnage qui sont le plan à deux classes et à trois classes. Dans le plan à deux classes, un produit alimentaire est jugé inacceptable si il y a présence de microorganismes

pathogènes ou d'un nombre de microorganismes supérieurs à la limite tolérée (m). Dans le plan à trois classes, le niveau de la qualité de l'aliment ou du produit testé (acceptable, médiocre ou inacceptable) est déterminé par différentes limites de la quantité des microorganismes présents (m et M) (CECMA 2009). La classification des microorganismes selon ces plans d'échantillonnage dépend de leur impact sur la santé du consommateur (**Tableau 1**). Les microorganismes seront classés dans le plan d'échantillonnage à deux classes si la présence du microorganisme peut causer la mort ou de sérieuses répercussions sur la santé du consommateur (catégorie de santé 1). Par contre, le microorganisme sera classé dans le plan de l'échantillonnage à trois classes s'il a des répercussions temporairement indésirables, mais sans danger pour la vie du consommateur (catégorie de santé 2).

Tableau 1 : Données générales sur les normes en matière de concentration acceptable de quelques microorganismes au Québec.

Microorganismes	Type de microorganisme	Signification pour la santé	Concentration acceptable (m)
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positive*	Bactérie	2	< 10 ⁵ UFC/g ou ml
<i>Clostridium perfringens</i> *	Bactérie	2	< 10 ⁵ UFC/g ou ml
<i>Bacillus cereus</i> *	Bactérie	2	< 10 ⁵ UFC/g ou ml
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> *	Bactérie	2	< 10 ⁶ UFC/g ou ml
<i>E. coli</i>	Bactérie	2	10
Bactéries aérobies mésophiles	Bactérie	2	< 10 ⁶ UFC/g ou ml
<i>Salmonella</i>	Bactérie	1	0
<i>Campylobacter</i> thermotolérants	Bactérie	1	0
<i>E. coli</i> O157:H7	Bactérie	1	0
<i>Shigella</i>	Bactérie	1	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> (souches pathogènes)	Bactérie	1	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bactérie	1	0
Norovirus	Virus	1	0

Hépatite A	Virus	1	0
Rotavirus	Virus	1	0
Cyclospora	Parasite	1	0
Cryptosporidium	Parasite	1	0
Giardia lamblia	Parasite	1	0

(*) Présence de toxine de catégorie de santé 1 à une concentration supérieure à m. Données issues de (CECMA 2009). Santé 1 : la présence du microorganisme peut causer la mort ou de sérieuses répercussions sur la santé du consommateur ; Santé 2 : la présence du microorganisme peut causer des répercussions temporairement indésirables, mais sans danger pour la vie du consommateur

1.3. Les pathogènes et les maladies d'origine alimentaires

1.3.1. Généralités

Les agents pathogènes d'origine alimentaire sont des microorganismes (bactéries, virus et parasites) ou des produits chimiques dont l'ingestion d'aliments contaminés par eux conduit à des répercussions graves ou temporaire sur la santé du consommateur. Les principaux agents pathogènes d'origine alimentaire sont au nombre de 31 et conduisent à 32 maladies (**Figure 1**) (Organisation mondiale de la santé, 2015a). Vingt-huit de ces agents pathogènes (plus de 90%) sont des microorganismes causant des maladies diarrhéiques graves, des maladies parasitaires (helminthiases) ou des infections débilitantes (invasives à d'autres organes), comme la méningite (Organisation mondiale de la santé, 2015b). Les conséquences de ces maladies sur la santé humaine s'estiment à près de 420 000 décès chaque année dans le monde dont 238 décès dans le cas du Canada. Elles ont également des répercussions graves telles que l'incapacité durable du consommateur (Organisation mondiale de la santé, 2015a; Santé publique Canada, 2016). Ainsi, le contrôle de la présence ou de la concentration de ces microorganismes dans les aliments est essentiel dépendamment de la dose infectieuse ayant des répercussions sur la santé du consommateur (catégorie de santé 1 ou 2) ou de leur résistance dans l'environnement industriel et domestique.

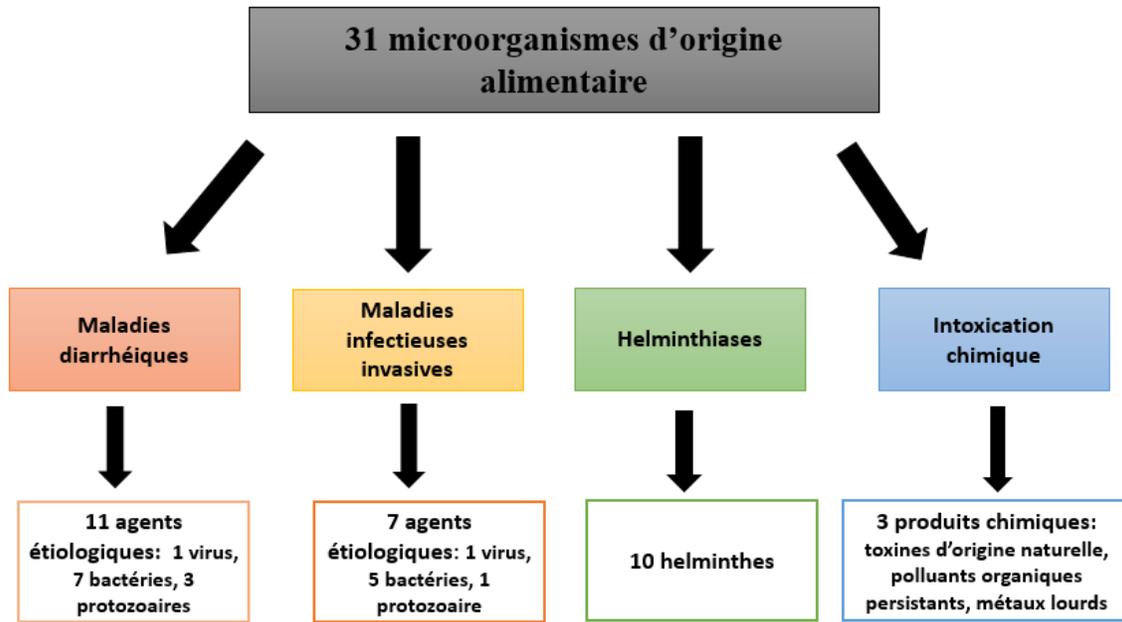


Figure 1: Répartition des 31 agents pathogènes d'origine alimentaire selon l'Organisation mondiale de la santé (Organisation mondiale de la santé, 2015a).

1.3.2. Les bactéries pathogènes les plus importantes

Les cinq bactéries pathogènes d'origine alimentaire les plus importantes au niveau mondial incluent *Salmonella spp*, *Campylobacter* et *Escherichia coli* entérohémorragique pour les infections les plus courantes et *Listeria monocytogenes* et *Vibrio cholerae* pour les infections rares, mais avec un taux de mortalité élevé (Organisation mondiale de la santé, 2015b). Par contre, dans le cas du Canada, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella spp.* (non typhique) sont les bactéries pathogènes d'origines alimentaires les plus importantes. Elles sont importantes puisqu'elles sont responsables du taux de mortalité le plus élevé associé aux bactéries d'origine alimentaire au Canada : 33 à 35 % pour *Listeria monocytogenes*, 16 à 17 % pour *Salmonella spp.* (non typhique) et 8 % pour *Escherichia coli* O157. Elles sont également importantes au niveau économique puisqu'une écloison de ces dernières peut occasionner

d'énormes coûts autant pour un gouvernement et une région que pour les industriels et le consommateur. Par exemple, un cas d'éclosion important comme celui de la bactérie *Listeria monocytogenes* en 2008 au Canada a représenté un coût global (coûts associés au gouvernement, à l'industrie, consommateur et aux pertes en vie humaine) de 242 de millions de dollars CAD (Thomas et al., 2015). De façon similaire, la bactérie *E. coli* en Allemagne en 2011 a coûté près de 1,3 milliard de dollars US en pertes agricoles et industrielles ainsi que 236 millions de dollars US en aide d'urgence à 22 pays membres de l'Union européenne (Organisation mondiale de la santé, 2015b). Ainsi, toutes ces conséquences récentes occasionnées pour ces éclosions bactériennes dans les aliments montrent le besoin d'améliorer encore aujourd'hui les tests microbiologiques utilisés pour leur surveillance en industrie.

Tableau 2: Données du MAPAQ sur la dose infectieuse des bactéries pathogènes les plus retrouvées dans les aliments et les maladies engendrées

Microorganismes pathogènes	Dose d'infection	Maladies
<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁵ -10 ⁹	Diarrhéiques
<i>Campylobacter thermotolérants</i>	500	Diarrhéiques
<i>Clostridium perfringens</i>	10 ⁵ -10 ⁶	Diarrhéiques
<i>E. coli</i> O157:H7 ^b	< 100	Diarrhéiques et invasives
<i>Listeria monocytogenes</i> ^b	100-1000	Diarrhéiques et invasives
<i>Salmonella spp</i>	10 ¹ - 10 ⁷	Diarrhéiques et invasives (si typhique)
<i>Shigella</i>	10 et 10 ²	Diarrhéiques
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positive	10 ⁶ (toxine : 1 ng-5 µg)	Diarrhéiques
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10 ⁵ -10 ⁹	Diarrhéiques
<i>Yersinia enterocolitica</i> (souches pathogènes)	10 ⁶	Diarrhéiques et invasives

^a (MAPAQ, 2010) ; ^b risque de mortalité élevé

1.4. Les méthodes de détection conventionnelles des bactéries pathogènes

1.4.1. Généralités

La surveillance des bactéries pathogènes à travers des tests microbiologiques est basée sur leur besoin nutritif, leur capacité biochimique et leurs atouts génétiques et immunogènes afin de confirmer leur présence dans des prélèvements de diverses origines telles que les aliments, l'environnement ou les animaux malades. Ces différents composants utilisés dans les tests biologiques représentent les méthodes de détection conventionnelle réglementée afin de les utiliser efficacement pour isoler, énumérer, confirmer et distinguer plusieurs souches d'une même famille. Cependant, les méthodes conventionnelles sont divisées en deux groupes. La première est appelée traditionnelle et comprend les milieux de culture et les tests biochimiques et sert à la confirmation du diagnostic de détection. Les milieux de culture sont utilisés en général pour l'isolement et les tests biochimiques pour l'identification précise des pathogènes (familles, espèces, Gram etc.) (Beauchamp, 2012a; Bouguelia, 2012; Velusamy et al., 2010). La seconde, appelée "rapide", comprend le dépistage moléculaire et immunologique. Ces deux techniques de dépistage sont dites rapides car elles servent de méthodes alternatives aux tests biochimiques. Ce sont des systèmes automatisés qui facilitent et accélèrent le processus de détection par la détection de différentes molécules propres au micro-organisme. La disponibilité des résultats est en général de 45 min à 2 heures d'attente. Néanmoins, ces deux dépistages dépendent des méthodes traditionnelles puisque les milieux de culture servent d'échantillon de base à ces méthodes et leurs résultats obtenus sont considérés comme des résultats présomptifs à confirmer par les méthodes traditionnelles.

1.4.2. Les méthodes traditionnelles de détection

La première méthode traditionnelle est basée sur l'utilisation des milieux de culture pour les bactéries pathogènes. Ils sont utilisés dans le cadre de procédures

d'enrichissements qui sont des méthodes normalisées permettant l'isolement du pathogène. Cet isolement du microorganisme est essentiel puisque grâce à lui, une culture ou une colonie pure du microorganisme d'intérêt peut être obtenue. De plus, cette purification est nécessaire puisque par rapport aux autres méthodes conventionnelles, elle est la méthode de référence de confirmation du diagnostic en Santé publique puisqu'elle sert d'échantillon de base pour l'identification en tests biochimiques du microorganisme d'intérêt et pour les méthodes conventionnelles dites rapides (Beauchamp, 2012a). La composition des milieux de culture en agents sélectifs (antibiotiques) et en agents nutritifs (source de carbone, minéraux etc.) est ce qui va différencier les procédures d'enrichissement. Cependant, malgré ces avantages, les procédures d'enrichissement des milieux de culture sont considérées comme inefficaces en industrie puisqu'elles sont trop longues et laborieuses. Certaines nécessitent des enrichissements en deux étapes et prennent entre 18 et 72 heures avant l'analyse de détection ou ont un temps d'analyse total de 36 heures au minimum à plus de 7 à 10 jours pour la confirmation des résultats obtenus (Beauchamp, 2012a ; Bouguelia, 2012 ; Velusamy et al., 2010). Or, ce délai est très désavantageux pour les produits alimentaires de courte durée de vie (2 à 3 jours) comme les produits frais (potentiellement contaminés) ou les produits transformés (contaminables pendant la fabrication). Les principales raisons de ce délai sont les propriétés de croissance des micro-organismes et leur état cellulaire (mort, endommagé, vivant et cultivable ou non cultivable) car leur activité métabolique est ralentie ainsi que la présence de compétiteurs et de réactions atypiques peuvent affecter la limite de détection à atteindre par les microorganismes dans le temps (Velusamy et al., 2010). Ce qui pour l'industrie est une problématique puisque dans certains cas, cela l'oblige à mettre sur le marché des produits alimentaires avant l'obtention des résultats des tests microbiologiques afin d'éviter de grandes pertes des produits alimentaires (Bouguelia, 2012). Ainsi, toutes ses observations font des méthodes conventionnelles basées sur les milieux de culture, des méthodes références très sensibles, peu coûteuses et complexes à prendre pour isoler et confirmer le pathogène comparativement aux autres méthodes règlementées. Néanmoins, en

termes d'inconvénient, ces méthodes sont longues et laborieuses et inefficaces pour diagnostic des colonies atypique (Bouguelia, 2012; Lopez, 2008).

La seconde méthode de détection traditionnelle est basée sur des tests biochimiques. Ce sont des techniques utilisant des aptitudes enzymatiques et métaboliques d'un microorganisme en présence d'un substrat de sorte à déterminer et identifier de façon précise son genre, sa famille ou son espèce à partir d'une colonie typique isolée sur gélose (Beauchamp, 2012a). Ses aptitudes incluent par exemple la capacité à hydrolyser l'esculine, à lyser des globules rouges, à fermenter un sucre (L-Rhamnose, D-arabitol, le méthyl D-glucose, le glucose-1-phosphate, D-tagatose, etc.), à produire un gaz (le sulfure d'hydrogène, H₂S), à catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène, à réduire des composés, à interagir avec des substrats chromophores d'enzymes (phénylalanine désaminase, nitrate réductase, ornithine décarboxylase, lysine décarboxylase et uréase) et la perméabilité de la membrane à des colorants (Beauchamp, 2012; Horwitz, 2000; Lopez, 2008). Toutes ces aptitudes des bactéries ont été utilisées pour développer des tests comme la coloration de Gram, l'hémolyse, les tests de mises en évidence de voie fermentaire comme Voges-Proskauer (VP) et le test de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) pour les non automatisés. Il existe également des tests miniatures automatisés ou semi automatisés tels que la galerie API ou le système Vitek de Biomérieux (Beauchamp, 2012a; Lopez, 2008).

1.4.3. Les méthodes de détection rapides

La première méthode rapide est le dépistage moléculaire qui est basée sur la reconnaissance d'acides nucléiques, des séquences d'ADN ou d'ARN. Le dépistage moléculaire est une méthode de détection rapide et spécifique permettant d'identifier la bactérie par la mise en évidence d'un ou plusieurs fragments de son génome. Elle est également très efficace pour identifier et confirmer une souche lorsqu'on fait face à un phénotype ambiguë comme celui du test de l'hippurate négative pour les souches de *Campylobacter jejuni* (Jodi Woan-

Fei Law 2015). Elle permet donc de détecter des gènes spécifiques du pathogène d'intérêt et prévient les résultats qui seraient mal interprétés. Les méthodes récentes existantes sont : la réaction de polymérisation en chaîne simple (PCR), PCR multiplexe (mPCR), PCR en temps réel et quantitative (qPCR), la méthode de PCR permettant par transcriptase inverse d'amplifier de l'ARN (RT-PCR) et la PCR par amplification isothermale (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) (Law, 2015). Parmi elles, la PCR multiplexe est la plus utilisée puisqu'elle permet la détection simultanée de plusieurs souches bactériennes comme *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *Vibrio parahaemolyticus* (Bouguelia, 2012). De plus, elle représente une bonne alternative aux techniques classiques de détection comme le VITEK qui sont complexes, longues et peu fiables (Bouguelia, 2012). Les inconvénients de ce dépistage sont principalement ses coûts élevés, son incapacité à distinguer l'ADN des bactéries vivantes ou mortes, la nécessité d'une étape de purification de l'ADN et la présence possible d'inhibiteur de l'ADN polymérase (la Taq polymérase) dans l'échantillon à tester (Bouguelia, 2012, Beauchamp, 2012).

La seconde méthode rapide est le dépistage immunologique. Le dépistage immunologique est basé essentiellement sur une spécificité d'interaction entre un anticorps et un antigène. Lors de cette interaction spécifique, les anticorps détecteront des composants cellulaires spécifiques du microorganisme qui sont appelés antigènes (Jadhav, 2012). Les principaux dépistages immunologiques existant sont des tests sérologiques, la séparation immuno-magnétique, le test d'immuno-précipitation, le test bandelette par immuno-chromatographie et la méthode immuno-enzymatique tel que l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). La méthode d'ELISA est la plus utilisée bien qu'elle ne soit pas plus sensible ou spécifique que les méthodes de dépistage moléculaire. Cependant, celle-ci est plus rapide et plus robuste que le dépistage moléculaire comme la PCR multiplexe. Elle a l'avantage de détecter une large variété de cible sur un même pathogène. Soit la cellule du pathogène, les toxines, les protéines de surface et secrétées et des peptides qui ne seraient pas exprimés au niveau de génome de ce dernier (Bouguelia, 2012 ; Law, 2015). Un autre avantage de l'ELISA est qu'elle

peut être utilisée aussi pour des détections multiples dans le but de réduire le temps des analyses. De plus, les réactifs utilisés sont également moins couteux ceux du dépistage moléculaire. Des versions automatisées de cette méthode existent, ce sont entre autres le système Vidas (VITEK immunodiagnostic assay system) de BioMerieux, (Bouguelia, 2012 ; Law, 2015). L'interprétation des résultats avec ces méthodes automatisées est très rapide puisqu'ils sont analysés directement par l'ordinateur et disponible après un temps de détection de 45 minute à 2 heures de temps. Les inconvénients principaux du dépistage immunologique sont des problèmes de bruit de fond (réaction non spécifique) et la limite de détection qui réduisent la sensibilité du test par rapport au dépistage moléculaire où l'affinité des amorces à l'ADN varie moins comparativement aux anticorps (Jadhav, 2012). De plus, lors de la méthode immunologique, un temps d'enrichissement est nécessaire avant l'analyse de sorte à augmenter le nombre de cellules bactériennes présentes, ce qui fait varier le temps détection des bactéries entre 24 et 52 heures (Bouguelia, 2012).

1.5. Les méthodes émergentes : développement d'un biocapteur de détection

1.5.1. Principe

Un biocapteur est une technique analytique basée sur l'utilisation d'un bio récepteur immobilisé sur un support de détection et associé à un système de révélation. La mise en place de ces méthodes émergentes est un atout comparativement aux méthodes conventionnelles puisqu'elles permettent de résoudre les désavantages associés à celles-ci. Ces atouts sont entre autres la capacité de ces méthodes à détecter de faibles quantités, à être portatif, à permettre une détection sans marqueur de révélation à l'œil nu et en temps réel, à utiliser un volume réduit et à améliorer la rapidité de détection multiple des microorganismes pathogènes (Yoo & Lee, 2016).

1.5.2. Les composantes du biocapteur

Les bio récepteurs représentent le composant principal de l'efficacité de détection quel que soit le biocapteur utilisé. Ils sont composés de sondes moléculaires, immunologiques ou peptidiques qui sont des éléments biologiques capables de reconnaître de façon spécifique et sensible la cible de détection.

Les supports de détection dans le développement d'un biocapteur sont des plateformes solides (verre, plastique, membrane, fibre ou microparticules) permettant l'immobilisation du biorécepteur (Yoo & Lee, 2016). Dans le cas d'un bio récepteur immunologique, ceux-ci doivent présenter des capacités d'interactions variables (faible à forte) permettant l'immobilisation d'un anticorps (Karaszkiwicz, 2005; Seurnyck-Servoss et al., 2007a). L'utilisation de la réticulation ou de l'immobilisation chimique convient pour améliorer les avantages mécaniques aux anticorps utilisés dans l'ELISA. Son efficacité sur l'immobilisation s'évalue sur la base des cinq critères suivants : une haute capacité de liaison, une conservation de l'activité de l'anticorps, une faible variabilité entre les essais, une longue durée de vie et un meilleur signal par rapport au bruit de fond (un ratio du signal de détection sur le bruit de fond élevé). Il existe trois types d'interactions permettant l'immobilisation d'un anticorps sur un support de détection. Ces interactions sont a) l'adsorption physique basée sur des interactions hydrophobes ou ioniques entre la protéine et le support de l'immobilisation; b) l'attachement covalent entre les groupes réactifs sur le support (aldéhyde, maléimide, hydrazine, les époxydes, etc.) et les anticorps (thiol, hydrate de carbone et amine primaire); et c) interactions à haute affinité entre les groupes fonctionnels (protéine A ou G, streptavidine, etc.) sur le support et l'anticorps (région Fc, biotine, histidine-Étiquette, etc.) (Seurnyck-Servoss et al., 2007a). Comparativement à l'adsorption physique, les sites réactifs (fixation covalente) ou les interactions par affinité sont de meilleures méthodes pour éviter une grande perte de la concentration des solutions et des échantillons et améliorer la sensibilité et la reproductibilité de détection (Emaminejad et al., 2015; Seurnyck-Servoss et al., 2007a). Néanmoins, l'inconvénient de ces deux méthodes est la présence de réactions non spécifiques

(un bruit de fond) qui peuvent conduire à des faux positifs ou à des encombrements stériques qui peuvent rendre inaccessible le site de liaison entre l'anticorps et l'antigène (Seurynck-Servoss et al., 2007a, b).

La méthode de révélation utilisée lors du développement d'un biocapteur est le processus par lequel le signal de détection sera interprétable. Le choix de la méthode de révélation est important puisqu'elle définit la classification des biocapteurs (Velusamy et al., 2010). Les différentes méthodes de révélation existantes sont de type optique, physicochimique, électrochimique, thermique, piézoélectrique (sensibilité de masse), magnétique ou micromécanique (Lazcka et al., 2007; Velusamy et al., 2010; Yoo & Lee, 2016). Parmi celles existantes, les plus courantes sont les méthodes optiques, électrochimiques (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) et piézoélectriques (quartz crystal microbalance, QCM) (Velusamy et al., 2010). Toutefois, la méthode optique est la plus utilisée et la plus populaire du fait de sa simplicité d'utilisation et de la réduction des coûts de son utilisation (Velusamy et al., 2010; Yoo & Lee, 2016). Cette méthode se compose de biocapteurs avec marqueurs de révélation de type colorimétrique et fluorescent ou sans marqueur tel que la technologie de résonance des plasmons de surface (SPR) et de la spectroscopie Raman (SERS) (Velusamy et al., 2010; Yoo & Lee, 2016).

2. *Listeria monocytogenes*

2.1. Caractéristiques microbiologiques

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène d'origine alimentaire connue depuis le début des années 1980 (Lopez, 2008). Elle est une bactérie Gram positive, coccobacille, non-sporulée, ubiquitaire et divisée en 11 serovar. Parmi les 11 serovars existants, la plupart des cas d'infection humaine et animale sont causés par les sérovars 1/2a (15-25% des cas), 1/2b (10-35% des cas) et 4b (37-64% des cas, principalement chez les femmes enceintes) (Public Health Agency

of Canada, 2011 ; Forsythe, 2011). *L. monocytogenes* est la principale espèce des *Listeria* pathogènes d'une large variété d'espèces animales incluant des mammifères, des oiseaux, des poissons et des crustacés (Lopez, 2008). Elle est également un pathogène opportuniste de l'homme considérée comme l'une des quatre bactéries pathogènes les plus importantes dans le monde (OMS, 2015) du fait des nombreux cas de rappels alimentaires et du fort taux de mortalité associé à cette bactérie (34% au Canada, 17.8 % en Europe et 19% aux USA) (Public Health Agency of Canada, 2011, 2011; Court, 2014; Scallan et al., 2011). De plus en termes de contamination, *Listeria monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire (sol, eau, etc.) avec un potentiel zoonotique important. Elle est également caractérisée par une grande persistance (en semaines, en mois ou en années) et un niveau d'isolation élevée dans l'environnement domestique et industriel de travail du fait de sa résistance à des conditions extrêmes de température (1°C à 45°C), de pH (4,3-9,6) et à une faible activité d'eau ($A_w=0.92$) (Beauchamp, 2012a ; Public Health Agency of Canada, 2011). D'où *L. monocytogenes* représente un danger important pour l'industrie alimentaire et principalement pour les aliments prêts à manger (PAM) ; où tous les niveaux de préparation alimentaire sont des sources potentielles de contamination, que ce soit la collecte, la transformation ou l'entreposage. Ainsi, la surveillance des points critiques de l'environnement de travail tels que les surfaces de travail est primordiale afin de détecter et prévenir les contaminations croisées des aliments prêts à manger.

2.2. La listériose

La listériose est une maladie causée *Listeria monocytogenes* et transmise par les aliments et par la contamination de l'environnement de production alimentaire. La listériose chez l'homme se manifeste par la gastro-entérite fébrile, la septicémie, la méningite et d'encéphalite. Elle conduit également à des infections intra-utérines ou cervicales, à des avortements spontanés et à une mort fœtale tardive ou un accouchement prématuré (Public Health Agency of Canada, 2011; Lopez, 2008).

La transmission de la listériose chez l'homme par contact direct avec des animaux infectés par *Listeria monocytogenes* (Zoonose) lors des vêlages, des agnelages ou après la consommation de produits d'origine animale est également une source importante d'infection (Public Health Agency of Canada, 2011 ; Forsythe, 2011 ; Lopez, 2008). Le lien de transmission entre l'homme et les animaux est peu maîtrisé toutefois, des facteurs déterminants de l'émergence de cette maladie chez l'homme par les aliments ont pu être identifiés (Forsythe, 2011 ; Lopez, 2008). Ces facteurs déterminants sont premièrement l'industrialisation alimentaire comprenant comme points critiques des procédures de fabrication, la distribution en agro-alimentaire et la disponibilité de produits prêt à manger (PAM) aux consommateurs. Ensuite, le développement de méthodes de conservation des aliments comme la réfrigération. Enfin, l'augmentation du nombre de personnes les plus à risque (Public Health Agency of Canada, 2011 ; Lopez, 2008).

La listériose est une maladie peu fréquente chez l'homme puisque parmi les trois bactéries les plus importantes au Canada (**Figure 2**), *L. monocytogenes* représente le plus faible taux de maladie et d'hospitalisation (moins de 11%) (Public Health Agency of Canada, 2016). Cependant, bien que la Listériose soit peu fréquente, elle est considérée comme dangereuse puisqu'une contamination à *Listeria monocytogenes* cause plus de 50% des cas de décès au Canada (**Figure 2**). Les principales personnes à risque sont la femme et le nouveau-né dans le cas de grossesses et les personnes âgées ou immunodéprimées.

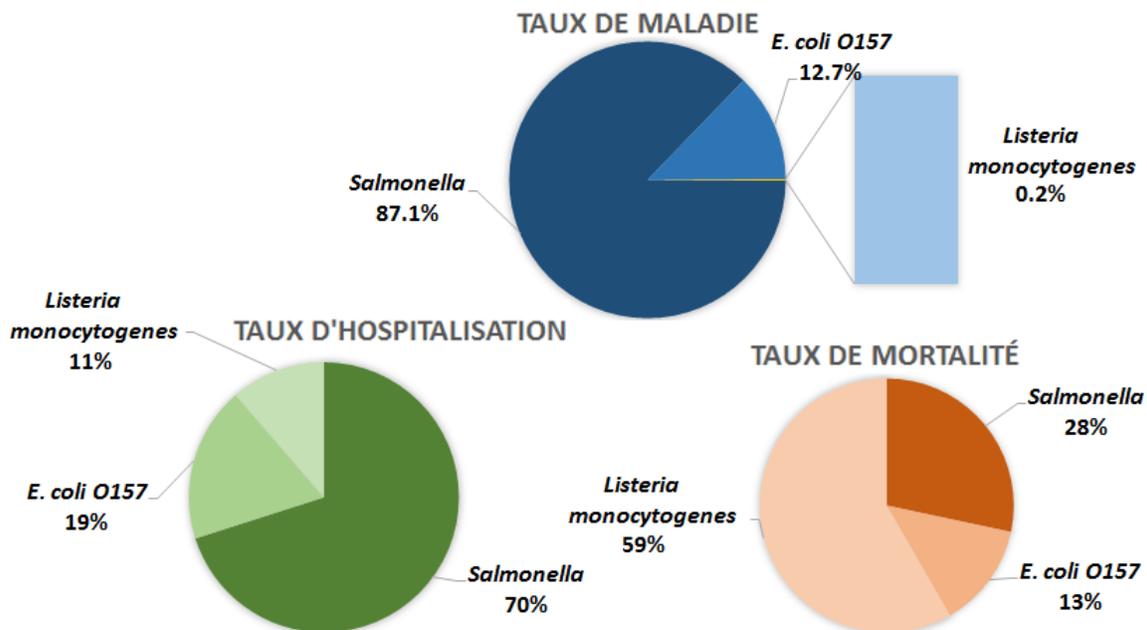


Figure 2 : Estimation de la proportion d'impact en santé publique des trois bactéries pathogènes les plus importantes au Canada : *E. coli* O157, *L. monocytogenes* et *Salmonella* spp. non typhique (Public Health Agency of Canada, 2016)

2.3. Méthodes traditionnelles de détection de *L. monocytogenes*

Les premières méthodes de diagnostic de *Listeria monocytogenes* dans la littérature sont basées sur l'isolement de la bactérie à partir des tissus d'origine animal suivi de leur l'étalement direct sur une gélose au sang de mouton ou un autre milieu de culture riche. Des sous cultures hebdomadaires sont également faites en parallèle par une technique d'enrichissement à froid pendant 12 semaines. L'enrichissement à froid permet une exploitation de la capacité de *L. monocytogenes* à croître aux températures de réfrigération. Néanmoins, la longue durée du temps d'incubation (12 semaines) et l'inefficacité de ces méthodes à faible concentration de la bactérie dans les tissus sont un inconvénient à leur utilisation lors des cas d'éclotions (Lopez, 2008). Ainsi, des procédures

alternatives d'enrichissement et d'agents sélectifs pour l'isolement de *L. monocytogenes* à partir des aliments et de l'environnement ont été mises en place.

2.3.1. Les milieux de cultures et les procédures d'enrichissement pour *L. monocytogenes*

Les milieux de culture et les procédures d'enrichissement sont mis en place dans le but d'isoler et d'augmenter la limite de détection de *L. monocytogenes* à un niveau visible à l'œil nu. Les milieux de culture sont les outils clé des procédures d'enrichissement puisque leur composition affecte le temps d'incubation de la procédure d'enrichissement et les types d'échantillons ciblés des différentes méthodes officielles comme FDA, USDA-FSIS, AOAC et la norme ISO etc. utilisées en industrie alimentaires (**Tableau 3**) (Beauchamp, 2012a; Lopez, 2008). Les milieux de culture sont composés de nutriments de base comprenant principalement d'une source de carbone comme le glucose ou de l'esculine favorisant le mécanisme de réparation de la membrane cellulaire; d'extraits de levures et de tryptone comme une source d'énergie, de vitamines et de minéraux; de peptone comme une source d'azote nécessaire à la production des protéines; de sel comme le chlorure de sodium pour régulariser la pression osmotique; de cations comme l'ion magnésium ou ferrique servant à la récupération des cellules stressée et à la stabilisation des ribosomes et de la membrane; et dans le cas des milieux liquides, d'un agent tampon comme le phosphate dibasique (Besse, 2002; Lee et al., 2013). Ils sont également composés d'agents sélectifs constitués: a) de composants chimiques tels que le chlorure de lithium et le citrate d'ammonium ferrique pour améliorer et différencier la croissance de *L. monocytogenes* en présence de bactéries indésirables et, b) d'antibiotiques pour l'inhibition des bactéries non désirables. Les antibiotiques servant d'agents sélectifs pour *Listeria monocytogenes* sont le cycloheximide, la colistine, le cefotetan, la fosfomycine, l'acide nalidixique, l'acriflavine, le phényléthanol, la céftazidime, la polymixine B et le moxalactam. Parmi ces agents sélectifs, les cinq principalement utilisés sont l'acriflavine pour l'inhibition de la croissance des Gram positif; l'acide nalidixique,

pour l'inhibition de la croissance de *Bacillus* sp. et de certains Gram négatif; la cycloheximide comme antifongique; et la polymixine B et la ceftazidime servant à inhiber les bactéries Gram négatif et certaines Gram positif (Beauchamp, 2012a; Bouguelia, 2012; Lopez, 2008). Néanmoins, bien que les milieux de culture puissent être différentes entre les méthodes officielles, les étapes comprenant leur procédure d'enrichissement restent similaires: une étape d'enrichissement, une étape d'isolation et une autre de confirmation de la présence de *L. monocytogenes* (Beauchamp, 2012a). Exceptionnellement, seule la norme ISO possède une étape supplémentaire et obligatoire qui est le dénombrement bactérien. Cette étape est également utilisée par les autres méthodes officielles (FDA, USDA-FSIS et AOAC) même si dans leur cas, elle est considérée comme optionnelle (Lopez, 2008).

Tableau 3: Les principales méthodes officielles utilisées pour la surveillance de *L. monocytogenes* dans des échantillons d'origine alimentaire.

Méthode officielle	Domaine d'application	Procédure d'enrichissement	Condition	Milieux liquides utilisés	Gélose utilisés
Association of Official Analytical Chemists (AOAC)	Large variété de produits alimentaires et de produits d'alimentation animale	Une seule étape d'enrichissement	24 à 72 h à 30 °C, 35°C ou 37°C	LEB	Oxford*
Food and Drug Administration (FDA)	Le lait et les produits laitiers	Une étape de pré-enrichissement pour la revivification des cellules stressées suivit d'une étape d'enrichissement	30°C pendant 4h suivit de 24 à 72 h à 30 °C, 35°C ou 37°C	TSB-YE suivit de LEB	Oxford* et La gélose LPM ou palcam

International Organization for Standardization Technical Committee ISO/TC 34, Agricultural Food Products, Subcommittee SC 9, Microbiology (Norme ISO 11290)	Le lait et les produits laitiers	Une étape de pré-enrichissement suivit d'enrichissement	30°C pendant 24h suivit de 24 à 72 h à 30 °C, 35°C ou 37°C	Demi Fraser suivit de Fraser	ALOA (Listeria selon Ottaviani et Agosti) et Oxford ou Palcam
United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS)	Les viandes rouges et la volaille (produit cru ou cuit prêt à être consommé), les œufs et les ovoproduits ainsi que les échantillons d'environnement	Deux enrichissements successifs	24 à 72 h à 30 °C, 35°C ou 37°C	Dans l'UVM puis dans le Fraser	MOX

*chlorure de lithium, du cycloheximide, de la colistine, de l'acriflavine, du cefotan et de la fosfomycine. TSB-YE: Tripticase soy broth and Yeast extract.

Toutes ces méthodes officielles citées montrent les efforts mis en place en termes de méthodes de détection conventionnelles de *Listeria monocytogenes*. Néanmoins, l'inconvénient de ces méthodes pour *Listeria monocytogenes* est principalement sa croissance qui peut nécessiter jusqu'à 7 jours avant de voir apparaître à l'œil nu une colonie visible (Bouguelia, 2012). Ce délai de croissance représente un désavantage considérable pour l'efficacité des méthodes traditionnelles en termes de rapidité de détection puisque les aliments en cause ont généralement une courte durée de vie (1 à 5 jours, les PAM). Néanmoins, les méthodes conventionnelles restent nécessaires lors de la détection de *Listeria monocytogenes* puisqu'elles permettent par les milieux de culture d'augmenter sa limite de détection dans un échantillon et servent d'échantillons de base pour les tests biochimiques et les méthodes dites rapides.

2.3.2. Les tests biochimiques de *L. monocytogenes*

Le caractère pathogène de l'espèce *Listeria monocytogenes* chez l'animal et l'humain, comparativement aux espèces du genre *Listeria*, témoigne du développement d'aptitudes moléculaires et cellulaires différentes chez celle-ci. Ainsi, de nombreuses caractéristiques biochimiques peuvent être sélectionnées pour *L. monocytogenes* afin de distinguer celle-ci des autres *Listeria sp.* Toutefois, les plus importantes sont le test de l'hémolyse, l'utilisation du L-Rhamnose, dans la production d'acides et le test de Christie-Atkins-Munch-Peterson (test de CAMP test). Le test de CAMP est une méthode de différenciation d'une espèce comme *Listeria monocytogenes* au sein de sa famille bactérienne sur une gélose de sang de mouton. Lors de cette méthode, un phénomène synergique sur une gélose à base de sang de mouton entre la beta toxine de *S. aureus* et l'hémolyse de la bactérie testée conduit à la formation d'une zone de tête de flèche adjacente à l'endroit où elle se rencontre (McKellar, 1994).

Tableau 4: profil biochimique des *Listeria spp*

	<i>S. aureus</i> β - hémolytique (souche ATCC 49444 ou 25923, souche NCTC 7428 ou 1803)	<i>Rhodococcus equi</i> . (Souche ATCC 6939, souche NCTC 1621)	<i>B</i> - <i>hemolyse</i>	L- Rhamnose
<i>L. monocytogenes</i>	++	-	++	++
<i>L. innocua</i>	-	-	-	v
<i>L. ivanovii</i>	-	++	++	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	v
<i>L. grayi</i> subsp. Grayi	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. Murrayi	-	-	-	v

++ : positif à 90%, + : positif faible ; v : variable. (Hitchins et al., 2017)

Mis à part les différents tests du tableau 4, d'autres méthodes biochimiques utilisées dans la méthode officielle de l'AOAC peuvent être obligatoires pour valider la présence dans *L. monocytogenes*.

Le profil biochimique de *L. monocytogenes* dans ce différent test est le suivant :

- a- Une réaction positive pour : le test de Voges-Proskauer ; pour l'hydrolyse des sucres tels que de l'esculine, du paranitrophényl D-mannopyranoside par la mannosidase en D mannose et pour le para nitrophénol coloré ; pour la fermentation des sucres méthyl glucose, le D-arabitol, le glucose-1-phosphate et le D-tagatose ; et pour la production de sulfure d'hydrogène (H₂S).
- b- Une réaction négative pour l'hydrolyse des substrats comme le malonate et l'indole, pour l'hydrolyse des enzymes comme la phénylalanine déaminase, la nitrate réductase, l'ornithine décarboxylase, la lysine décarboxylase et l'uréase.

2.4. Méthodes de détection rapides de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est une bactérie possédant des déterminants moléculaires de la virulence et des mécanismes d'action impliqués dans sa capacité à infecter une cellule. Étant donné ces différentes aptitudes, cette bactérie est l'un des modèles d'interaction agent pathogène/hôte au niveau cellulaire et moléculaire les plus importants en recherche (Lopez, 2008). Ces aptitudes ont également permis le développement de nombreux tests de détection rapides pour *L. monocytogenes* (Beauchamp, 2012a; Bouguelia, 2012).

2.4.1. Méthode moléculaire

Du point de vue moléculaire, les souches de *L. monocytogenes* sont caractérisées par un polymorphisme génétique qui cependant n'assure pas l'existence de souches non pathogènes de *L. monocytogenes*. Néanmoins, les ressources moléculaires pour *L. monocytogenes* permettent d'identifier chaque souche grâce

à l'utilisation de différents niveaux de typage. Ces différents niveaux de typage sont le sérotypage, la lysotypie, le typage par électrophorèse des fragments issu de l'utilisation d'enzyme de restriction de l'ADN ou par électrophorèse en champ pulsé [PFGE]) et le typage par séquençage d'acides nucléiques et par amplification aléatoire de séquences d'ADN (RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA). De plus, l'utilisation du dépistage moléculaire pour *L. monocytogenes* est une alternative de détection avantageuse puisqu'il existe des gènes tels que le gène *prfA* permettant la transcription d'un îlot de pathogénicité de la bactérie composé de plusieurs autres gènes de virulence détectable eux aussi individuellement (**Figure 3**) (Lopez, 2008). Parmi ces gènes contenus dans l'îlot de pathogénicité sont les gènes de virulence *hly* qui code pour la listériolysine importante pour la survie de la bactérie dans les cellules phagocytaires ; le gène *mpl* qui code pour une métalloprotéase zinc-dépendante permettant la maturation de la phosphatidyl-choline phospholipase C et le gène *actA* qui code pour la protéine ActA nécessaire au déplacement de la bactérie dans la cellule par la polymérisation de l'actine (Vazquez-Boland et al., 2001). Il existe également d'autres gènes en dehors de cet îlot de pathogénicité comme le gène *iap* (invasion associated protein) et les gènes internalines (*inIA* et *inIB*) qui sont importants pour l'invasion des cellules par *L. monocytogenes* (Beauchamp, 2012; Faith et al., 2007). Ces deux gènes peuvent être des cibles plus avantageuses que l'îlot de pathogénicité puisque le gène *prfA* est inhibé à basse température alors que ces deux autres ne le sont pas. Néanmoins, parmi ces deux groupes de gènes, les internalines sont les plus sensibles et les plus utilisées pour une détection rapide de colonies présomptives de *L. monocytogenes* sur des géloses différentielles (Lopez, 2008).

Le principal inconvénient du dépistage moléculaire de *L. monocytogenes* est la différenciation de l'ADN des cellules mortes et vivantes puisque c'est la présence de la bactérie vivante qui est la cause de l'infection alimentaire (Bouguelia, 2012). Ainsi, malgré les nombreux gènes existants pour *L. monocytogenes*, l'utilisation du dépistage moléculaire est moins efficace. Il existe une technique pour résoudre ce problème, mais celle-ci contribue à l'augmentation de la durée du temps

d'analyse de détection (Bouguelia, 2012). Cette technique couple la méthode de dépistage moléculaire à des méthodes de coloration effectuées au préalable, telles que l'EMA ou PMA. Ce sont des agents intercalants inhibant la détection des bactéries non viables par altération de leur ADN (Bouguelia, 2012).

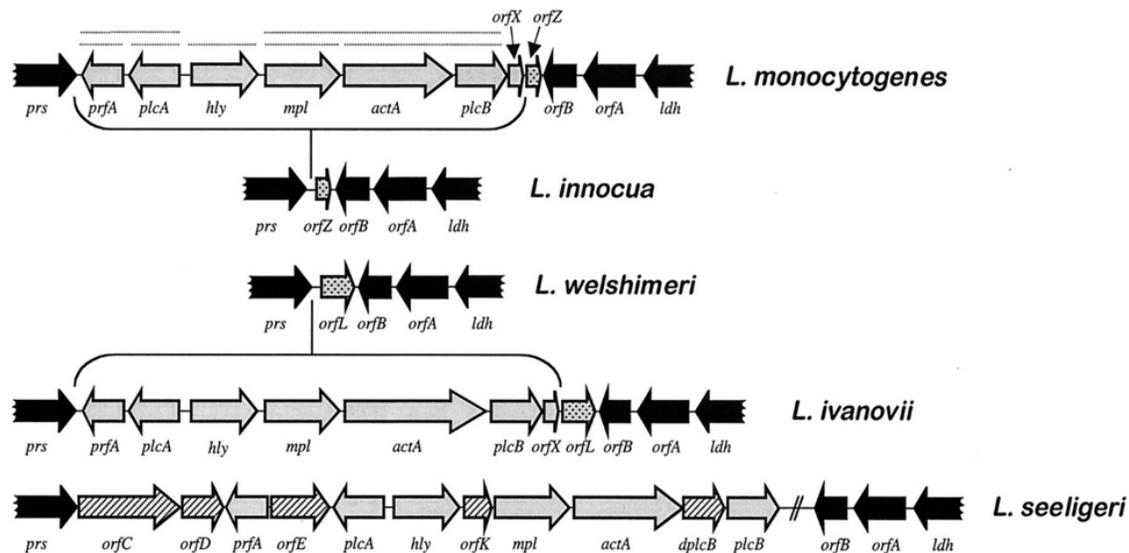


Figure 3: Illustration comparative de l'îlot de pathogénicité du gène *prfA* des espèces *Listeria* spp. (Vazquez-Boland et al., 2001)

2.4.2. Méthode immunologique

Du point de vue immunologique, *Listeria monocytogenes* possède de nombreuses protéines (**Tableau 5**) ayant servi d'antigènes pour sa détection. Parmi ces protéines, la listériolysine O (LLO) est la plus utilisée puisque c'est une toxine de *Listeria monocytogenes* principalement importante pour sa virulence dans les cellules phagocytaires (Lopez, 2008). Elle est également très utilisée puisque c'est par elle que se fait le dépistage d'infection de *L. monocytogenes* dans le système nerveux central lorsque la détection sur la culture bactérienne est négative (Lopez, 2008). D'autres protéines chez *L. monocytogenes* comme celle codées par le gène *prfA* peuvent être utilisées pour sa détection puisqu'elles ont une expression maximale à la température du corps humain (37°C). Cependant, l'expression des

protéines codées par les gènes de l'îlot de pathogénicité du gène *prfA* de *L. monocytogenes* (**Figure 3**) est faible à basses températures. À ces températures, la transcription du gène *prfA* est inactivée d'où les protéines résultantes (ActA, LIO etc.) ne sont pas exprimées. Elles ne sont donc pas de bonnes cibles antigéniques pour des échantillons alimentaires réfrigérés comparativement à la p60 codée par le gène *iap* (Beauchamp, 2012a; Beauchamp et al., 2012b; Kohler et al., 1990), ou la protéine p66 reportée dans la littérature (Tao et al., 2006). Ces deux gènes sont intéressants car ils appartiennent au domaine LysM contenant des enzymes impliquées dans la dégradation de la membrane cellulaire (division cellulaire) (Bierne & Cossart, 2007).

Les inconvénients du dépistage immunologique pour *L. monocytogenes* sont leur incapacité à permettre une détection en temps réel ainsi que la faible sensibilité et spécificité de détection qu'elle présente comparativement au dépistage moléculaire. Ainsi, cette méthode de dépistage est le plus souvent couplée à des méthodes émergentes (SPR) ou des méthodes de concentration (immuno-magnetic separation, IMS) des cellules bactériennes pour augmenter son niveau de sensibilité et son efficacité (Bouguelia, 2012).

Tableau 5: Liste de quelques protéines de surface utilisées dans la littérature comme antigène de détection de *Listeria monocytogenes*

Protéine de surface	Rôle	Anticorps existants	Référence
62 (Imo0610)	putative LPXTG-motif cell-wall anchor-domain protein	Anticorps polyclonal Anti-listeria	(T. Geng et al. 2003; Tao et al., 2006)
58 (Imo0355)	Flavocytochrome C fumarate reductase chain A homolog protein		

50 (Imo2455)	enolase		
43 (Imo2459)	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase		
30 (Imo0041)	hypothetical phospho-sugar binding protein		
66 (Imo2691)	N-acetylmuramidase	MAB C11E9, mAb C11E9 and EM-7G1	
Listeria, cellule entière		Anticorps B4 : utilisé pour capturer la bactérie avant la PCR. Ils sont capables de différencier des <i>L. monocytogenes</i> vivantes des <i>L. monocytogenes</i> qui ont été tuées par la chaleur, les acides, les bases, les détergents ou l'irradiation	(Solve et al.,2000)
60	Protéine d'évasion et du remodelage du peptidoglycane	Anticorps monoclonal et polyclonal	(Coutu et al., 2014; Beauchamp et al., 2012b; Faith et al., 2007;

			Ruhland et al., 1993)
80 et 71 (Internaline : InIA et B)	Invasion des cellules phagocytaires	Monoclonal mAb2B3	(Hearty et al., 2006)
90	Protéine de polymérisation de l'actine	Polyclonal et monoclonal	Brundage et al., 1993

3. Développement d'une méthode compétitive de détection de *L. monocytogenes*

Une méthode peut être compétitive par rapport à celles existantes si elle répond aux critères de reproductibilité de la sensibilité de détection (capacité à détecter sa cible cellulaire ou moléculaire à de faibles niveaux), forte spécificité (capacité à détecter fortement la molécule cible en présence d'un fort bruit de fond de cibles moléculaires ou cellulaires indésirables), rapidité d'obtention des résultats, faible coût par essai, simple d'utilisation pour la communauté scientifique et les employés de l'industrie alimentaire (McKillip, 2004).

3.1. Choix de la méthode

Dans le but de coupler la méthode de détection à l'étape d'enrichissement de *L. monocytogenes*, le dépistage immunologique basé sur le principe du biocapteur a été choisi. Malgré sa faible sensibilité et spécificité de détection, une technique d'immunodétection comme l'ELISA en sandwich est une méthode compétitive,

simple d'utilisation et permettant d'augmenter la sensibilité de détection de 2 à 5 fois plus que les autres ELISA (Beauchamp, 2012a) de modification. Elle offre également la possibilité de regrouper les différentes étapes de cette méthode sur un même support sans avoir besoin de séparer les produits de la réaction désirée. Le principe de cette méthode est basée sur l'utilisation de deux types d'anticorps dont la présence d'au moins deux déterminants antigéniques (épitopes) sur l'antigène ciblé est nécessaire pour faire le sandwich (Beauchamp, 2012a; Law et al., 2014). Ainsi, le premier anticorps sera utilisé pour la capture spécifique de l'antigène tandis que le deuxième anticorps servira à détecter l'antigène capturé. C'est via le premier anticorps que la spécificité de détection de l'antigène sera définie alors que deuxième anticorps aura pour rôle d'améliorer la sensibilité de détection antigène capturée. Par conséquent, le choix de l'antigène et des anticorps sont donc les principaux facteurs limitants pour la réussite de ce test (Beauchamp, 2012a ; Karaszkievicz, 2005).

3.2. Le choix de l'antigène : *La protéine p60*

Le choix d'un antigène prend en compte plusieurs critères. Premièrement sa reconnaissance par un anticorps qui au préalable demande que l'antigène soit fortement immunogénique pour être produit par le système immunitaire d'une espèce animale (Beauchamp, 2012a). Puis, sa spécificité à l'organisme d'intérêt qui est déterminé par la reconnaissance d'un épitope (une séquence d'acides aminés) unique à ce dernier. Aussi, cette spécificité implique que son expression chez les différentes souches d'une même espèce soit connue et stable pour éviter que l'efficacité du test de détection soit compromise (Beauchamp, 2012a). Ensuite, son environnement d'expression doit être pris en compte puisque celui-ci peut affecter son expression et conduire à des réactions faussement positives (Beauchamp, 2012a). En industrie alimentaire, les aliments et équipements de travail (surface et outils) peuvent être soumis à différents environnements pouvant représenter plusieurs stress pour la bactérie, donc une variation de l'expression de ces antigènes. Ces stress sont entre autres, les températures de réfrigération

3.3. Le choix du bio récepteur

Lors du développement de l'ELISA en sandwich, un premier anticorps a été produit pour la capture spécifique de la protéine p60 de *L. monocytogenes* sur le support de détection. Cet anticorps est de type monoclonal (mAb) puisque seul le peptide D de la protéine p60 de *L. monocytogenes* est la cible de spécificité (épitope unique). Par la suite, un deuxième anticorps détectera la capture spécifique de la protéine p60 par l'anticorps monoclonal. Ce deuxième anticorps est de type polyclonal et ne participera pas à la spécificité de détection de *Listeria monocytogenes*, mais à l'augmentation de sa sensibilité de détection. En effet, la séquence de 478 acides aminés de la protéine p60 de *L. monocytogenes* ne montrent aucune répétition de la séquence pepD. D'où une fois, l'anticorps monoclonal aura capturé spécifiquement la protéine p60 de *L. monocytogenes*, le deuxième anticorps sera dirigé contre plusieurs peptides de cette protéine en commun avec les autres espèces *Listeria spp.* Ainsi, pour une protéine p60 de *L. monocytogenes* capturée, il y aura plus d'un polyclonal à la surface de la protéine p60 comme dans le processus d'opsonisation des anticorps d'un système immunitaire (Revillard, 2001). Entre ces deux anticorps utilisés, l'anticorps monoclonal anti-p60 de *L. monocytogenes* (mAb anti-PepD) est l'anticorps critique dont les caractéristiques et l'impact du support d'immobilisation sur le maintien de la structure secondaire de son fragment constant et de l'intégrité de son fragment de liaison des anticorps (Fab) sera important à contrôler (Karaszkiwicz, 2005; Seurnyck-Servoss et al., 2007a).

3.4. Le choix du support de détection

Dans le but de respecter les normes environnementales, le développement de nouvelle technologie de détection et de préservation des aliments en industrie nécessite l'utilisation de support à base de composants naturels, biodégradables renouvelables et non toxiques en alternative aux polymères synthétiques (ex :

polyéthylène). Ces composants sont des supports à base de biopolymères dont les plus utilisés sont la chitine, l'amidon, la lignine, les polysaccharides et la cellulose (Krajewska, 2005). Ils représentent les composés naturels et alternatifs les plus utilisés comme support des nouvelles technologies puisqu'ils possèdent des propriétés avantageuses pour la fabrication de produits industriels et de consommation (Krajewska, 2005). Ces propriétés incluent : le gonflement dans l'eau, la viscosité, la formation d'un gel et leur caractère chimique versatile à différents pH (précisément pour la chitine dans sa forme chitosane). Ainsi, dans le but de développer un support à base de biopolymères pour la détection de *L. monocytogenes*, le chitosane a été choisi comme composant principal du support de détection développé puisque, à la différence des autres biopolymères, il est également biocompatible avec d'autres composants, hydrophobes dans des conditions basiques et possède une intéressante affinité aux protéines (Kumar,2000 ; Krajewska, 2005). Aussi, basée sur la biocompatibilité du chitosane avec d'autres composants, la composition finale du support développé dans ce projet comprend le chitosane, des nanocristaux de cellulose et le glycérol (membrane CCG, m-CCG). Ces composants ont été choisis sur la base de critères environnementaux et des avantages naturels qu'ils possèdent, permettant de favoriser le développement d'un support résistant et d'une méthode d'immobilisation où, la structure, l'activité, la stabilité des anticorps de capture et l'accessibilité de l'antigène ne seront pas affectés.

3.4.1. Chitosane

Le chitosane [α (1-4) 2-amino 2-désoxy β -D glucan] est une forme désacétylée de la chitine caractérisée par sa capacité naturelle à être biodégradable, biocompatible et bioadhésive (Kumar, 2000; Liu et al., 2004; Krajewska, 2005; Bhumkar & Pokharkar, 2006). Cette réaction de désacétylation peut être contrôlée dans le but de modifier le poids moléculaire et le degré de désacétylation souhaité selon la cible d'utilisation. Le chitosane est composé de deux réactifs qui sont l'amine libre (NH₂) et les groupes hydroxyle (OH⁻) (Bhumkar & Pokharkar, 2006).

Dans le cadre du projet, la présence de l'amine libre dans le chitosane issue de la désacétylation est le principal intérêt de notre méthode de détection développée puisque les anticorps à immobiliser sur la membrane CCG contiennent eux aussi le groupement amine primaire (-NH₂) dans chaque chaîne de polypeptide et dans la chaîne latérale des résidus Lysine (Lys,K) de son fragment constant (Seurynck-Servoss et al., 2007a,b). Ainsi, les caractéristiques du chitosane sont un avantage autant pour le déchet issu du kit de détection que pour la méthode de détection à développer.

3.4.2. Nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose sont une forme dérivée de la cellulose avec un diamètre de 2-20 nm et une longueur de quelques centaines de nanomètres (Boumail et al., 2013). Cette forme cristalline de cellulose (CNC) est à un degré cristallin élevé d'une cellulose où les microfibrilles (chaînes de cellulose) sont étroitement regroupées par un réseau de liaison hydrogène fort et hautement intra/intermoléculaire (Zhou & Wu, 2012). La CNC présente de nombreuses caractéristiques telles que des dimensions à l'échelle nanométrique, une surface élevée et facilement modifiable chimiquement, une morphologie unique, une faible densité (estimée à 1,61 g / cm³ pour la cellulose cristalline pure I), une faible consommation d'énergie, une biodégradabilité et une biocompatibilité. Il représente donc également un avantage pour l'environnement et pour la biotechnologie (Habibi et al., 2009; Zhou et Wu, 2012). De plus, plusieurs revues de littérature révèlent que c'est un des nano-renforts les plus ajoutés dans de nombreuses matrices polymériques solubles et insolubles dans l'eau (ex. chitosane, amidon, carraghénane et alginate) (Dong et al., 2012; Khan et al., 2012; Habibi et al., 2009; De Mesquita et al., 2012; Zhou et Wu, 2012). Aussi, cette capacité de renforcement du film à base de chitosane est importante puisque le renforcement au CNC du film peut améliorer de plus de 25% la résistance à la traction et permettre son utilisation pour des emballages, supports d'immobilisation ou encapsulations (Khan et al., 2012).

3.4.3. Glycérol

Le glycérol (Gly) est un agent plastifiant couramment utilisé pour la préparation de biopolymères. De plus, comparativement à l'éthylène glycol et au propylène glycol, il a une meilleure efficacité de plastification (Srinivasa et al., 2007; Ziani et al., 2008). Il est également utilisé pour éviter la fragilité des films biopolymères (Srinivasa et al., 2007). La fragilité des polymères naturels se caractérise par la faible force intermoléculaire. Grâce à la présence du plastifiant, cette fragilité naturelle des polymères est réduite (Srinivasa et al., 2007). Cette réduction a conduit à l'amélioration des propriétés mécaniques du film telles que l'augmentation de la mobilité des chaînes biopolymères du film (film flexible et élastique) ainsi que la résistance à la perforation et à la déshydratation du film (Srinivasa et al., 2007). Les études de Leceta et al. (2013) permettent également de montrer que la présence de plastifiant comme glycérol dans la solution de chitosane permet d'obtenir un support d'immobilisation caractérisé par la flexibilité et la résistance.

3.4.4. Tripolyphosphate de sodium

Le tripolyphosphate de sodium (TPP, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) est un polyanion dont la dissolution dans l'eau libère des ions hydroxyle et phosphorique (Bhumkar & Pokharkar, 2006). Le TPP est un bon agent de réticulation alternatif du chitosane pour éviter la toxicité de molécules comme le glutaraldéhyde dans la délivrance de protéines et de vaccins (Bhumkar & Pokharkar, 2006). Le TPP est également un agent d'insolubilisation de film à base de chitosane puisque son absorption par ces films empêche la rétention d'eau par le film (hydratation et gonflement) (Bhumkar & Pokharkar, 2006; Shu & Zhu, 2002).

3.4.5. Glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde (GA) est un dialdéhyde linéaire à cinq atomes de carbone qui permet de réticuler (lier) ensemble deux molécules contenant des amines

primaires (Albarghouthi et al., 2000; Migneault et al., 2004). C'est une substance incolore qui est soluble dans l'eau, dans l'alcool et dans les solvants organiques. C'est l'agent de réticulation le plus utilisé du fait de sa disponibilité commerciale, de son faible coût et de sa haute réactivité aux amines primaires (Migneault et al., 2004). Le rendement associé à son utilisation en présence d'amines primaires est de plus de 85% (Krajewska, 2004; Seuryck-Servoss et al., 2007b). Il est également l'un des procédés de couplage chimique les plus simples qui a lieu spontanément à une température neutre générant une réticulation stable de points de vue thermique et chimique (Migneault et al., 2004).

3.5. La méthode de détection : révélation colorimétrique

La méthode de révélation est de type colorimétrique et faite par la réaction entre la peroxydase de raifort fixée à un anticorps secondaire et son substrat, le 3,3',5,5'-Tetraméthylbenzidine (TMB). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet une détection visuelle. Cet anticorps étant de type monoclonal et dirigé contre les anticorps polyclonaux anti-p60, il contribuera à l'amplification du signal de détection puisque pour une protéine capturée il y aura plusieurs anticorps polyclonaux à sa surface qui seront chacun détecté par un troisième anticorps. Néanmoins, l'inhibition enzymatique de la peroxydase et l'instabilité de son substrat de détection sont des paramètres qui rendent peu fiable cette méthode de révélation et peuvent conduire à des faux négatifs en cas d'inhibition enzymatique. D'où le fait que cette méthode sera changée dans la version définitive du kit par une méthode de détection optique plus stable et plus performante de détection dirigée contre l'anticorps polyclonal de telle sorte qu'il amplifiera la détection de l'antigène capturé.

4. Problématique, hypothèses, objectifs et résultats

4.1. Problématique

L'inefficacité du contrôle des toxiinfections d'origine alimentaire (TIA) au cours des dix dernières années dans le monde (entre 2008 et 2017) montre l'enjeu majeur de celles-ci en sécurité sanitaire des aliments. En effet, les conséquences occasionnées sont importantes puisque dans le cas de *L. monocytogenes*, ces inconvénients se chiffrent sur la santé humaine en milliers de personnes affectées chaque année (23000 personnes malades au Canada et aux États-unis) et au niveau économique en milliards de dollars (US \$) (Flynn, 2014 ; Thomas et al., 2015); Organisation mondiale de la santé, 2015). Beaucoup d'efforts ont été faits par les services de santé et les industriels pour développer et assurer une surveillance spécifique des pathogènes d'origine alimentaire. Cependant, un pathogène comme *Listeria monocytogenes* représente encore aujourd'hui un défi majeur en santé public puisque le temps d'analyse des méthodes de détection officielles affecte la performance de celles-ci (Lopez, 2008; Velusamy et al., 2010; Yoo & Lee, 2016). Ainsi, il devient impératif d'améliorer les procédures d'enrichissement dans le développement d'une méthode de détection afin d'accélérer le traitement des échantillons et d'éviter la contamination croisée entre deux lots différents de production.

4.2. Hypothèse

- 1- Le développement d'un test immunologique de détection spécifique de *Listeria monocytogenes* pouvant être utilisé durant les procédures d'enrichissement peut être une solution à la réduction du temps d'analyse de détection.
- 2- L'optimisation d'un milieu d'enrichissement sélectif de *L. monocytogenes* pouvant favoriser plus rapidement l'expression de sa cible antigénique (la

protéine p60) permet de réduire le temps nécessaire du seuil de croissance de la bactérie.

- 3- Le développement et l'optimisation d'un support de détection permettant d'assurer la stabilité et la bonne orientation des anticorps immobilisés sur celui-ci peuvent favoriser une meilleure exposition de la protéine p60 à l'anticorps de capture durant la croissance de la bactérie.

4.3. Objectifs

Les différents objectifs visés par le projet de recherche sont les suivants :

- **Objectif 1** : Mettre au point une méthode de détection pour *L. monocytogenes* et l'optimiser.
- **Objectif 2** : Optimiser un milieu d'enrichissement sélectif favorisant l'expression de la protéine p60 de *Listeria monocytogenes* afin de réduire le temps d'incubation afin de permettre une détection rapide des pathogènes.
- **Objectif 3** : Développer un support de détection et optimiser la méthode d'immobilisation des anticorps spécifiques à la protéine p60 de *L. monocytogenes* afin d'obtenir un support solide transférable vers l'industrie pour la version définitive du kit.

4.4. Méthodologie

4.4.1. Méthodologie générale du projet

Lors du développement d'une méthode de détection basée sur le principe du dépistage immunologique et de la technologie du biocapteur, quatre facteurs critiques sont importants à contrôler et optimiser (Karaszkiwicz, 2005; Yoo et Lee, 2016). Ces facteurs sont l'anticorps (biorécepteur), l'antigène (le ligand), le support de détection et la méthode de révélation (substrat de détection). Pour chacun de ses facteurs, il est important de contrôler et d'optimiser les paramètres propres à eux (concentration, temps de réaction ou d'expression, composition, propriétés mécaniques et chimiques etc.) puisque ces facteurs dépendent de ces

paramètres. Le contrôle et l'optimisation de ces facteurs est également important puisque leur efficacité sur la détection est différente pour chaque bactérie pathogène. Ainsi, tout au long du projet, la maîtrise et l'optimisation de ces facteurs ont été la base des travaux effectués.

Les différentes techniques de laboratoire utilisées pour atteindre nos objectifs sont a) la cinétique de croissance couplée à l'observation microscopique pour étudier la croissance de la bactérie dans différents milieux; b) le western blot pour confirmer l'expression de la protéine p60 dans les milieux de croissance de la bactérie et évaluer son expression; c) l'ELISA en sandwich pour détecter la protéine p60 et évaluer l'effet des milieux de culture sur le lien entre l'expression de la protéine p60 et la croissance de *L. monocytogenes*; d) le plan factoriel couplé à l'ELISA en sandwich ont permis d'optimiser un milieu optimal pour l'expression la protéine p60 et la croissance sélective de *L. monocytogenes*; e) L'ELISA indirect, pour évaluer l'efficacité d'immobilisation des anticorps monoclonaux; f) la méthode d'insolubilisation et de réticulation, pour fonctionnaliser la membrane à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol (CCG) pour l'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-pepD de la protéine p60; g) la méthodologie de surface de réponse pour optimiser la méthode d'immobilisation des anticorps monoclonaux sur la membrane CCG; h) la caractérisation par FTIR a été utilisée pour les études de la structures chimique de la membrane CCG alors que l'observation par microscopie à balayage et l'évaluation des propriétés mécaniques ont été effectués par l'études de la structure moléculaire de m-CCG. Toutes les techniques citées sont décrites en détails dans les **Article 1**, **Article 2** et **Article 3**. Les techniques détaillées ci-dessous sont celles qui ne figurent pas dans un article soumis.

La **Figure 4** est un résumé de la méthode de détection développée au cours de ce projet de recherche.

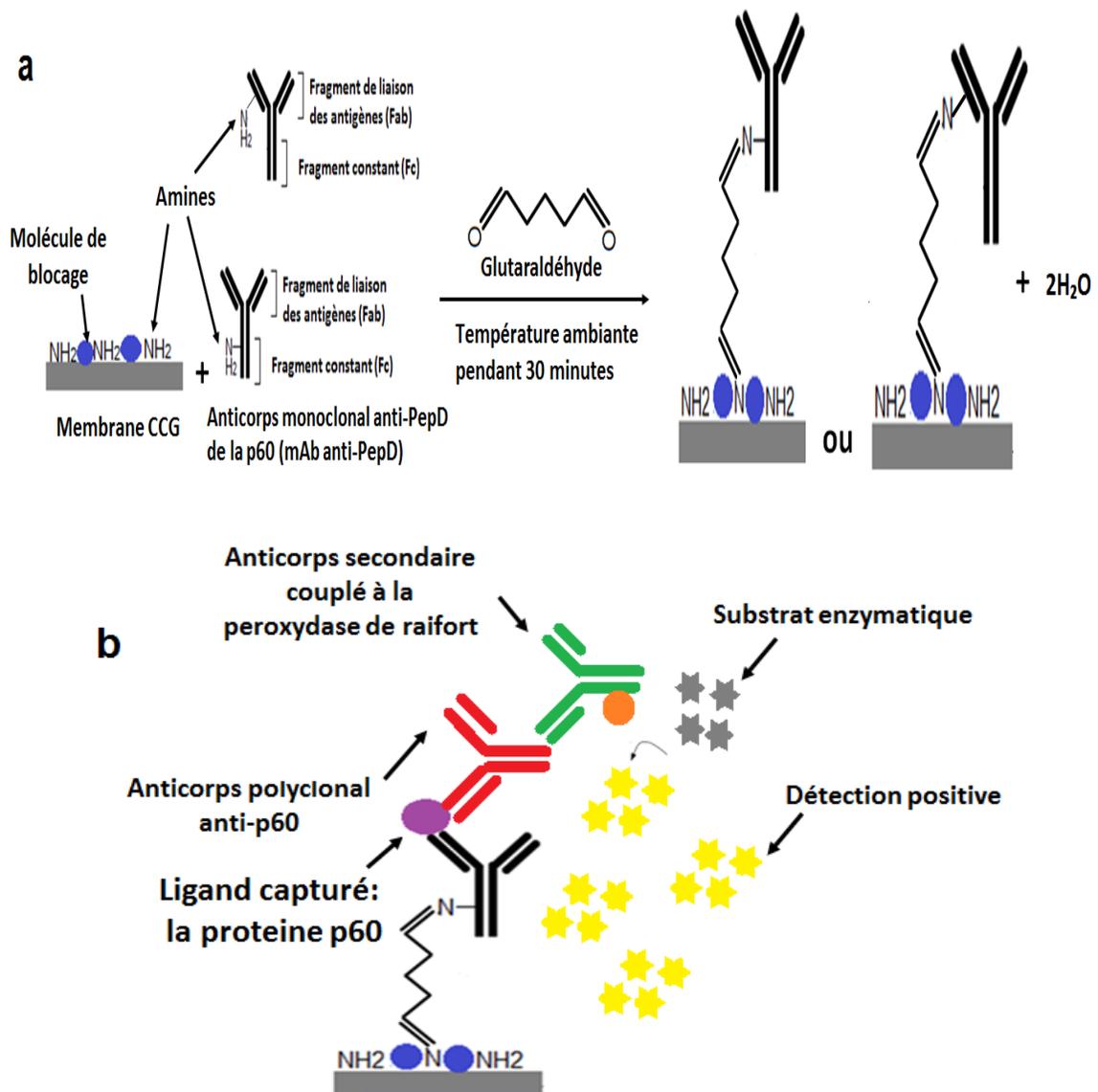


Figure 4: Illustration de la méthode de détection développée et basée sur le principe d'un biocapteur immunologique.

a : illustration de la méthode d'immobilisation des anticorps; b : illustration de la méthode d'ELISA en sandwich sur la membrane CCG.

4.4.2. La méthode de la DGPS pour l'analyse microbiologique des aliments numéro 30

La méthode de la DGPS pour l'analyse microbiologique des aliments numéro 30 (MFHPB-30) a été utilisée au cours du projet dans le but de tester notre méthode développée avec une procédure échantillonnage environnementale. La MFHPB-30 est une méthode officielle d'échantillonnage de Santé Canada permettant l'isolement de *Listeria monocytogenes* et autres *Listeria spp.* dans les aliments et les échantillons environnementaux.

Dans le cadre de notre projet qui cible les échantillons environnementaux, la MFHPB-30 a permis de déterminer les dimensions des surfaces à écouillonner à l'aide d'une éponges (900 cm² soit 30 x 30 cm) et de déterminer le volume du milieu d'enrichissement de *Listeria monocytogenes* capturée durant sa croissance par notre méthode (Public Health Agency of Canada, 2011).

4.4.3. Le test du Purpald

Le Purpald (Sigma Aldrich, ON, Canada) est un composé chimique du nom de 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, 4-amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole-3-thiol. Il fut utilisé pour la quantification des aldéhydes libres à la surface de billes de résine (Cournoyer et al., 2002). Le Purpald en présence d'aldéhydes libres va se lier avec ceux-ci et former un composé intermédiaire. Ce composé intermédiaire donnera à son tour un nouveau composé chimique par oxydation avec l'air. Le nom du nouveau composé formé est violet et se nomme le 6-mercapto-3-substituteds-triazolo-[4,3-b]-s-tetrazine.

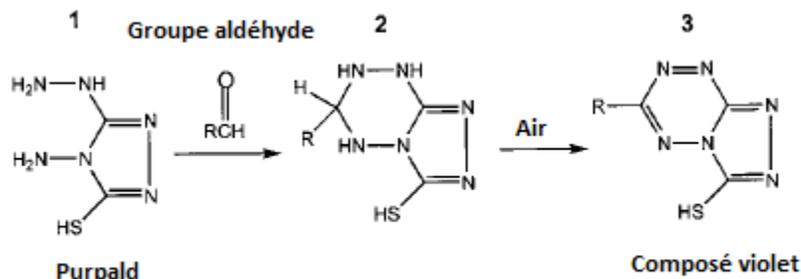


Figure 5: Réaction ayant lieu lors du test de purpald pour la quantification des aldéhyde libres en solution. (Cournoyer et al., 2002).

Où : 1 représente le Purpald: 4 – amino – 3 – hydrazino – 5 – mercapto – 1, 2, 4 – triazole, 4 – amino – 5 – hydrazino – 1, 2, 4 – triazole – 3 – thiol; 2 représente le composé intermédiaire et; 3 représente le composé violet, le 6-mercapto-3-substituted-triazolo-[4,3-b]-s-tetrazine.

Dans le cadre du projet, ce composé a été utilisé pour quantifier les aldéhydes libres restants dans le surnageant de différentes solutions de glutaraldéhyde utilisé pour la réticulation de la membrane CCG avant immobilisation des anticorps sur celles-ci. Ainsi, dans l'application du test, 1 % (p/v) de Purpald est dissout dans une solution de NaOH 1M. Dans une microplaque de 96 puits (Corning, ON, Canada), 20 µL de l'échantillon à tester sont mélangés avec 200µL de la solution de Purpald dans le NaOH à 1%. Le développement de la réaction a lieu à l'air libre et durant 5 minutes ou jusqu'à ce que la couleur violette apparaisse. Par la suite, la couleur obtenue est lue au lecteur optique de microplaque à 562 nm.

4.5. Résultats

4.5.1. Résumé des résultats des trois articles rédigés

Les premiers travaux effectués dans le projet (**Article 1**) ont permis de valider la pertinence du choix de la protéine p60 dans le développement d'un test immunologique pouvant être utilisé durant sa croissance de *Listeria monocytogenes* (**objectif 1**). En effet, les résultats obtenus pour l'effet des milieux d'enrichissement sélectifs sur la croissance de la bactérie montrent que la protéine est exprimée en début de croissance puisque pour une densité cellulaire de 0.37, il est possible de détecter la protéine p60 à son seuil minimal ($A_{450nm}=0.1$). Cette observation peut être illustrée par des exemples comme dans le milieu Fraser et dans les milieux LEB et LEB modifié (environ 5 heures de cinétique) où la détection de la protéine p60 est au seuil minimal ($A_{FB450nm18h}=0.12$, ($A_{450nm 5h}=0.1$ pour LEB et LEB modifié). La croissance bactérienne et l'expression de la protéine p60 détectée sont également affectées de la même façon (l'impact proportionnel) dans

ces différents milieux (**objectif 1**). Ces milieux sont entre autres le Listeria enrichment broth (LEB), Fraser broth (FB) et University of Vermont medium (UVM). Ces milieux affectent la vitesse de croissance durant la phase de latence de la bactérie. Une déformation des cellules de *L. monocytogenes* dans ces milieux est observable au microscope photonique durant la phase de latence. La méthode de western blot confirme également que la protéine p60 dans ces milieux est exprimée, mais sa détection est affectée comme la croissance de la bactérie (**objectif 1**). Ensuite, dans le cadre de l'**objectif 2**, les travaux révèlent également que le milieu LEB est le meilleur milieu d'enrichissement sélectif de croissance de *L. monocytogenes* et d'expression de la protéine p60. Toutefois, une optimisation des composants nutritifs du LEB fut nécessaire puisque la phase de latence dans ce milieu sélectif est plus longue et l'expression de la protéine p60 est plus faible comparativement au milieu non sélectif tel que le trypticase soy broth, (TSB). Ainsi, le criblage de différents composants du milieu LEB a été évalué dans un plan factoriel (2^k). Ce plan factoriel avait pour but de déterminer le facteur clé qui favorise l'expression de la protéine p60 durant la croissance de *L. monocytogenes* dans le LEB. Les cinq composés nutritifs du LEB testés comme des facteurs dans le plan factoriel (2^5) sont le D-glucose (entre 0.25 et 2% (v/v)), les extraits de levure (entre 0.6 et 3% (v/v)), le tryptone (entre 1.7 et 4.5 % (v/v)), la peptone (entre 0.3 et 2.5% (v/v)) et le phosphate de potassium dibasique (entre 0.25 et 2% (v/v)). Les résultats obtenus montrent que le dextrose (D-glucose) dans le milieu LEB était le facteur clé pour favoriser une meilleure expression de la protéine p60 et ceux dans un délai plus court de croissance de la bactérie. Seule la modification de la concentration du dextrose a un effet significatif ($p \leq 0.05$) sur l'expression de la protéine p60. De plus, la concentration optimale du milieu LEB requise est de 0.5% (v/v) de dextrose (LEB modifié) pour favoriser une expression efficace de la protéine p60 sans affecter la vitesse de croissance de la bactérie. Aussi, la comparaison d'une cinétique de croissance dans les milieux LEB et LEB modifié révèle que l'optimisation de la concentration en dextrose favorise une expression plus précoce et efficace de la protéine p60. Les résultats obtenus montrent que pour une charge bactérienne initiale élevée ($\sim 10^8$ UFC/mL), le seuil de détection

limite (0.1 d'absorbance \approx 0.1 ug/mL de protéine p60) peut être atteint dans les deux milieux après 5 heures de croissance. Cependant, une augmentation de 13% de la protéine p60 est observable dans le milieu LEB modifié au bout de 7 heures d'incubation et elle est exprimée plus efficacement au bout de 9 heures (48% d'augmentation) au lieu de 18 heures d'incubation (**objectif 2**). De plus, la sélectivité de croissance en présence de neuf bactéries retrouvées dans les aliments et les surfaces de contact avec les aliments, de même que la spécificité de mAb anti-PepD à *L. monocytogenes* ont été testées pour le milieu LEB modifié. Les résultats permettent de confirmer la sélectivité du milieu LEB modifié aux espèces *Listeria* sp. et la préservation de la spécificité de détection de la protéine p60 par mAb anti-PepD dans ce milieu (**objectif 2**).

Les résultats présentés dans l'**Article 2** et l'**Article 3** représentent les travaux effectués dans le cadre du développement d'un support d'immobilisation des anticorps monoclonal anti-p60 et de détection de la protéine p60 durant la croissance de *L. monocytogenes* dans le milieu LEB modifié (**objectif 3**). Dans la première partie de ces résultats (**Article 2**), une membrane à base de chitosane, de nanocristaux de cellulose et de glycérol (m-CCG) a été développée. Grâce à la spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier (FTIR), la disponibilité de groupements réactifs importants dans le chitosane (les amines primaires) pour la méthode d'immobilisation des anticorps sur un support ont pu être mis en évidence à la surface de la membrane m-CCG. L'utilisation de la spectroscopie FTIR et l'observation de m-CCG au microscope électronique à balayage (SEM) ont également permis de comprendre et de mettre évidence la participation de chaque composant de la membrane CCG dans la chimie intra et inter moléculaire de m-CCG. Ensuite, dans une seconde partie de l'**Article 2**, les travaux présentent le développement et l'optimisation de la méthode d'immobilisation des anticorps sur la membrane CCG. Dans cette partie également, la spectroscopie FTIR a permis de mettre en évidence la formation d'un lien covalent entre les amines primaires (NH₂) du chitosane de la m-CCG et NH₂ présents dans les anticorps monoclonaux anti-p60 par le biais d'un dialdéhyde appelé le glutaraldéhyde. La réaction par

laquelle se fait ce lien covalent permettant d'immobiliser mAb anti-PepD sur m-CCG est appelé la réticulation. Par la suite, une optimisation de la méthode de réticulation a été effectuée par modélisation mathématique. La première partie de cette immobilisation s'est faite par un plan factoriel dans le but de déterminer les paramètres clés de la membrane et de la méthode de réticulation qui permettent d'immobiliser efficacement les anticorps monoclonaux anti-p60. Pour un degré de déacétylation du chitosane fixé à 85% et une surface disponible de m-CCG par puits 1.7 cm², différents tests préliminaires ont été effectués et ont permis de sélectionner les six paramètres suivants comme des facteurs du plan factoriel (2⁶) : la concentration de la CNC (entre 0 et 0.6% (p/v)), le poids de m-CCG par puits (entre 0.5 g et 1 g), la concentration de la solution de tripolyphosphate de sodium (TPP) servant à insolubiliser m-CCG (entre 5% et 10% (p/v)), la concentration de la solution de glutaraldéhyde (GA) utilisée pour la réticulation de mAb anti-PepD sur m-CCG (entre 0.2% et 0.4% (v/v)), la concentration des anticorps monoclonaux anti-p60 (mAb anti-PepD, entre 10 µg/mL et 20 µg/mL (p/v)) et le temps de la réaction d'immobilisation de mAb anti-PepD sur CCG (Tim mAb anti-PepD, entre 2 et 3 heures). Les résultats obtenus montrent que la concentration de la CNC, le poids de m-CCG par puits et le Tim mAb anti-PepD sont les facteurs clé de la méthode de réticulation des anticorps monoclonaux anti-p60 sur m-CCG. Seul leur effet est significatif ($p \leq 0.05$) sur l'efficacité d'immobilisation des anticorps. Par la suite, la CNC, le poids de m-CCG par puits et le Tim mAb anti-PepD ont été testés comme les trois facteurs clés dans la méthodologie de surface réponse (RSM) utilisant le plan Box Behnken à pente ascendante. L'application de la RSM après la détermination d'au moins deux facteurs clés permet d'obtenir un modèle prédisant la réponse désirée. Dans le cas de l'optimisation de la méthode de réticulation, la réponse à prédire est l'efficacité du signal d'immobilisation des anticorps. Le choix du plan dans la RSM est le plan Box Behnken à pente ascendante puisque les facteurs clé sont au nombre de trois et que nous recherchions le facteur ayant un effet linéaire sur l'efficacité du signal. Ainsi, les résultats observés révèlent que le modèle obtenu pour prédire la réponse est également significatif ($p \leq 0.05$; $R^2 = 0.91$) et permet

par le paramètre « lack of fit » non significatif ($p > 0.05$) de confirmer que le modèle prend en compte toutes les variations pouvant affecter la réponse. L'optimisation révèle également que seule la CNC a un effet significatif linéaire ($p \leq 0.05$) sur l'efficacité du signal d'immobilisation des anticorps, même si son interaction avec les autres facteurs clés a aussi un effet significatif ($p \leq 0.05$) sur l'efficacité d'immobilisation. À 0.6% de CNC, il est plus facile d'obtenir un bon niveau du signal d'immobilisation quelle que soit la variation des autres facteurs clés. Des tests de validations du modèle ont été effectués et ont permis de sélectionner les combinaisons suivantes des facteurs clés pour la détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* sur la membrane CCG : 0.6% de CNC, 0.5 g de m-CCG par puits et 2 heures de réaction pour l'immobilisation des anticorps (Tim mAb anti-PepD) (**objectif 3**).

Dans une dernière partie de ces résultats (**Article 3**), la membrane CCG contenant les anticorps monoclonaux immobilisés par la méthode de réticulation optimale a été utilisée pour détecter la protéine p60 de *L. monocytogenes* (**objectif 1 et 3**). Les travaux de détection sur m-CCG ont été faits à partir d'une culture bactérienne de *L. monocytogenes* dans le LEB modifié et le TSB afin de : a) comparer le nouveau support d'ELISA en sandwich avec la microplaque standard et, b) vérifier la spécificité du test de détection sur la membrane CCG. Les résultats obtenus montrent premièrement que m-CCG améliore le niveau du signal de détection de la protéine p60 comparativement à la microplaque standard (32% d'augmentation pour la protéine p60 recombinante) et ce quel que soit le milieu testé. Une augmentation de 17% est observable pour le TSB tandis que pour le LEB modifié, l'augmentation est de 24%. Ensuite, les résultats obtenus pour la spécificité du test de détection de *Listeria monocytogenes* en présence de neuf autres bactéries montrent que la détection sur la membrane CCG est spécifique à la protéine p60 de *Listeria monocytogenes* dans les deux milieux testés. Par contre, un faible niveau de réaction croisée est observable ($A \sim 0.1$) pour les bactéries *L. innocua* et *S. aureus* β hémolytique dans le TSB. Cette observation permet de confirmer que l'utilisation du LEB modifié pour la détection sur la membrane CCG est plus efficace pour réduire les réactions croisées sur le support qui pourrait réduire la

spécificité du test de détection. Enfin les derniers travaux de cette partie ont été faits sur des échantillons de surface en contact avec de la viande de porc hachée faiblement contaminée par *Listeria monocytogenes* (10^2 UFC/mL). Les résultats montrent qu'après une incubation de 48 heures de croissance, le support développé est capable de détecter spécifiquement et efficacement (~ 1 $\mu\text{g/mL}$) la protéine p60 de *L. monocytogenes* dans des échantillons de surface.

4.5.2. Résultats de la démarche scientifique utilisées pour le développement du projet

Cette partie des résultats comprends d'autres travaux qui ne sont pas inclus dans les article à soumettre. Toutefois, il est important de les présenter dans le mémoire pour comprendre la démarche de recherche effectuée et répondre aux objectifs du projet.

Ces travaux sont premièrement, l'étude de l'effet indépendant des paramètres impliqués dans la méthode d'immobilisation des anticorps sur la membrane **(objectif 3)**. En effet, concernant l'importance de l'insolubilisation de la membrane CCG au tripolyphosphate de sodium (TPP) avant la réticulation de la membrane, une série de tests a été effectuée. Le premier test présenté (**Figure 6**) permet d'évaluer l'effet des différents traitements d'insolubilisation (m-CCG+TPP) et de réticulation (m-CCG+GA) et leur effet combiné (m-CCG+TPP+GA) sur le pourcentage d'augmentation du poids de la membrane (pourcentage de déformation) et sur son absorption en eau après les différents traitements. Dans le cas des traitements sur la membrane CCG, les résultats obtenus montrent que les traitements individuels au TPP (m-CCG+TPP) et GA (m-CCG+GA) ont conduit à une augmentation du poids de la membrane CCG de plus de 50% pour le TPP (51% pour m-CCG+TPP) et GA (63% pour m-CCG+GA). Cependant, l'augmentation du poids de m-CCG est plus faible (moins de 50%) lorsque les deux traitements sont combinés (22% pour m-CCG+TPP+GA). Cette faible augmentation représente 29% en moins de l'effet causé par le TPP seul et 41% en moins que pour le GA seul. Les deux traitements affectent donc

individuellement la membrane CCG, mais leur combinaison réduit l'effet que ceux-ci peuvent avoir sur la structure de la membrane. Dans le cas de l'absorption en eau de la membrane (hydratation), les résultats montrent que le pourcentage d'absorption en eau de la membrane est très élevé en absence de traitements (72% pour m-CCG + eau). D'où, la membrane est très perméable et déformable dans l'eau. Les résultats permettent également d'observer que l'hydratation de la membrane est plus élevée lorsque la membrane est réticulée sans insolubilisation au préalable (m-CCG+GA). Le pourcentage d'absorption en eau est de 54 % dans le cas du traitement GA seul (m-CCG+GA) tandis qu'il est de moins de 50% dans le cas du TPP (16% pour m-CCG+TPP) et des traitements combinés (9% pour m-CCG+TPP+GA). Ces observations suggèrent que la membrane absorbe également la solution de glutaraldéhyde même si cela est 18% moins élevé que pour l'eau. Ces résultats suggèrent aussi que le TPP est un bon agent d'insolubilisation de la membrane CCG puisqu'il réduit la déformation que peut occasionner le traitement de GA seul lors de la réticulation et empêche l'absorption de la membrane en eau. Néanmoins, l'effet combiné des deux traitements (m-CCG+TPP+GA) sur la déformation de la membrane CCG est plus efficace pour réduire l'absorption en eau (m-CCG + eau) de la membrane CCG de moins de 63%, en glutaraldéhyde (m-CCG+GA) de moins de 45% et en TPP seul de moins de 7% (**objectif 3**).

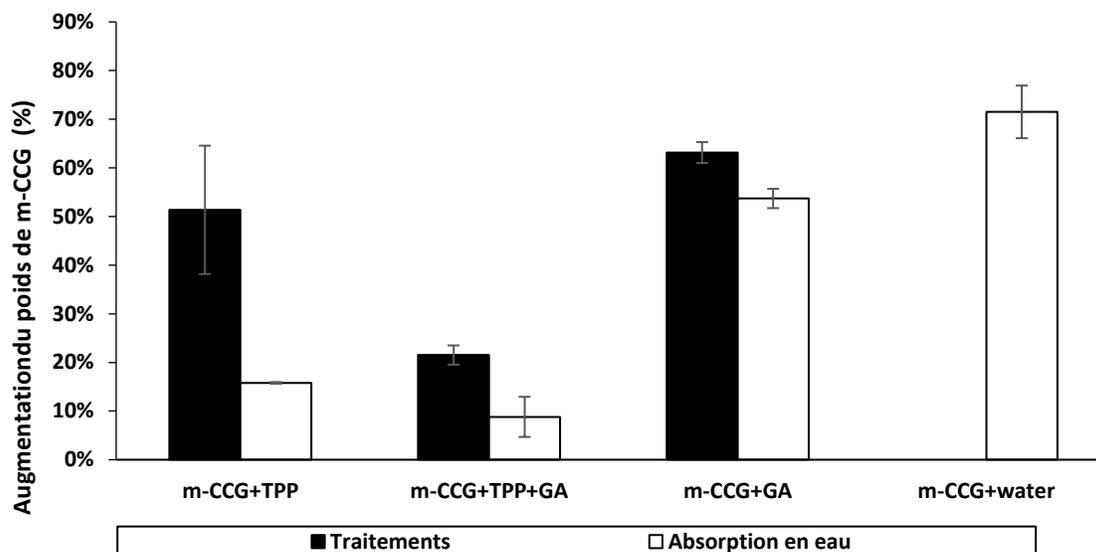


Figure 6: Effet des traitements sur le poids de la membrane CCG et sur son absorption en eau.

Visuellement (**Figure 7 A**), l'effet de l'insolubilisation de la membrane CCG au tripolyphosphate de sodium (m-CCG+TPP) se traduit par un palissement de m-CCG alors que la réticulation au glutaraldéhyde (m-CCG+GA) se traduit par une déformation visible de la membrane CCG (repliement et brisure). Par contre, La combinaison des deux traitements (m-CCG+TPP+GA) conduit visuellement à une réduction du palissement de la membrane CCG et une absence de la déformation de celle-ci (**Figure 7A**). L'effet individuel des traitements de TPP et GA sur la surface et la structure de la membrane CCG est donc atténué par la combinaison de ces deux traitements. La **Figure 7 B** illustre l'effet de l'insolubilisation de l'absorption en eau de la membrane. En effet, l'absorption en eau de la membrane (m-CCG + eau) se traduit par un élargissement de celle-ci qui lui fait doubler de de poids (72% dans la **Figure 6**) tandis qu'une insolubilisation au préalable empêche cette augmentation du volume et la déformation observée (**objectif 3**).

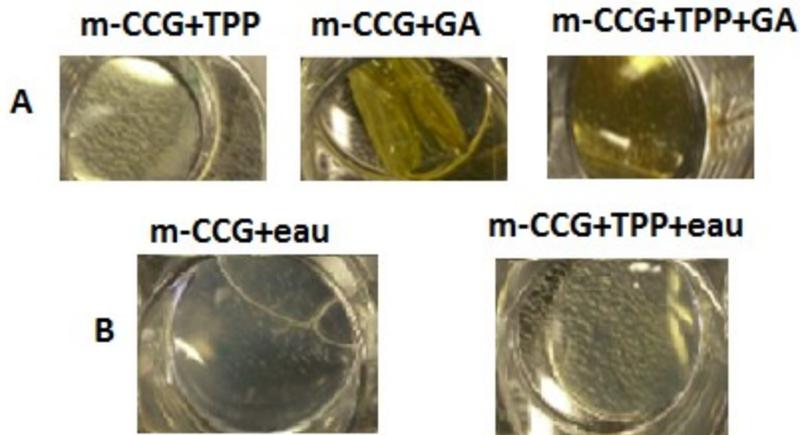


Figure 7: Effet visuel des traitements d'insolubilisation au TPP et de réticulation au glutaraldéhyde (GA) de la membrane à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol (CCG).

L'effet des traitements de TPP et de GA sur l'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-p60 (mAb anti-PepD) à la surface de la membrane CCG sont présentés à la **Figure 8**. Les résultats obtenus montrent qu'en absence comme en présence du tripolyphosphate de sodium, la déformation occasionnée par la méthode de réticulation au glutaraldéhyde (GA) sur la membrane CCG n'empêche pas l'immobilisation des mAb anti-PepD. L'absorbance du signal de détection (A) est supérieure à 0.1 (seuil limite de détection des anticorps) et ce, quel que soit le temps de réaction du traitement de réticulation au GA (GA_T). Néanmoins, une importante variation du signal de détection ($A_{\text{minimum}} = 0.29$ pour $GA_T = 10$ minutes) peut être observée lorsque m-CCG n'est pas insolubilisée au préalable avec du TPP (TPP-). Alors que dans le cas d'un traitement préalable au TPP de m-CCG, la réticulation est plus efficace quel que soit le temps de réaction testé ($A_{\text{minimum}} = 1.33$ pour $GA_T = 5$ minutes) et le temps optimal de réaction est observable au bout de 30 minutes. Ces observations confirment l'importance de l'insolubilisation au TPP pour le maintien de la structure de la membrane CCG, mais aussi pour obtenir une réaction de réticulation menant à une immobilisation efficace des mAb anti-PepD. Les résultats suggèrent également que la méthode

de réticulation au glutaraldéhyde sur la membrane CCG est optimale au bout de 30 minutes de réaction (**objectifs 3**).

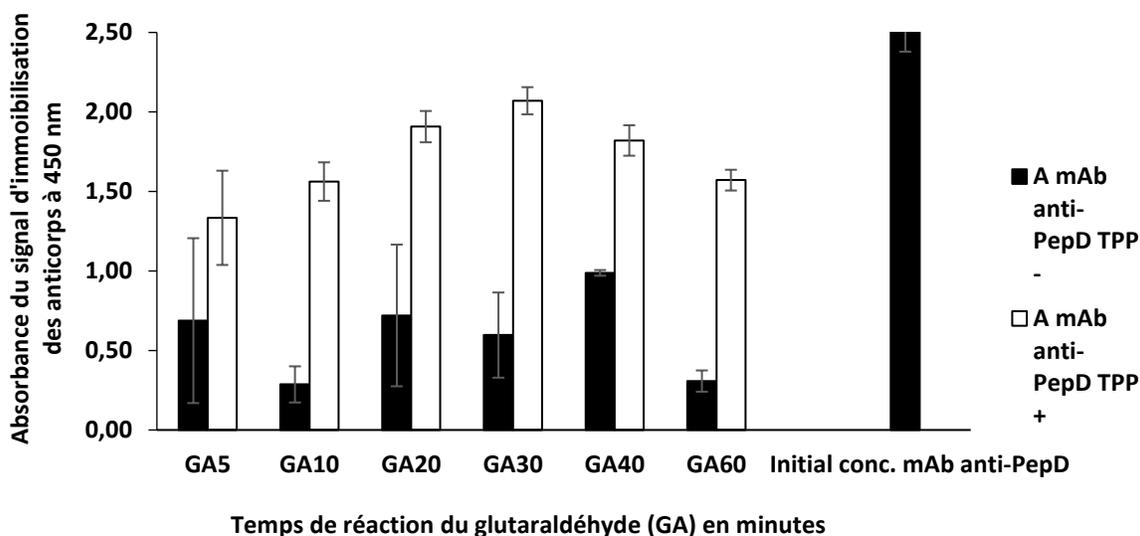


Figure 8: Effet du glutaraldéhyde sur le signal d'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-PepD (mAb anti-PepD) sur la membrane à base de chitosane, de nanocristaux de cellulose et de glycérol (m-CCG) en présence et absence d'une solution de tripolyphosphate de sodium (TPP).

De plus, des tests d'évaluation visuelle et de détection de l'immobilisation des anticorps mAb anti-PepD sur la membrane CCG ont été effectués afin de mettre en évidence l'effet des nanocristaux de cellulose (CNC) sur le traitement d'insolubilisation au tripolyphosphate de sodium. Ces résultats montrent qu'en présence de la CNC (**Fig. 9A**), un palissement de la membrane CCG est observable dans ses formes libre et fixée (**Fig. 9A1**) sur une microplaque (**Fig. 9A2**). Alors qu'en absence de CNC (**Fig. 9B**), la membrane CCG blanchit et devient opaque lorsqu'elle n'est pas fixée à une microplaque (**Fig. 9B1**). Lorsque la membrane CCG est fixée à une microplaque (**Fig. 9B2**), son insolubilisation au TPP est non homogène. Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'ajout de nanocristaux de cellulose (CNC) est nécessaire pour permettre au TPP d'insolubiliser efficacement la membrane (**objectif 3**).

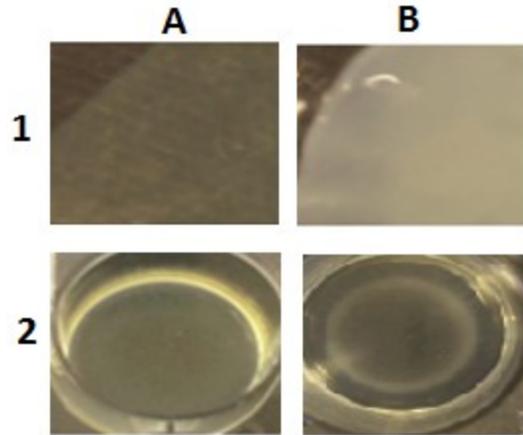


Figure 9: Effet visuel des nanocristaux de cellulose sur le traitement d'insolubilisation au tripolyphosphate de sodium (TPP) de différentes membranes à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol.

A: Membrane à base de chitosane, nanocristaux de cellulose et glycérol (m-CCG);
 B: Membrane à base de chitosane et glycérol (m-CG). 1: Membranes CCG et CG non fixées dans une microplaque; 2: Membranes CCG et CG fixées dans une microplaque.

L'effet de la concentration en aldéhydes à la surface de la membrane CCG après la réticulation a également été évalué. La méthode utilisée pour cette évaluation se base sur la corrélation entre l'efficacité d'immobilisation et la quantification des aldéhydes restant dans le surnageant de la solution de glutaraldéhyde ayant été utilisé pour réticuler la membrane CCG par le réactif Purpald. Dans la première partie de ces travaux (**Figure 10**), une courbe standard de quantification des aldéhydes dans différentes solutions de glutaraldéhyde a été effectuée afin de déterminer si une relation linéaire de quantification pouvait être obtenue par cette méthode. Les résultats obtenus montrent que plus la concentration de glutaraldéhyde (GA) augmente, plus le signal de détection des aldéhydes libres est élevé. Une absorbance du signal de 1.97 est observée à 0.5% (v/v) de GA

alors qu'en présence de 0.1% (v/v) de GA, le signal est de 0.58. Cette observation suggère donc qu'une relation linéaire ($R^2 = 0,9955$) existe entre la concentration de glutaraldéhyde et les aldéhydes libres présents dans celle-ci. L'équation linéaire et le coefficient de régression obtenus sont les suivants :

Equation 1: $y = 3,37x + 0,2405$

y : représente le signal de détection des aldéhydes libres et X représente la concentration de la solution de glutaraldéhyde.

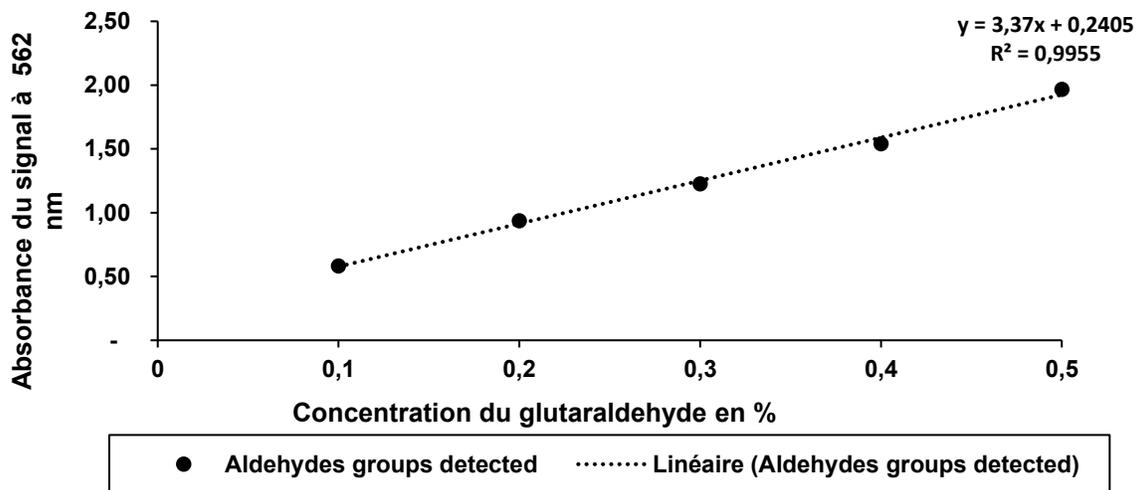


Figure 10: Courbe Standard de quantification des aldéhydes libres dans une solution de glutaraldéhyde à différentes concentrations.

Dans une seconde partie, l'effet de la méthode de quantification des aldéhydes libres du surnageant de la solution de glutaraldéhyde sur l'efficacité d'immobilisation des anticorps à la surface de m-CCG a été évalué à l'aide du test de Purpald et du test d'ELISA indirecte (**Figure 11**). La première partie des résultats (le test du Purpald) révèlent qu'en absence (TPP-) comme en présence du tripolyphosphate de sodium (TPP+) sur m-CCG, le signal de détection des aldéhydes libres dans le surnageant augmente avec l'augmentation de la concentration en glutaraldéhyde sur la membrane CCG. Toutefois, le niveau du signal de quantification des aldéhydes libres dans le surnageant est plus élevé lorsque la membrane est traitée au TPP. Le signal minimum (min) obtenu en

présence d'un traitement au TPP ($A_{TPP+min}=0.15$ à 0.2% (v/v) de GA) est similaire au signal maximum (max) obtenu en absence de traitement au TPP ($A_{TPPmax}=0.15$ à 0.4% (v/v) de GA). Ces observations suggèrent qu'après réticulation de la membrane m-CCG avec le glutaraldéhyde, il y a très peu d'aldéhydes libres restant dans le surnageant (moins de 0.1% (v/v)) lorsque la membrane n'est pas insolubilisée. Or, l'évaluation de l'augmentation du poids de la membrane CCG réticulée en absence de TPP (m-CCG+GA) (**Figure 6**) montre que la solution de glutaraldéhyde est absorbée par m-CCG en absence de TPP (TPP-). Ainsi, la réduction des aldéhydes libres dans le surnageant en absence de TPP (**Fig.11**) suggèrent que la membrane CCG semble absorber l'excès de GA non réticulé à sa surface. À la différence de la membrane insolubilisé (TPP+), cette absorption du GA par le m-CCG en absence de TPP représente une réduction de 10%, 30% et 55% des aldéhydes libres restants dans le surnageant respectif des solutions de glutaraldéhyde de 0.2% (v/v), 0.3% (v/v) et 0.4% (v/v). Les observations suggèrent également que la concentration de 0.2% (v/v) en glutaraldéhyde semble être efficace pour saturer la surface de la membrane CCG en aldéhydes puisque par application de l', la concentration d'aldéhydes restant est très faible voire nulle dans le surnageant de 0.2% en absence ($y=0\%$ (v/v)) comme en présence ($y=0\%$ (v/v)) de TPP sur la membrane CCG. La solution de 0.2% (v/v) semble donc suffisante pour éviter un gaspillage de la solution dans le surnageant après la réticulation comparativement aux solutions de glutaraldéhyde de 0.3% (v/v) et 0.4% (v/v) de concentration. De plus, la membrane semble avoir absorbé complètement tous les aldéhydes libres en absence de TPP puisque à concentration maximale de glutaraldéhyde (0.4% v/v), le signal des aldéhydes libres est aussi de 0.15 ($y=-0.03\%$). Les résultats du test d'ELISA indirect montrent que le signal d'immobilisation de la membrane CCG est plus élevé lorsque la membrane CCG est insolubilisé (TPP+) avant la réticulation (**Fig.11**). Une augmentation de l'efficacité d'immobilisation des anticorps sur la membrane CCG de 35% en présence de 0.2% de GA, de 23% en présence de 0.3% de GA et de 37% en présence de GA est observable lorsque le TPP (5% v/v) est ajouté comparativement à l'immobilisation des anticorps sur m-CCG en absence de TPP.

Cependant, en absence de TPP ($A_{\text{TPP- max}}=0.48$) comme en présence de TPP ($A_{\text{TPP+ max}}=0.83$), la concentration de 0.2% (v/v) de glutaraldéhyde est la meilleure pour optimiser la méthode de réticulation. Ces observations suggèrent qu'au-delà de 0.2% (v/v) de glutaraldéhyde, la membrane semble contenir des aldéhydes en excès qui, malgré les lavages et le retrait du surnageant, affectent l'efficacité d'immobilisation.

Dans la seconde partie de la **Figure 11**, les travaux (le test d'ELISA indirecte) présentent la détection des anticorps monoclonaux anti-p60 immobilisés sur la membrane CCG en fonction de la concentration de glutaraldéhyde utilisée sur le m-CCG. Les résultats (**Fig.11**) montrent premièrement que le signal de détection des anticorps monoclonaux anti-p60 diminue lorsque la concentration du glutaraldéhyde ajouté sur m-CCG insolubilisée (TPP+) et non insolubilisée (TPP-) augmente. Cette diminution du signal de détection des mAb anti-PepD est inversement proportionnelle aux résultats de la quantification des aldéhydes dans le surnageant des trois solutions de glutaraldéhyde testées sur m-CCG (0.2, 0.3 et 0.4% de GA). Néanmoins, en termes de concentration fixe de glutaraldéhyde, les résultats du test d'ELISA indirecte révèlent que le signal de détection de mAb anti-PepD est plus efficace lorsque la membrane CCG est insolubilisée au TPP (TPP+). Par exemple, pour une concentration de 0.2 % (v/v) de glutaraldéhyde, le signal est plus élevé en présence du TPP ($A_{450\text{nm}}=0,83\pm 0.07$) qu'en absence de TPP ($A_{450\text{nm}}=0,48\pm 0.15$). De plus, les résultats montrent que à 0.2 % (v/v) de glutaraldéhyde le signal de détection est plus élevé qu'à 0,3%(v/v) de GA ($A_{450\text{nm}}=0,57\pm 0.13$) et 0.4%(v/v) de GA ($A_{450\text{nm}}=0,58\pm 0.17$). Le signal à 0,3%(v/v) de GA et 0.4%(v/v) de GA est similaire ($A_{450\text{nm}}\sim 0,6$). La comparaison des résultats du test d'ELISA indirecte à ceux du test de Purpald suggère que la membrane CCG insolubilisée, puis réticulée à une concentration de 0.2% (v/v) de GA, est optimale pour immobiliser efficacement les mAb anti-PepD. Les quantifications des aldéhydes dans le test du Purpald montrent qu'au-delà de 0.2% (v/v) de GA, le m-CCG est saturé en aldéhyde. L'excès d'aldéhyde sur la membrane CCG au-delà de 0.2% (v/v) conduit donc à la diminution du signal de détection, mais

n'empêche pas l'immobilisation de mAb anti-PepD entre 0.3%(v/v) et 0.4%(v/v) de GA puisque le signal se stabilise (**objectif 3**).

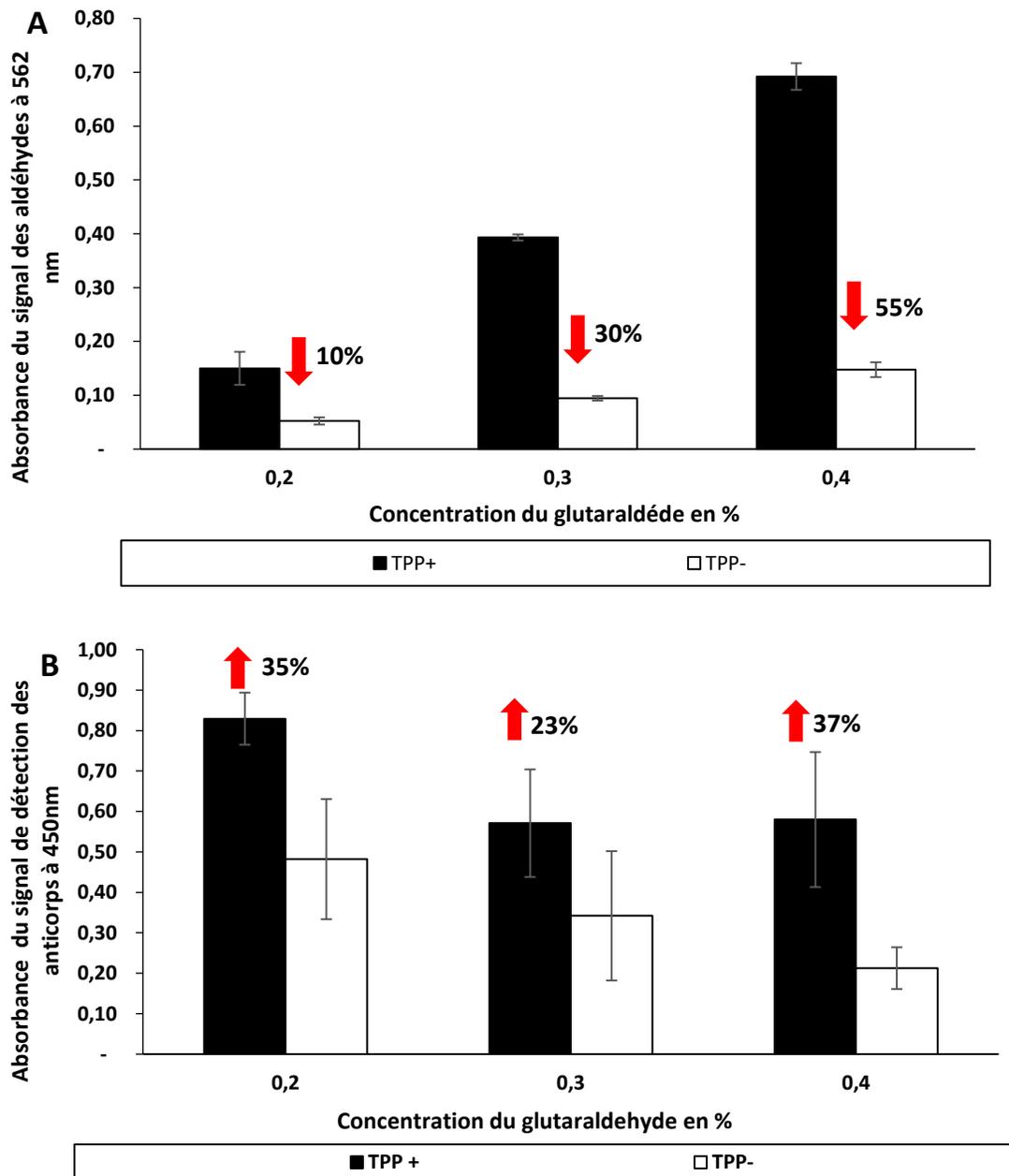


Figure 11: Effets du tripolyphosphate de sodium et du glutaraldéhyde sur la quantification des aldéhydes et sur l'immobilisation des anticorps monoclonal anti-p60 à la membrane CCG.

A : Quantification des aldéhydes sur la membrane CCG par le test du Purpald; B : Détection des anticorps monoclonal anti-p60 immobilisés sur la membrane CCG.

L'effet de la concentration du tripolyphosphate de sodium (TPP) sur la membrane CCG à différents temps d'incubation a été vérifié dans le but de réduire la concentration utilisée de TPP. Les premiers résultats de ce test montrent que l'efficacité de détection de la protéine p60 est affectée par la concentration du tripolyphosphate de sodium puisque seule la variation de la concentration du TPP a un effet significatif ($p \leq 0.05$) sur la détection (**Figure 12 A**). L'effet du temps d'insolubilisation de la membrane CCG au TPP sur les différentes concentrations de TPP n'affecte pas la détection. L'analyse des moyennes du signal de détection en fonction du temps d'exposition de la membrane au TPP est non significative ($p > 0.05$). De plus, les résultats montrent que, quel que soit le temps d'insolubilisation, la concentration de 5% et de 7.5% (p/v) de TPP permettent d'obtenir une détection plus élevée de la protéine p60 ($A \leq 1$) comparativement aux autres concentrations de 10 et 15% (p/v) de TPP ($A > 1$). Cela suppose qu'à faible concentration (5% (p/v) de TPP), une détection efficace de la protéine p60 peut être observée. Néanmoins, à cette concentration (5% (p/v) de TPP), l'exposition prolongée de la membrane CCG au TPP peut affecter le signal de détection de la protéine p60 qui diminue (**Figure 12 B**). Ces observations suggèrent que le temps d'insolubilisation de la membrane CCG affecte la détection de la protéine p60 lorsque la concentration de TPP est fixe ou optimisée. Les résultats montrent également que l'exposition de la membrane CCG à une concentration de 5% (p/v) de TPP pendant 10 minutes est suffisante pour permettre une détection de la protéine p60 (**objectif 1**). Ce fait est aussi confirmé par le plan factoriel présenté à l'article 2 qui montre que la concentration du TPP n'a pas besoin d'être augmentée à plus de 5% pour améliorer l'efficacité d'immobilisation des anticorps de capture de la protéine p60 (mAb anti-PepD).

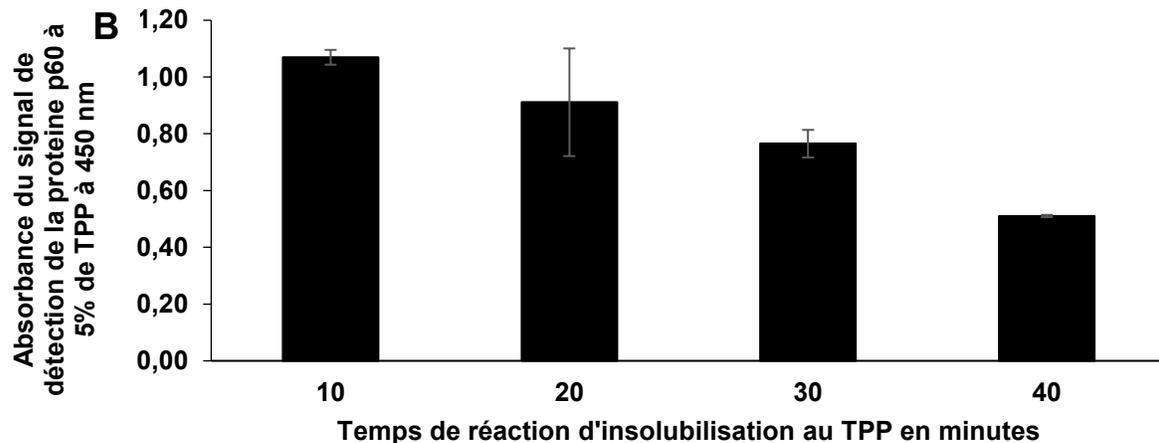
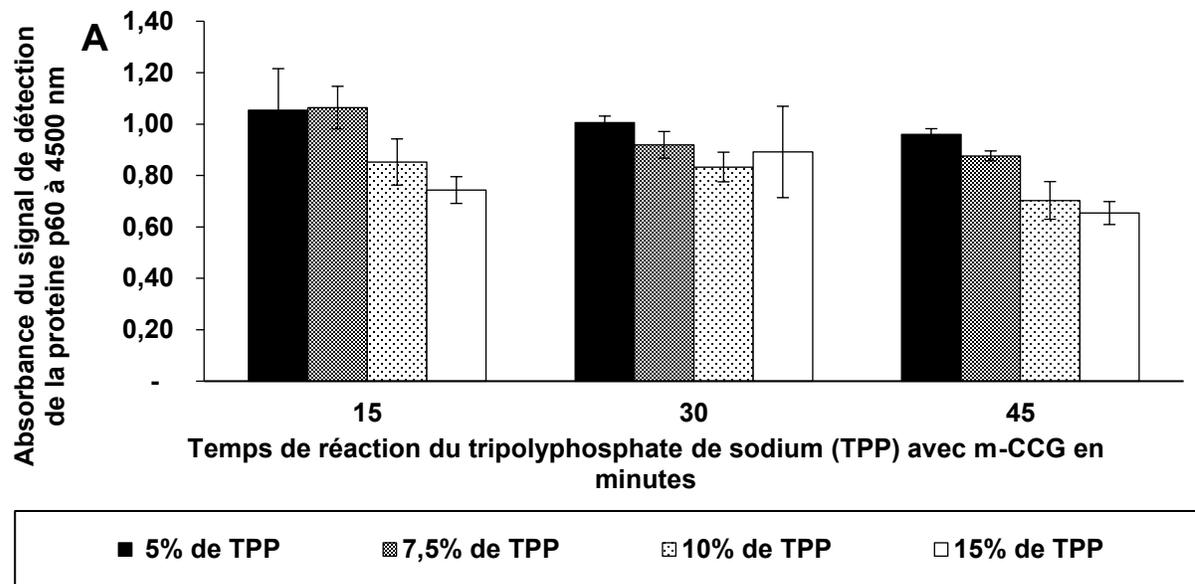


Figure 12: Évaluation de l'effet de la concentration et du temps de réaction du tripolyphosphate de sodium (TPP) avec la membrane CCG sur la détection de la protéine p60 en ELISA en sandwich.

A: Effet de la concentration du TPP à différents temps de réactions. B: Effet du temps de réaction de 5% de TPP avec m-CCG.

Dans une seconde partie, les travaux non soumis dans un journal consistaient à déterminer la source des interactions non spécifiques sur la membrane CCG et à optimiser cette réaction sur la membrane CCG (**objectif 1**). Ainsi, les résultats

obtenus montrent que malgré l'absence des anticorps monoclonaux anti-p60 immobilisés sur la membrane CCG, la protéine p60 recombinante de *L. monocytogenes* (contrôle positif) est détectable sur la membrane CCG ($A > 0.1$) (**Figure 13**). Les résultats montrent également qu'en absence de la protéine p60, les anticorps polyclonaux anti-p60 (pAb anti-p60, anticorps de détection de la capture de la p60) et les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de Raifort (sAb-HRP, anticorps de révélation) ne sont pas détectables sur la membrane. Ces observations suggèrent qu'en absence de l'anticorps monoclonal anti-p60 (anticorps de capture), la protéine p60 recombinante semble interagir avec d'autres composés sur la membrane CCG. L'observation plus précise de la détection de la protéine p60 en absence de mAb anti-PepD révèlent que la détection p60 est plus élevée ($A > 2$) lorsque la membrane CCG est au préalable insolubilisé au TPP (TPP+/GA- et TPP+/GA+). En absence de traitement de TPP (TPP-/GA+), la détection de la protéine p60 est faible. Donc, la source des interactions non spécifiques semble provenir de la protéine p60 qui interagirait avec les traitements sur la membrane malgré la présence de la molécule de blocage (albumine bovine, BSA) des réactions non spécifiques (RNS). Plus précisément, l'interaction entre le tripolyphosphate de sodium et la protéine p60 semble être la cause majeure des réactions non spécifiques sur la membrane CCG. Grâce à l'optimisation de la membrane CCG par la méthodologie de surface de réponse et à la réduction de la concentration de TPP, l'utilisation d'une concentration de 6% de BSA a permis d'éliminer les interactions non spécifiques de la membrane puisque aucune autre bactérie que *L. monocytogenes* n'a été détectée sur le support optimisé (**Article 3**).

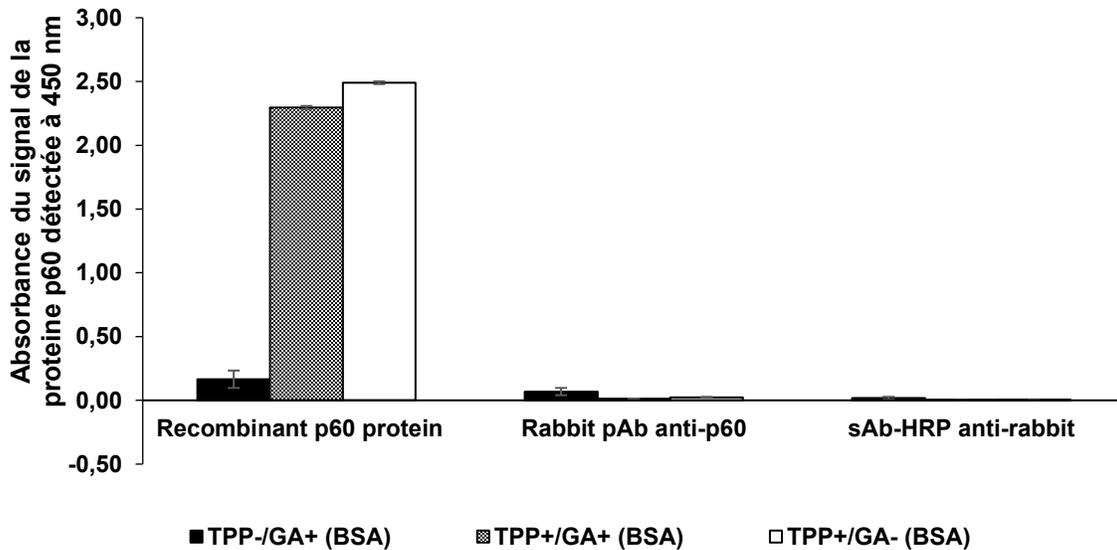


Figure 13 : Méthode d'ELISA indirecte pour la détermination des sources d'interactions non spécifiques entre la protéine p60 et la membrane CCG bloquée au préalable avec de l'albumine sérum bovin (BSA)

La dernière partie des travaux non soumis concerne l'optimisation de la réaction de détection de la protéine p60 (**objectif 1**) et le transfert de la technologie vers la forme d'un biocapteur portatif dans un kit commercialisable (**objectif 3 et 4**). Les résultats obtenus pour l'optimisation de l'ELISA en sandwich sur la membrane CCG montrent que temps d'incubation des étapes de détection de la capture et de révélation du sandwich sont important à contrôler. Les résultats montrent que plus le temps d'incubation des anticorps polyclonaux anti-p60 (anticorps de détection) et des anticorps monoclonaux secondaires couplés à la peroxydase de Raifort (anticorps de révélation) est long (30 minutes), et plus le signal de détection de la protéine p60 est élevé ($A_{450nm} \sim 0,6$) (**Figure 14**). Cette observation est plus précisément importante pour l'anticorps monoclonal secondaire de l'étape de révélation. Malgré une courte incubation de l'étape de détection (5 minutes), la détection de la protéine p60 est plus élevée ($A_{450 nm} > 0,20$) lorsque le temps d'incubation minimum de l'étape de révélation est de 15 minutes. Néanmoins, la meilleure combinaison semble être une incubation de 30 minutes pour la détection et la révélation dans les deux méthodes de lavage ($A \sim 0,6$). Les résultats montrent

également que comparativement à la méthode de lavage contrôle (trois lavages de 10 minutes et deux lavages de 5 minutes), la réduction du nombre de lavages à trois pendant 5 minutes n'affecte pas la détection de la protéine p60. La différence du signal entre les deux méthodes de lavage n'est pas significative ($p > 0.05$). Ces résultats suggèrent que le nombre et la durée des lavages dépendent du temps d'incubation des différentes étapes de détection et de révélation. Pour 30 minutes d'incubation à l'étape de détection de la capture de la protéine p60 et également à l'étape de révélation du sandwich formé, les trois lavages de 5 minutes semblent réduire des interactions non spécifiques.

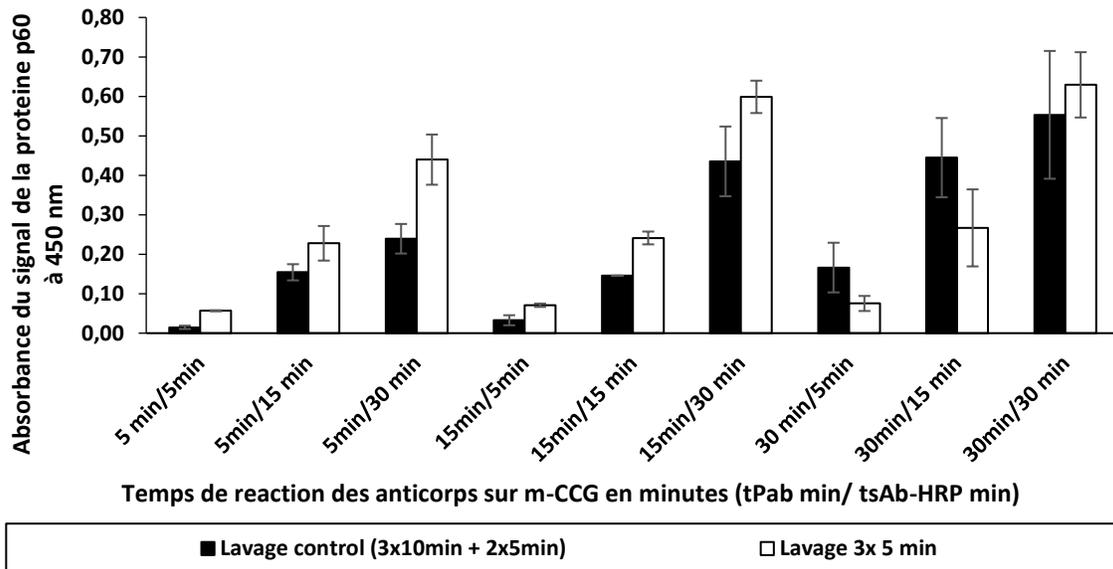


Figure 14: Optimisation de l'étape de détection de la capture de la protéine p60 par les anticorps polyclonaux anti-p60 de lapin et l'étape de révélation du sandwich par les anticorps monoclonaux secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort

Le transfert de la membrane CCG a aussi été effectué sur un support qui est insérable (ex : la spatule en bois) dans un sac d'échantillonnage servant d'environnement de croissance des bactéries *L. monocytogenes* dans les échantillons de surface (**objectif 3**). Les résultats montrent que le signal de

détection de la capture de la protéine p60 augmente plus le temps de croissance est élevé (**Tableau 6 et Figure 15**). Par exemple, pour la surface inoculée avec *L. monocytogenes*, le signal de détection de la protéine p60 passe d'une absorbance de 0.5 à 24 heures d'incubation à une absorbance de 0.83 après 30 heures d'incubation. Cela suggère que la membrane CCG immobilisée sur la spatule de bois permet de capturer en continu la protéine p60 au cours de la croissance de *L. monocytogenes*. De plus, les observations montrent que pour une concentration initiale de *L. monocytogenes* équivalente à 10^2 UFC/900cm² ou par mL (**Tableau 5**) il faut moins de 48 heures de temps de croissance (soit 30 heures, $\sim 10^{12}$ UFC/mL) pour détecter efficacement la protéine p60 ($A_{450nm} \sim 1$). Par contre, pour une concentration plus faible, comme c'est le cas de l'échantillon de surface en contact avec de la viande porc haché inoculée à 10^2 UFC/g, il faudra attendre un minimum de 48 heures, pour atteindre le même nombre de bactérie ($\sim 10^{12}$ UFC/mL) et détecter efficacement la protéine p60 (**Figure 15 et Tableau 6**). Ainsi, ces observations suggèrent que la capture de la protéine p60 sur la membrane CCG fixée sur une spatule dans le bouillon de croissance LEB modifié peut réduire le temps d'analyse de détection à moins de 48 heures à une concentration de *L. monocytogenes* de 2 log. Néanmoins, la spécificité de détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* par les anticorps monoclonaux anti-PepD semble être affectée sur le nouveau support où la membrane a été transférée (la spatule en bois). Les résultats montrent que *L. innocua* est fortement détecté sur la membrane CCG fixée sur le nouveau support (la spatule) (**Figure 15**) alors qu'aucune détection de la protéine p60 n'est observée sur la membrane fixée en microplaque (**Article 3**). Ces résultats supposent que les interactions non spécifiques entre le TPP et la protéine p60 reste une étape à optimiser lorsque le support de la membrane CCG change. Par conséquent, une optimisation de la procédure de blocage des interactions non spécifiques de *L. innocua* sur la membrane CCG doit être réalisée dans sa version d'utilisation.

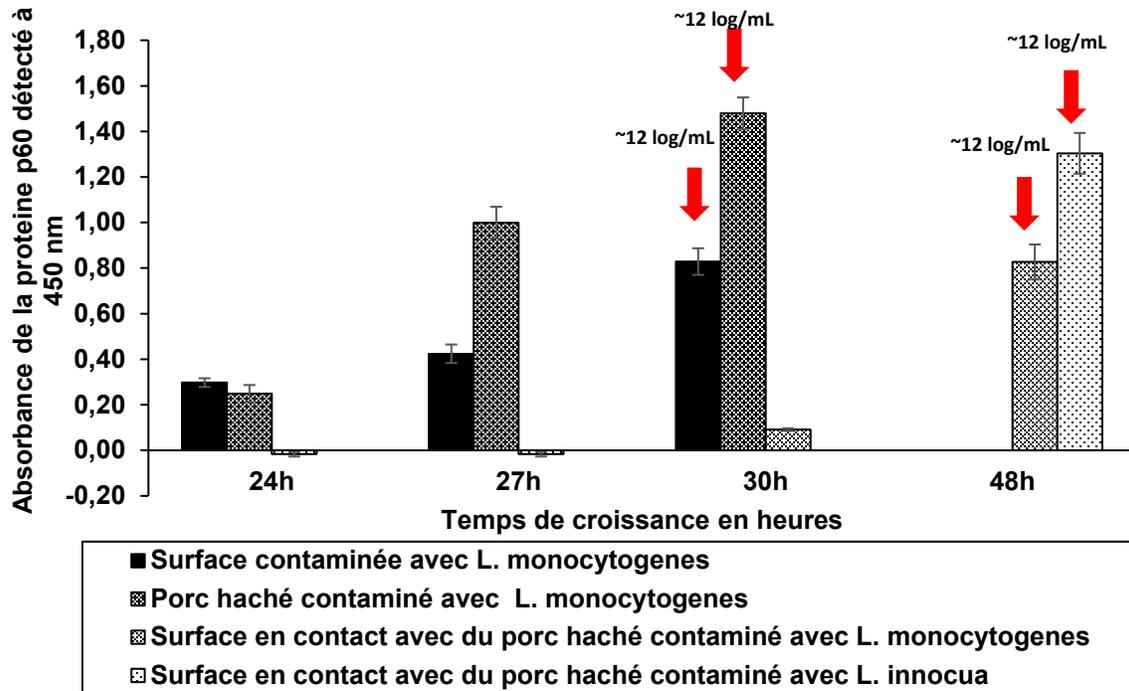


Figure 15: Utilisation de la membrane CCG fonctionnalisée pour la détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* dans différents échantillons alimentaires et selon la méthode officielle MFPHPB30.

Tableau 6: Données supplémentaires sur l'utilisation de la membrane CCG fonctionnalisée pour la détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* dans différents échantillons alimentaires et selon la méthode officielle MFPHPB30.

	Surface contaminée avec <i>L. monocytogenes</i>	Surface en contact avec du porc haché contaminé avec <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. innocua</i>	Porc haché contaminé avec <i>L. monocytogenes</i>
Nombre de log/900cm ² avant la croissance	< 3	~1	< 3
Temps de croissance	30	48	30

Nombre de log/mL en fin de croissance	11,5	12,3	11,4
Temps total de détection en heures	33-36	51	33-36

Chapitre II: Articles

Article 1

Effect of the optimize selective enrichment medium on the expression of the p60 protein using as *L. monocytogenes* antigen in specific sandwich ELISA

Marie-Christine Etty ^a, Sabato D'Auria^b, Carole Frascini^c, Stephane Salmieri^a,
Monique Lacroix^{a*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Centre. 531 boulevard des Prairies. Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

^b Institute of Food Science -CNR, Laboratory for Molecular Sensing, Via Roma, 64 111. 83100 Avellino, Italy

^c FPInnovations, 570 boulevard Saint-Jean, Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 3J9.

*Corresponding author. E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca. Tel: 450-687-5010 #4489. Fax: 450-686-5501.

Contribution des auteurs:

Marie-Christine Etty : étudiante, a réalisé les expériences et la rédaction de l'article.

Sabato d'Auria : Co-directeur de recherche, a participé à l'élaboration des protocoles de recherche et correction de l'article.

Carole Fraschini : Professeure invitée de l'INRS, a participé à la correction de l'article.

Stephane Salmieri : Assistant de recherche, a participé à la supervision des expériences et à la correction de l'article.

Monique Lacroix : Directrice de recherche, responsable scientifique et coordinatrice du projet, a participé à l'élaboration des protocoles, aux discussions sur les résultats des expériences et à la correction de l'article.

L'article a été soumis au **Journal of Immunological Methods** sous le numéro : JIM_2017_157.

Abstract

This paper presents the effects of the composition of different media (i.e., Tryptic soy broth (TSB), Brain heart infusion (BHI), Listeria enrichment broth (LEB), Fraser broth (FB) and University of Vermont medium (UVM)) on the detection of a short peptide fragment PepD specific to the p60 protein (p60) of *Listeria monocytogenes* by a monoclonal antibody (anti-PepD mAb). Expression of the p60 obtained was demonstrated to be proportional to the cellular growth of *L. monocytogenes* regardless of the tested growth medium. However, the early growth of *L. monocytogenes* and the expression of the p60 were negatively affected by the presence of selective agents present in LEB, FB and UVM. Among those three selective enrichment media commonly used for the growth of *L. monocytogenes*, LEB allowed a better expression of *L. monocytogenes* p60 after a incubation period of 18 h. Optimization of the LEB revealed that the dextrose concentration was the critical factor for improving the expression of p60 and promotes the early expression of p60. Moreover, an optimal dextrose concentration of 0.5%(w/v) in LEB, coupled with anti-PepD mAb immobilized to solid support, reduced the detection of p60 from 18h to 9h for an initial concentration of *L. monocytogenes* of 10^8 CFU/mL.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, p60 protein expression, immunoassay, antibody, selective enrichment medium, dextrose effect.

Résumé

Cet article présente les effets de la composition de différents médias (c.-à-d., le milieu trypticase soy broth (TSB), le milieu brain heart infusion (BHI), le milieu Listeria enrichment broth (LEB), le milieu Fraser broth (FB) et le milieu University of Vermont medium (UVM)) sur la détection par un anticorps monoclonal (mAb anti-PepD) d'un court fragment peptidique (PepD) spécifique à la protéine p60 de *L. monocytogenes*. Les résultats ont démontré que quel que soit le milieu de croissance testé, l'expression de la protéine p60 obtenue était proportionnelle à la croissance cellulaire de *L. monocytogenes*. Cependant, la croissance précoce de *L. monocytogenes* et l'expression de la protéine *L. monocytogenes* p60 ont été négativement affectées par la présence d'agents sélectifs présents dans les milieux LEB, FB et UVM. Parmi ces trois milieux d'enrichissement sélectif couramment utilisés pour la croissance de *L. monocytogenes*, le LEB a permis d'obtenir une meilleure expression de la protéine *L. monocytogenes* p60 après une période de 18 h d'incubation. L'optimisation du milieu LEB a révélé que la concentration de dextrose était le facteur critique pour améliorer l'expression de la protéine p60. En outre, une concentration optimale de dextrose de 0,5% dans le LEB en combinaison avec des anticorps monoclonaux anti-PepD de la protéine p60 immobilisés sur le support de croissance fournissent ensemble un environnement efficace pour la croissance de *L. monocytogenes* et la détection précoce de la protéine p60 en seulement 9 h d'incubation au lieu de 18 h pour une concentration initiale de 10^8 UFC/mL de *L. monocytogenes*.

Mots-clés: *Listeria monocytogenes*, expression de la protéine p60, dosage immunologique, anticorps, milieu d'enrichissement sélectif, effet dextrose.

1. Introduction

Nowadays, food safety is one of the main problematic of public health in the world with a mortality rate for foodborne illnesses of nearly 33 million healthy life lost per year (WHO, 2015). Foodborne diseases are toxi-infections caused by the ingestion of food contaminated with pathogenic bacteria and their factors of pathogenicity like surface proteins or toxins (Bouguelia, 2012). Recent data published by the World Health Organization (WHO, 2014, 2015) estimated that 32 illnesses were caused by foodborne pathogens, and six hundred million people in the world (1%) were infected in 2015. Among those foodborne pathogens, *Listeria monocytogenes* is one of the bacteria the most responsible for toxi-infection in the world (Geng et al., 2006; WHO, 2015). Precisely, in the case of Canada, *Listeria monocytogenes* is one of twelve pathogens associated with higher persistence at all levels of food processing, a higher number of food poisoning reminders and represents a significant hazard to the food industry, mainly for ready-to-eat (RTE) food (Public Health Agency of Canada, 2011, 2013).

Listeria monocytogenes is a dangerous pathogen for human health with a most prevalent cause of mortality rate by year (34%) associated to pathogenic bacterial in food , mainly in the case of pregnancy (including women and newborn), elderly and immunosuppressed patients (Public Health Agency of Canada, 2011, 2013). Conventional methods based on culture media and biochemical tests, and rapid methods such as molecular assays and immunoassays were developed for the detection of *Listeria monocytogenes* in food industries. These methods are known for the response specificity and sensitivity they provide (Beauchamp & Lacroix, 2012; Velusamy et al., 2010). However, although each method presents its own advantages and disadvantages, the handling procedure remains the same, 3 steps composed by a/ enrichment of the target, b/ isolation of the pathogen and c/ confirmation of the pathogen (Beauchamp & Lacroix, 2012; Law, 2015). Among those steps, enrichment is the main critical step because the improvement of quick and specific detection of foodborne pathogen such as *L. monocytogenes* in RTE foods requires an efficient and selective enrichment medium. The composition in both nutrients and selective agents are important factors that may affect the

bacterial growth (at least 24h to 48h of growth) in order to reach the detection limit or the necessary time for pathogenicity factors expression (Beauchamp & Lacroix, 2012; Karaszkiwicz, 2005). Hence, it is critical to show the effect of the media on detection target and to optimize its composition in the aim to reduce the time of analysis as much as possible.

New detection supports combining, both in the same step, a specific method of detection and an efficient culture medium would be suitable to reduce the time of analysis. This paper represents the first part of a project based on the development of a new support for enrichment and detection of *L. monocytogenes* in sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for surface sampling in food industry (Beauchamp & Lacroix, 2012; Coutu et al., 2014).

Sandwich ELISA is an immunological method that uses a primary antibody for the capture of the antigen (virulence factor) and a secondary antibody for the detection of the captured antigen (Coutu et al., 2014). This method is the most immunological widely used due to the possibility of coupling the enrichment step and the capture of antigen by antibodies in a single step and on the same support. The p60 protein as a *L. monocytogenes* antigen is a hydrolase located at the surface of *Listeria* species cell wall and largely secreted in the medium of culture (Ruhland et al., 1993; Yu et al., 2004). It is also used for the remodeling of peptidoglycan during the cellular division of all *Listeria* species cells (Beauchamp et al., 2012; Beauchamp & Lacroix, 2012; Bierne & Cossart, 2007; Ruhland et al., 1993) . However, *L. monocytogenes* p60 protein is a specific antigen for the detection of *L. monocytogenes* due to the presence of a short hydrophilic peptide called PepD, a region of 11 amino acids (QQQTAPKAPTE) unique to *L. monocytogenes* p60 protein, which detection is allowed in all serotypes of *L. monocytogenes* (Beauchamp et al., 2012; Bubert et al., 1994; Coutu et al., 2014; Yu et al., 2004). Bubert et al. (1992), Machata et al. (2005), Faith et al. (2007) and Wuenscher et al. (1993) also reported that the *L. monocytogenes* p60 protein is unique because only coded by the invasion associated protein (*iap*) gene that is essential for *L. monocytogenes* cells and implied in the mammals infection by this species. All of these characteristics make of *L. monocytogenes* p60 protein a

suitable antigen for the specific detection of *L. monocytogenes* by an anti-protein p60 monoclonal antibody produced (anti-PepD mAb) (Bubert et al., 1994; Coutu et al., 2014; Yu et al., 2004). However, for optimization of this cell surface protein as an antigen in ELISA methods, the effect of growth environment (e.g. culture broths) on *L. monocytogenes* p60 protein expression need to be evaluated also (Karaszkiwicz, 2005; Ruhland et al., 1993). Karaszkiwicz (2005) and Ruhland et al. (1993) have reported that the culture medium can affect the cell surface composition or the sensitivity and specificity of antigen to be detected. Thus, the evaluation of culture media effect on the expression of *L. monocytogenes* p60 protein and on the specific interaction between anti-PepD mAb and this antigen is necessary to optimize and produce the best medium to be used with a new support of detection in commercial kits.

The first part of this study was to evaluate the effect of different selective enrichment media on the p60 protein expression using as *L. monocytogenes* antigen in sandwich ELISA (Coutu et al., 2014). The second part of this study was to optimize a suitable culture medium promoting the early expression of the p60 protein for the rapid detection of *L. monocytogenes*. The evaluation was performed by growth kinetics monitoring, microscopy observation after Gram coloration, sandwich ELISA and 2-level factorial design.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

A total of 6 strains of *L. monocytogenes* were used: HPB 2812, HPB 1043, HPB 2569 (serotypes 1/2a), HPB 2558, HPB 2739 and HPB 2371 (serotypes 1/2b). For cross-reactivity monitoring, one strain of *Listeria innocua* LSPQ 3285 (non-pathogenic *Listeria* species) was used. All strains were obtained from Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). Sub-cultures of these strains were done in Tryptic Soy Broth (TSB, Alpha BioSciences Inc., Baltimore, MD, USA) for 24 h at 37°C. All experiments were carried out principally with *L. monocytogenes* HPB 2812 and validated with the 5 others strains of *L. monocytogenes*.

Fourteen other bacteria strains were also tested only for cross-reactivity in the best selective enrichment medium on the detection of p60 protein in sandwich ELISA. Among them: *L. innocua* ATCC 57142, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Pseudomonas putida* V376, *P. fluorescens* CDRA V317, *B. cereus*, *Salmonella Hadar*, *Salmonella* SL1344, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27583.

2.2. Broths

The growth kinetics of *Listeria monocytogenes* cells was evaluated in the 3 best selective media allowing an increase from 87% to 91% of *L. monocytogenes* growth (Beauchamp & Lacroix, 2012; Churchill et al., 2006). Among them, there are *Listeria* enrichment broth (LEB, Alpha Biosciences Inc.), Fraser broth (FB, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and University of Vermont medium (UVM, Sigma-Aldrich). Selective agents such as acriflavin (inhibitor agent of Gram positive), nalidixic acid (inhibitor agent of Gram negative) and cycloheximide (fungicide agent) were added in LEB, FB and UVM. The effects of the selective enrichment media on the *L. monocytogenes* growth and *L. monocytogenes* p60 protein were compared to a commonly used enrichment medium Brain heart infusion (BHI, Alpha Biosciences Inc.) and the conventional broth Tryptic soy broth (TSB, Alpha Biosciences Inc.). BHI is an enrichment medium with no selective agent used by Geng et al. (2006) for the comparison of media effects. TSB was used as a standard broth, relative to a previous study from Coutu et al. (2014).

2.3. Adjustment of the cell density and growth conditions

The adjustment of *L. monocytogenes* HPB 2812 at the same cell density ($A_{595nm} = 0.37$) was performed to evaluate the effect of 5 media (TSB, BHI, LEB, FB and UVM) on 1% of initial inoculum of *L. monocytogenes* growth at 37°C (Geng et al., 2006). Then, 1 mL of freshly adjusted culture of these 5 broths were inoculated in 9 mL of them (10% of initial inoculum) and incubated for 18 h at 37°C. These cultures were centrifuged at 2600 g and 4°C for 15 min followed by filtration using a 0.2 µm syringe filter (Sarstedt, Montreal, QC, Canada) in order to separate cell-

free supernatants and bacterial cells (Coutu et al., 2014). After collecting cell-free supernatant, bacterial cells were resuspended in 10 mL of 0.1% peptone water (w/v) (Multipeptone powder, Alpha BioSciences Inc.). Resuspended bacterial cells were then diluted 10-fold in 0.1% peptone water (w/v) prior to be spread (200 μ L) onto Palcam agar (Alpha BioSciences Inc.) plates, in triplicate (n = 3). Inoculated Palcam agar plates were incubated at 37°C for 48 h. Colonies were counted to determine the number of viable bacteria (CFU/mL) in the culture at $A_{595nm} = 0.37$ (Geng et al., 2006). Cell-free supernatants of adjusted cultures were used to evaluate the effect of the media on the detection of *L. monocytogenes* p60 protein. Different times of incubation for *L. monocytogenes* growth (10% of initial inoculum) were also used for the evaluation of the detection of the p60 protein expressed in the best selective enrichment media as a function of time. Each growth curve was monitored at 60-min intervals using a CARY 1 Varian spectrophotometer (Varian Canada Inc., Mississauga, ON, Canada).

2.4. Gram staining and morphological features

Gram staining was done according to Geng et al. (2006) to compare the effects of media on the cell morphology of *L. monocytogenes* with adjustment of the cell density ($A_{595nm} = 0.37$) and after 18 h of incubation using an optical microscope Axioscope A1 (Zeiss, Göttingen, Germany) in phase contrast, with immersion oil using a 100x objective, connected to a digital camera. Experiments were done for the evaluation of the selected 5 media and subsequently for the optimized medium.

2.5. Production of antibodies and p60 protein

According to Beauchamp et al. (2012) and Coutu et al. (2014), mouse monoclonal antibodies against pepD of *L. monocytogenes* p60 protein (anti-PepD mAb) was used as a capture antibody in sandwich ELISA, were purchased from Genscript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA) and AdipoGen international Inc. (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). This antibody defines the specificity of this sandwich ELISA due to its ability to recognize a short peptide D (PepD) composed of 11 amino acids (QQQTAPKAPTE) and unique to *L. monocytogenes* p60 protein. Rabbit antibodies anti-*Listeria* species p60 polyclonal (anti-p60 pAb) used as an

antibody of detection sandwich ELISA, were purchased from GenScript Inc. (GenScript USA Inc.). This antibody defines the sensitivity of the sandwich ELISA due to its capacity to interact with more regions at the surface of the same p60 protein of all *Listeria* species in interaction with it. Recombinant p60 protein of *L. monocytogenes* (p60) used as a positive control (GenScript USA Inc.) was produced from the conserved region (pepD, **protein database accession no. AEO02672**) present in *L. monocytogenes* (Beauchamp et al., 2012; Coutu et al., 2014).

2.6. Detection of the p60 protein expressed in Sandwich ELISA

Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was done with mouse anti-PepD monoclonal antibodies (anti-PepD mAb) and anti-*Listeria* species p60 polyclonal antibodies (anti-p60 pAb) in order to correlate the effect of media on the bacterial growth and the specific detection of the p60 protein of *L. monocytogenes*, according to a modified procedure from Coutu et al. (2014) (18 h of incubation was used instead of 1 h).

A 96-well polystyrene microplate (Corning, ON, Canada) was used for sandwich ELISA experiments. In the first step, a volume of 100 µL of mouse anti-PepD monoclonal antibodies (8 µg/mL) was added into each well and incubated overnight at 4°C. Then, the wells were washed 3 times with 200 µL of washing buffered for 10 min each. The non-specific binding sites were blocked using 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in phosphate buffer saline (PBS) for 1 h at 20 to 22°C. After washing, 100 µL of each sample (e.g., the p60 protein of *L. monocytogenes* in the 5 media) were added to the wells and incubated for 1 h at 37°C. Washing steps were again performed before adding of rabbit anti-*Listeria* species p60 polyclonal antibodies (2.5 µg/mL in diluting buffer, PBS + 0.05% Tween 20 containing 0.25% BSA) and the mixture was incubated at 37°C for 1 h. Thereafter, secondary anti-rabbit monoclonal antibodies coupled with HRP (Cedarlane) diluted in diluting buffer (1/17000) were added for an additional 1h of incubation at 37°C. Finally, wells were washed three-times and the revelation step was done with 100µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (detection substrate, TMB, Fisher Scientific, ON, Canada) and 50µL of 2M H₂SO₄ (to stop the enzymatic

reaction). Discoloration was read at 450 nm with a SpectraMax M5 microplate reader (VWR, CA, USA).

The evaluation of the five media in sandwich ELISA experiments was firstly performed with cell-free supernatant of *L. monocytogenes*. Then, for the optimization of the best medium for selective enrichment, *L. monocytogenes* culture were used to allow expression of p60 protein as an antigen during the bacterial growth. A volume of 30 μ L of *L. monocytogenes* culture was inoculated in 270 μ L of the best selective enrichment medium added to a 96-well microplate with mouse anti-PepD monoclonal antibodies and immobilized blocking molecule (BSA). The final concentration for 10% of the initial inoculum (30 μ l of 10⁹ CFU/mL of *L. monocytogenes* in 270 μ l of the medium) represents the initial concentration of *L. monocytogenes* of 10⁸ CFU/mL in the medium.

The formula used for the calculation of the increasing rate of p60 protein during the bacterial growth is shown below:

$$\text{Improvement rate difference (\%)} = \frac{(\text{Abs in modified LEB} - \text{Abs in LEB})}{(\text{Abs in modified LEB} + \text{Abs in LEB})} \times 100$$

2.7. Experimental design and statistical analyses

Optimization of nutrient effects contained in the best selective enrichment on the expression and the detection of the p60 protein for *L. monocytogenes* was evaluated by experimental design with Design-Expert software V7.0 (Stat-ease Inc., MN, USA). A 2-level (2^k) factorial design, commonly applied in the first step of response surface methodology (RSM) was used to identify the key factors of the targeted response (Dwevedi & Kayastha, 2009; Joyce & Leung, 2013). **Table 1** show the concentrations of 5 nutrients in LEB (factors) tested at various levels in the 2-level (2⁵) factorial design. Minimal (-1) concentrations of nutrients presented were the real unmodified concentration of LEB (e.g., real concentration of dextrose in LEB = 0.25%).

Each analysis was performed in triplicate (n = 3). For each test, analyses of variance (ANOVA) for multiple factors or for 2-independent samples Student *t*-test were applied using SPSS software V16.0 and with 95% significant level.

3. Results and discussion

3.1. Effect of the 5 media on *L. monocytogenes* growth

3.1.1. Adjustment of *L. monocytogenes* cell density

The maximum asymptotic value of growth (A_{18h}), the maximum specific growth rate of log phase (μ_m) and the lag time (λ) as the parameters evaluated during the kinetics of *L. monocytogenes* growth in the selected 5 media (TSB, BHI, LEB, FB and UVM) is presented **Table 2**. Results showed that the growth of *L. monocytogenes* was higher in media with no selective agents (TSB and BHI) than in media containing selective agents (LEB, FB and UVM). The lag phase (λ) in TSB ($\lambda_{TSB1\%} = 5.8$ h) and BHI ($\lambda_{BHI1\%} = 5.2$ h) was shorter than that in LEB ($\lambda_{LEB1\%} = 8.6$ h), FB ($\lambda_{FB1\%} = 10.8$ h) and UVM ($\lambda_{UVM1\%} = 12.2$ h). Moreover, the growth rate (μ_m) during the lag phase was almost 2 times faster in media with no selective agents ($\mu_{m\ TSB} = 0.172$ h⁻¹; $\mu_{m\ BHI} = 0.192$ h⁻¹) than in any other tested selective media ($\mu_{m\ LEB} = 0.116$ h⁻¹; $\mu_{m\ FB} = 0.093$ h⁻¹ and $\mu_{m\ UVM} = 0.082$ h⁻¹). Therefore, all of these results suggest that the exponential phase of bacterial growth was delayed by the presence of selective agents which extended the lag phase of the bacteria. Geng et al. (2006) and Supanivatin et al. (2012) demonstrated that the extent of the lag phase was due to lethality, damage or stress induced by selective agents such as acriflavin or, nalidixic acid on *L. monocytogenes* cell, which reduced the cells number in lag phase. However, the asymptomatic value of growth (A_{18h}) after 18 h showed a different result for LEB. Indeed, the effects of selective agents in LEB during the lag phase did not impede *L. monocytogenes* growth to reach the same cell density as in TSB and BHI ($A_{18h} > 1.0$ and log CFU/mL = 12 log) compared to other selective media, FB and UVM ($A_{FB\ and\ UVM} < 1.0$ and log CFU/mL_{FB} ~ 9 log, log CFU/mL_{UVM} ~ 8 log). Thus, results suggested that LEB was a better selective enrichment medium than FB and UVM in terms of growth efficiency. LEB was also suitable to reduce the effects of the selective agents on the lag phase for *L. monocytogenes*; since the lag phase for *L. monocytogenes* was longer in FB ($\lambda_{FB} = 2.2$ times) and UVM ($\lambda_{UVM} = 3.6$ times). The reason for this improvement could be related to the presence of dextrose (D-

glucose). Dextrose is the carbon source in LEB, TSB and BHI, which seemed to promote the early growth of *Listeria* species by inducing a repair mechanism of cell membrane (Besse, 2002; Supanivatin et al., 2012). The presence of a fast and easily absorbable carbon source such as dextrose in LEB might help to increase the number of healthy cells during the lag phase compared to other more complex absorbable carbon sources like esculin in FB and UVM media (Lee et al., 2013; Supanivatin et al., 2012). Esculin is a carbohydrate that can be used as a carbon source in some media and was demonstrated to have a negative effect on the repair mechanism of the cells (Besse, 2002). Therefore, this phenomenon could explain the reduced effect of selective agents on the lag phase of *L. monocytogenes* in LEB.

3.1.2. Morphological features

Fig. 1.I presents the cellular morphology of *L. monocytogenes* in enrichment media with no selective agent (BHI) and with selective agents (LEB, FB and UVM) at an adjustment of the cell density ($A_{595nm} = 0.37$) (**Fig. 1-IA**) and after 18 h of incubation at 37°C (**Fig. 1-IB**). Cellular morphology in TSB was not shown because the morphology was identical to BHI. At the adjusted the cell density, *L. monocytogenes* cells were more elongated in the selective media (LEB, FB, UVM) than in the non-selective ones (BHI and TSB). The same observation was reported by Geng et al. (2006). Thus, all these observations suggest that the modification of the cell morphology during the lag phase of *L. monocytogenes* was due to the selective agents in the selective broths (LEB, FB and UVM). As opposed, after 18 h of incubation, only the cellular morphology in LEB became more similar to that in BHI (cocci) while the cells in FB and UVM remained under elongated form. This morphological change observed only in LEB proved that dextrose played an important role on the repair mechanism of cell membrane and seemed to promote a higher bacterial growth despite the effect of selective agents. Thus, the microscopic observations in association with the growth parameters allowed concluding that LEB seemed to be the best enrichment medium for the efficiency

and selective growth of *L. monocytogenes*, due to the presence of a simple sugar source such as dextrose and an appropriate concentration of the selective agent. **Fig. 1** presents the cellular morphology of *L. monocytogenes* in enrichment media with no selective agent (BHI) and with selective agents (LEB, FB and UVM) at an adjustment of the cell density ($A_{595nm} = 0.37$) (**Fig. 1A**) and after 18 h of incubation at 37°C (**Fig. 1B**). Cellular morphology in TSB was not shown because the morphology was identical to BHI. At the adjusted cell density, *L. monocytogenes* cells were more elongated in the selective media (LEB, FB, UVM) than in the non-selective ones (BHI and TSB). The same observation was reported by Geng et al. (2006). Thus, all these observations suggest that the modification of the cell morphology during the lag phase of *L. monocytogenes* was due to the selective agents in the selective broths (LEB, FB and UVM). As opposed, after 18 h of incubation, only the cellular morphology in LEB became more similar to that in BHI (coccobacilli) while the cells in FB and UVM remained under elongated form. This morphological change observed only in LEB proved that dextrose played an important role on the repair mechanism of cell membrane and seemed to promote a higher bacterial growth despite the effect of selective agents. Thus, the microscopic observations in association with the growth parameters allowed concluding that LEB seemed to be the best enrichment medium for the efficiency and selective growth of *L. monocytogenes*, due to the presence of a simple sugar source such as dextrose and an appropriate concentration of the selective agent.

3.1.3. Effect of 5 media on the detection in sandwich ELISA of *L. monocytogenes* p60 protein

Fig. 2 illustrates the detection of the p60 protein for *L. monocytogenes* strains in sandwich ELISA. Results revealed that the sample containing the p60 protein of *L. innocua* LSPQ 3285 (non-pathogenic species) did not generate any cross-reaction in any of the tested media ($A_{450nm} \sim 0$) with the specific capture antibodies because only *L. monocytogenes* p60 protein was detected ($A_{450nm} \geq 0.1$). Moreover, only the media with no selective agent such as TSB ($A_{HPB2812} = 1.44$; $A_{\text{other strains}} = 1.32$) compared to the selective media ($A_{450nm} < 1$) exhibited detection

levels similar to the positive control ($A_{\text{recombinant p60 protein}} = 1.04 \geq 1$). However, the detection of p60 protein in the selective media was significantly ($p \leq 0.05$) higher when *L. monocytogenes* was cultivated in LEB. Results showed an absorbance from 0.59 to 0.52 for *L. monocytogenes* strains (HPB2812 and the mix of the other strains) in LEB compared to FB ($A_{\text{HPB2812}} = 0.10$; $A_{5 \text{ other strains}} = 0.10$) and UVM ($A_{\text{HPB2812}} = 0.14$; $A_{5 \text{ other strains}} = 0.12$). All these data supposed that, although the selective agents might have a direct effect on the production of p60 protein, an optimization of LEB composition should be carried out to improve the detection of p60 protein at a level equivalent to the positive control (Besse, 2002; Lee et al., 2013; Supanivatin et al., 2012).

3.2. Optimization of the best selective enrichment medium for the detection of *L. monocytogenes* p60 protein

3.2.1. Optimization of *Listeria* enrichment broth composition by 2-level factorial design

LEB is a selective enrichment medium containing selective agents such as acriflavin, nalidixic acid and cycloheximide and 6 nutrients. These nutrients are dextrose (0.25%) which represents the carbon source to promote the repair mechanism of cell membrane, yeast extract (0.6%) and tryptone (1.7%) which are an energy source of vitamins and minerals, peptone (0.3%) as a nitrogen source required to produce protein, dibasic potassium phosphate as a buffering agent (Alpha BioSciences Inc.), and sodium chloride (0.5%) which can prevent the recovery of stressed cells (Besse, 2002; Lee et al., 2013). Besse (2002) and Lee et al. (2013) reported that an optimal concentration of sodium chloride (0.5%) was necessary to avoid the damage of the cytoplasmic membrane. LEB contains this optimal concentration. Thus, in the optimization, the salt concentration in LEB was left modified and only 5 on the 6 nutrients contained in LEB were used (**Table 1**) in a 2^5 factorial design.

The statistical analysis (**Table 3**) of the 2^5 factorial design results in (**Table 1**) showed that the screening of the effect of the 5 nutrients on *L. monocytogenes* growth and on the detection of p60 protein was at 99.6% and 99.1% of confidence levels respectively. Result also revealed that the key factor which influenced the

growth and the expression of *L. monocytogenes* p60 protein (targeted responses) was the sugar content (Dextrose, p-value ≤ 0.05) with 99.8% and 99.96% of confidence levels respectively. These results suggest that the modification of the LEB medium has a critical effect on the growth and the expression of p60 protein, principally in the case of dextrose concentration compared to the other nutrients tested (Jose et al., 2014). Also, according to the statistical analysis (**Table 3**), data demonstrated that dibasic potassium phosphate (p-value ≤ 0.05) had an effect on the cell density but did not have any effect on the p60 expression. Therefore, concerning the improvement of p60 protein expression for the detection of *L. monocytogenes*, only dextrose seemed to be the optimal factor. Besse (2002) and Lee et al. (2013) explained that dextrose is the nutrient that can be used to induce a re-concentration of the amino acid needed for the production of cell surface protein such as p60 protein. Thus, this role implied in repair mechanism of cell wall could be the key to the effect induced by dextrose alone or in interaction with other nutrients on *L. monocytogenes* growth and on the expression of the p60 protein (Besse, 2002; Lee et al., 2013).

3.2.2. Effect of dextrose concentration on the detection of the p60 protein and the validation tests

Fig. 3 illustrates the effect of modified LEB with different concentrations of dextrose (1 to 0.25%) on *L. monocytogenes* growth and detection of p60 protein. Results showed that increasing dextrose concentration in LEB could affect *L. monocytogenes* growth. Absorbance obtained for LEB was not modified with low concentration of dextrose ($A_{0.25\% \text{ of dextrose}} = 0.9$) and was significantly higher (p ≤ 0.05) with a high concentration of dextrose ($A_{1\% \text{ of dextrose}} = 0.74$); probably due to the fact that a high concentration of dextrose (up to 0.5%) did not have any efficient effect on the repair mechanism of cell wall in a selective media as reported previously (Besse, 2002). For the detected p60 protein, the increase of dextrose concentration induced a contrary effect on the expression of the protein. Absorbance was significantly higher in the medium (p-value ≤ 0.05) with a high concentration of dextrose ($A_{LEB1\%} = 1.51$ comparatively to $A_{LEB0.25\%} = 0.13$). However, no significant increase was observed between 1% and 0.5% of dextrose

in modified LEB ($p > 0.05$). The increase of p60 protein expression was significant between 0.5 and 0.25% of dextrose in LEB ($p\text{-value} \leq 0.05$). Moreover, the detection level with 0.5% of dextrose in LEB ($A_{\text{LEB}0.5\%} = 1.28$) was similar to that of the positive control (Recombinant p60 protein; $A_{\text{p60}} = 1.14$). Therefore, although the expression of p60 protein seemed to be higher with an increase of dextrose concentration in LEB, a concentration of dextrose up to 0.5% is not necessary to optimize LEB. Besse (2002) also reported this concentration in relation with the enhancement of the repair mechanism of *L. monocytogenes* cell wall.

Two validation tests were also done in order to determine the effect of LEB optimized on the cell morphology and the cross-reactivity of detection. Firstly, morphological comparison between *L. monocytogenes* cells in LEB and modified LEB (**Fig. 1-II**) revealed that a concentration of 0.5% of dextrose in LEB did not affect the morphological features observed by microscopy. Elongated form of *L. monocytogenes* cells in LEB and modified LEB were observed at the adjustment of the cell density (**Fig. 1-IIA**) and in coccobacilli form after a period of 18 h of incubation (**Fig. 1-IIB**). These observations supposed that the repair mechanism of *L. monocytogenes* cell wall was not affected by this change in the dextrose concentration in LEB (0.5%). The second test on the cross-reactivity in modified LEB (**Fig. 4**) showed that this medium did not interfere on the detection of the p60 protein of *L. monocytogenes* strains ($A_{\text{HPB2812}} = 0.96$; $A_{5 \text{ other strains}} = 0.76$). The p60 protein of non-pathogenic species of *Listeria* such as *Listeria innocua* strains (LSPQ 3285 and ATCC 57142) was also detected ($A_{450\text{nm}} \sim 0.2$) but with a lower signal intensity. The 14 other tested bacteria presented a lower signal intensity ($A_{450\text{nm}} \sim 0.1$). These data suggested that modified LEB did not have any impact on the specificity of the interactions between the mouse anti-PepD monoclonal antibodies and *L. monocytogenes* p60 protein since the absorbance obtained for *L. monocytogenes* strains was 4 times (comparatively to *L. innocua* strains) to 9 times (comparatively to the 14 other bacteria) higher. The absorbance level of *L. monocytogenes* p60 protein was also close to the absorbance of the positive control ($A_{450 \text{ nm}} = 1.09$). Thus, LEB with 0.5% of dextrose seemed to allow an

efficient selective growth of *L. monocytogenes* and did not affect the specific detection of *L. monocytogenes* p60 protein by anti-PepD mAb.

3.2.3. Effect of dextrose concentration on the detection of the p60 protein at different times of incubation

Fig. 5 presents the growth of *L. monocytogenes* and the detection of the p60 protein for various incubation times in LEB and modified LEB media. Results demonstrate that over time, the expression of the detected p60 protein was increasing with *L. monocytogenes* cell density in both tested media. The minimal detection level of the p60 protein ($A = 0.1$) was observed after 5 h of incubation ($A_{5h} \sim 0.4$) in LEB and modified LEB with 0.5% of dextrose. This absorbance of the detection signal remained constant ($A = 0.1$) during the 6 first hours of incubation for both media tested ($p_{6hs} = 0.212 > 0.05$). Nevertheless, after 7 h of incubation, the expression of p60 protein in LEB with 0.5% of dextrose started to increase (e.g., $A_{7h} = 0.3$; $A_{8h} = 0.7$; $A_{9h} = 2.0$) compared to the expression of p60 protein in LEB control ($A_{7h} = 0.2$; $A_{8h} = 0.3$; $A_{9h} = 0.7$). This increase of the absorbance between 7 h to 18 h of incubation in modified LEB compared to LEB was equivalent to an improvement of p60 protein detection from 13% to 60%. This improvement of detection of the p60 protein after 7h of incubation shows that the modified LEB can promote an efficient expression of the p60 protein after the 5 first hours previous the beginning of the exponential phase ($A = 0.37$). Moreover, this improvement of the expression of p60 protein after only 5 h of incubation (from 4 h to 9 h incubation) in LEB with 0.5% of dextrose was similar to the effect 0.5% of dextrose in TSB on *L. monocytogenes* growth as previously reported by Besse (2002). Thus, observations seemed to support the hypothesis on the role played by dextrose in the re-concentration of amino acids and the repair mechanism of *L. monocytogenes* cell wall (Besse, 2002; Lee et al., 2013). This role is the key to the early expression of p60 protein of *L. monocytogenes* in modified LEB after only 9 h of incubation ($A_{9h} = 2.0$) instead of 18 h of incubation in non-modified LEB ($A_{18h} = 2.0$) for an initial cells concentration of 10^8 CFU/mL.

4. Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that selective agents affected the early growth of *L. monocytogenes* by inducing cell damage and stress during the lag phase. Selective agents also affected the early expression of p60 protein which is implied in the cell division of *L. monocytogenes*. However, Listeria enrichment broth (LEB) as selective enrichment medium was assessed as a suitable medium to be optimized for the detection of *L. monocytogenes*. LEB contains an easily absorbable carbon source (dextrose) which promoted the repair mechanisms of *L. monocytogenes* cells and to produce the p60 protein by the re-concentration of amino acids at the cell surface. An optimization using a 2-level factorial design confirmed the role of dextrose in the expression of p60 protein. LEB containing 0.5% dextrose was used as a selective enrichment medium in the same step as anti-PepD monoclonal antibodies (anti-PepD mAb) for an efficient capture of the p60 protein. The combination of modified LEB and anti-PepD mAb allowed detection of the p60 protein after only 9 h instead of 18 h of incubation for a initial concentration of *L. monocytogenes* of 10^8 CFU/mL. The enrichment step of surface sampling with modified LEB in presence of a support containing immobilized anti-PepD mAb could be an innovative solution for the detection of *L. monocytogenes* p60 protein and to reduce the time of analysis.

Acknowledgements

The project of this research was done in collaboration with CNR Comessa “Development of biochips for food safety and health” (SD) in Italy. Moreover, this research was supported by the Ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations du Québec (MEIE) International Program [Grant PSR-SIIRI-933] and S.M. Group International Inc. through the Armand-Frappier Foundation at INRS University. Authors are also grateful to the contribution of FPIInnovations (Pointe-Claire, Quebec, Canada).

References

- Beauchamp, S., D'Auria, S., Pennacchio, A., & Lacroix, M. 2012. A new competitive fluorescence immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes*. *Anal. Methods*, 4(12), 4187-4192.
- Beauchamp, S., & Lacroix, M. 2012. Évaluation de la résistance du génome bactérien sur l'irradiation et évaluation préliminaire d'un essai compétitif immuno-fluorescent pour la détection de *Listeria monocytogenes* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Besse, N. G. 2002. Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: a review. *Food Microbiol.*, 19(2), 221-234.
- Bierne, H., & Cossart, P. 2007. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(2), 377-397.
- Bouguelia, S. 2012. Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux (Doctoral dissertation, Grenoble).
- Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., & Kohler, S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.*, 174(24), 8166-8171.
- Bubert, A., Schubert, P., Köhler, S., Frank, R., & Goebel, W. 1994. Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(9), 3120-3127.
- Churchill, R. L., Lee, H., & Hall, J. C. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J. Microbiol. Methods*, 64(2), 141-170.
- Coutu, J. V., Morissette, C., D'Auria, S., & Lacroix, M. 2014. Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Microbiology Res. Int.*, 2(46-52).

- Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. 2009. Optimal immobilization of b-galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresour. Technol.*, 100, 2667-2675.
- Faith, N. G., Kathariou, S., Neudeck, B. L., Luchansky, J. B., & Czuprynski, C. J. (2007). A P60 mutant of *Listeria monocytogenes* is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice. *Microb. Pathog.*, 42, 237-241.
- Geng, T., Hahm, B.-k., & Bhunia, A. K. 2006. Selective Enrichment Media Affect the Antibody-Based Detection of Stress-Exposed *Listeria monocytogenes* due to Differential Expression of Antibody-Reactive Antigens Identified by Protein Sequencing. *J. Food Prot.*, 69(8), 1879-1886.
- Jose, P. A., Silvakala, K. K., & Jebakumar, S. R. D. 2014. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *streptomyces sp.* JAJ06. *Int J Microbiol.*
- Joyce , A. P., & Leung, S. S. 2013. Use of response surface methods and path of steepest ascent to optimize ligand-binding assay sensitivity. *J. Immunol. Methods*, 392, 12-23.
- Karaszkiwicz, J. W. 2005. Critical factors in immunoassay optimization. *Gaithersburg, MD: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.*
<https://www.seracare.com/globalassets/resources/technical-guides/guide-critical-factors-in-immunoassay-optimization.pdf>
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, 5, 770.

- Lee, H. Y., Chai, L. C., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. 2013. Review on protocol development for detection and identification of *Listeria monocytogenes* in foods. *J Pure Appl Microbiol*, 7(4), 2523-2530.
- Machata, S., Hain, T., Rohde, M., & Chakraborty, T. 2005. Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 187(24), 8385-8394.
- Public Health Agency of Canada. 2011. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods.
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.php.
- Public Health Agency of Canada. 2013. Environmental and finished dairy product sampling monitoring for *Listeria monocytogenes* *Guidance Document Repository*
<http://www.inspection.gc.ca/food/dairy-products/manuals-inspection-procedures/product-inspection/monitoring-for-listeria-monocytogenes/eng/1335465632611/1335466303763?chap=6>.
- Ruhland, G. J., Hellwig, M., Wanner, G., & Fiedler, F. 1993. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60—detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. *Microbiology*, 139(3), 609-616.
- Supanivatin, P., Kosonpisit, S., Liamkaew, R., Saeteaw, N., & Thipayarat, A. 2012. Inhibitory effects of *Listeria* selective enrichment media on growth characteristics of *L. ivanovii*. *Procedia Eng.*, 32, 112-118.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.*, 28(2), 232-254.
- WHO. 2014. WHO estimates of the global burden of diseases. *WHO*, 46(3), 1-15.
doi:10.1016/j.fm.2014.07.009

WHO. 2015. Food safety. *Fact sheet N°399*.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>

Wuenschel, M. D., Köhler, S., Bubert, A., Gerike, U., & Goebel, W. 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.*, 175(11), 3491-3501.

Yu, K.-Y., Noh, Y., Chung, M., Park, H.-J., Lee, N., Youn, M., Youn, B.-S. 2004. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11(3), 446-451.

Figure captions

Figure 1: Microscopic morphologies of *L. monocytogenes* cells in the four media, after Gram staining (objective 100X).

I: Effect of 4 media on *L. monocytogenes* cells (BHI, LEB, FB and UVM); A-Cell morphology after the adjustment of density at $A_{595nm} = 0.37$; B-Cell morphology after 18 h of incubation at 37°C; (Data not shown for the morphology in TSB due to similarities with BHI). **II:** Effect of dextrose concentration optimized in Listeria enrichment broth on *L. monocytogenes* cells; A-Cell morphology after the adjustment of density at $A_{595nm} = 0.37$; B-Cell morphology after 18 h of incubation at 37°C; 1-*L. monocytogenes* in LEB; 2-*L. monocytogenes* in modified LEB with 0.5% of dextrose.

Figure 2: Sandwich ELISA for the highly specific detection of *L. monocytogenes* strains containing p60 protein in cell-free supernatant of 5 media and after 18 h of incubation. ■: *L. monocytogenes*; ▣: *L. monocytogenes* mix of 5 other strains (HPB 1043, HPB 2569, HPB 2558, HPB 2739 and HPB 2371); □: *L. innocua* LSPQ 3285; ▤ : positive control.

Figure 3: Effect of the dextrose added in LEB on the growth of *L. monocytogenes* HPB 2812 and on the detection of the p60 protein in Sandwich ELISA after 18 h of incubation. --○--: *L. monocytogenes* HPB2812 cell density; ■: *L. monocytogenes* p60 protein detected; □: positive control.

Figure 4: Evaluation of modified LEB on the detection specificity of *L. monocytogenes* p60 protein by cross-reactivity between monoclonal antibodies anti-PepD and 15 other pathogens in sandwich ELISA. ■: Tested bacteria; □: positive control (Recombinant p60 protein).

Figure 5: Effect of incubation time in sandwich ELISA on the detection of *L. monocytogenes* HPB 2812 p60 protein in LEB and modified LEB (0.5% of

dextrose). ■: *L. monocytogenes* p60 protein in LEB; □: *L. monocytogenes* p60 protein modified LEB (0.5% of dextrose); —○—: *L. monocytogenes* growth in LEB; —□—: *L. monocytogenes* growth in modified LEB (0.5% of dextrose); ↑ : Improvement rate difference of *L. monocytogenes* p60 protein detected in modified LEB.

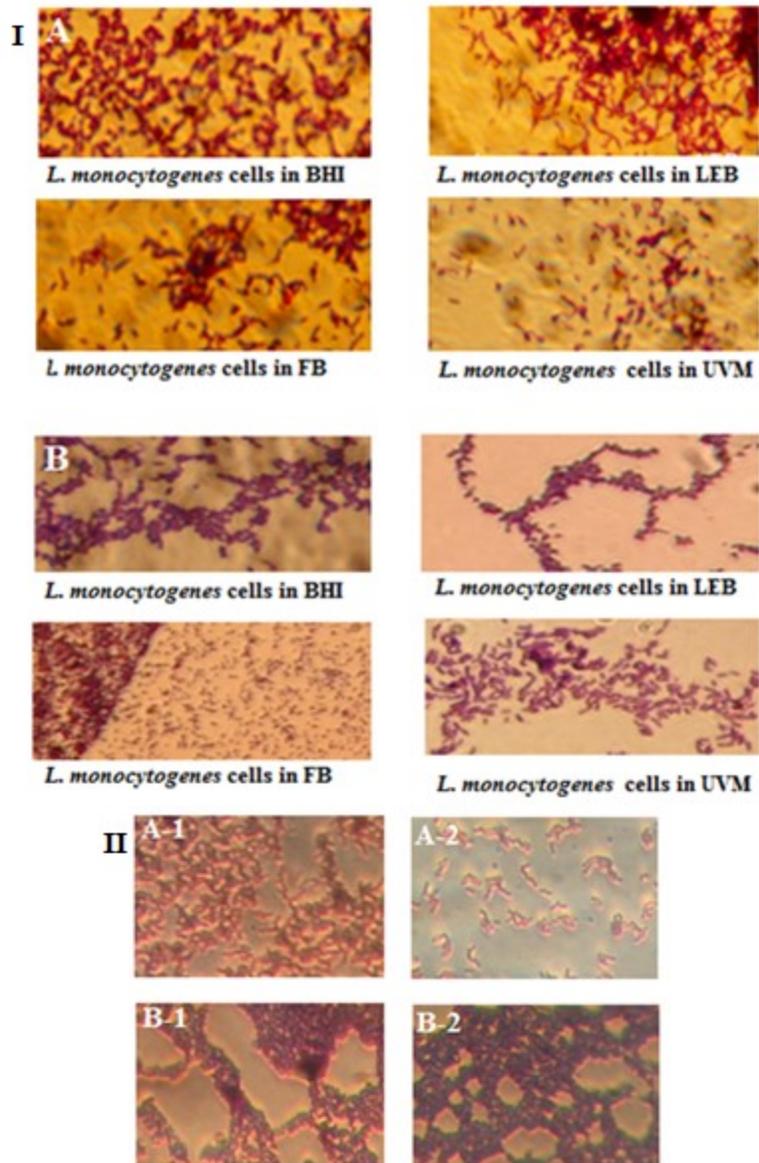


Figure 1.

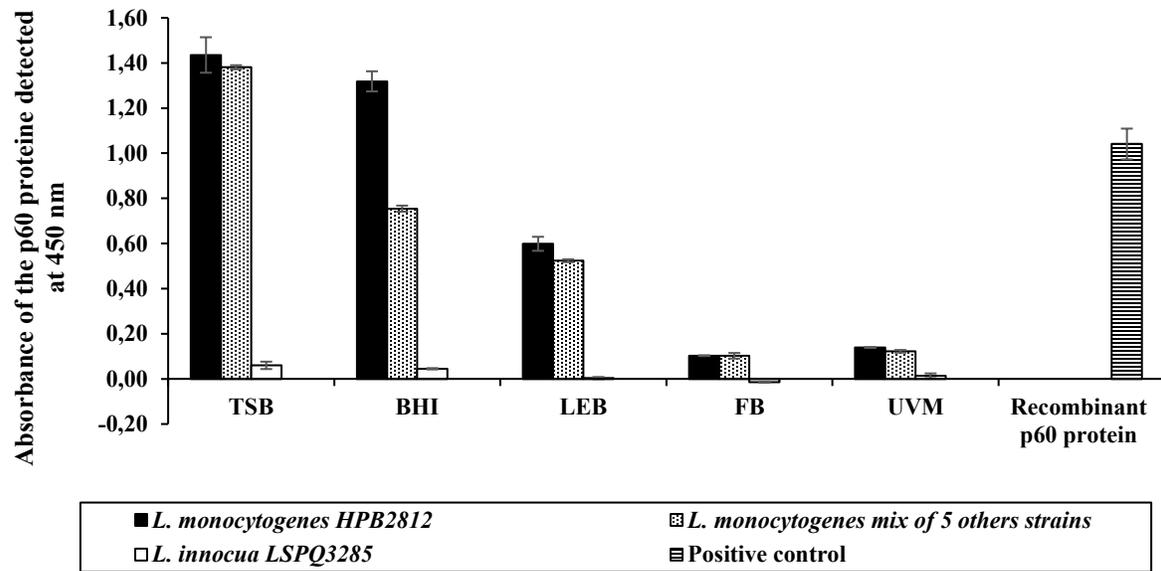


Figure 2.

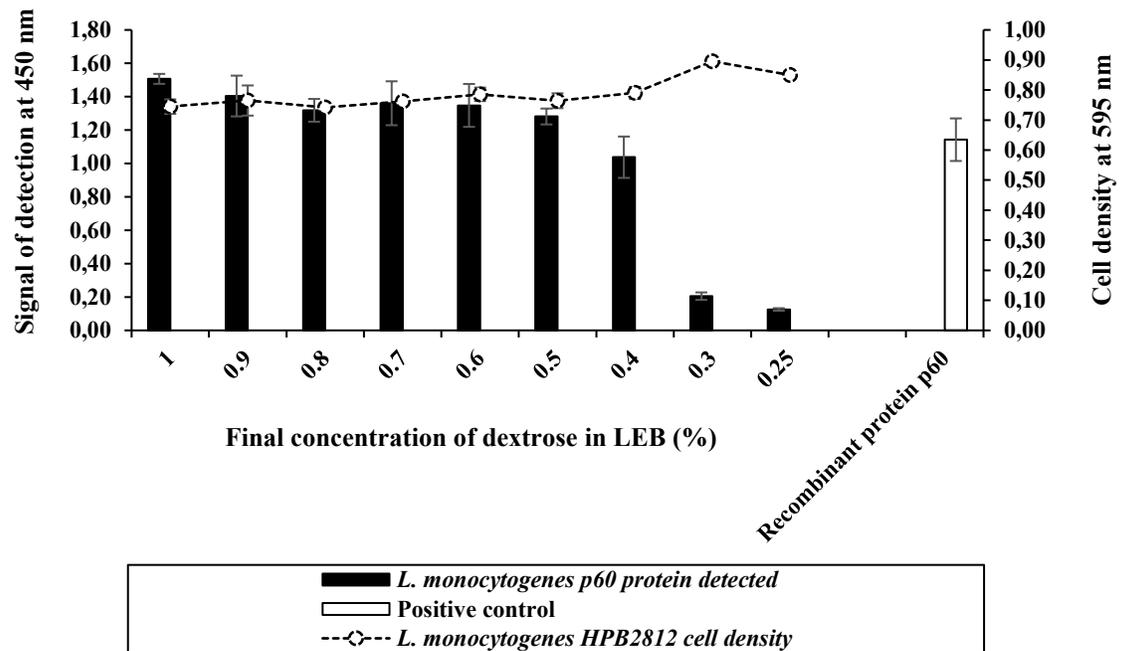


Figure 3.

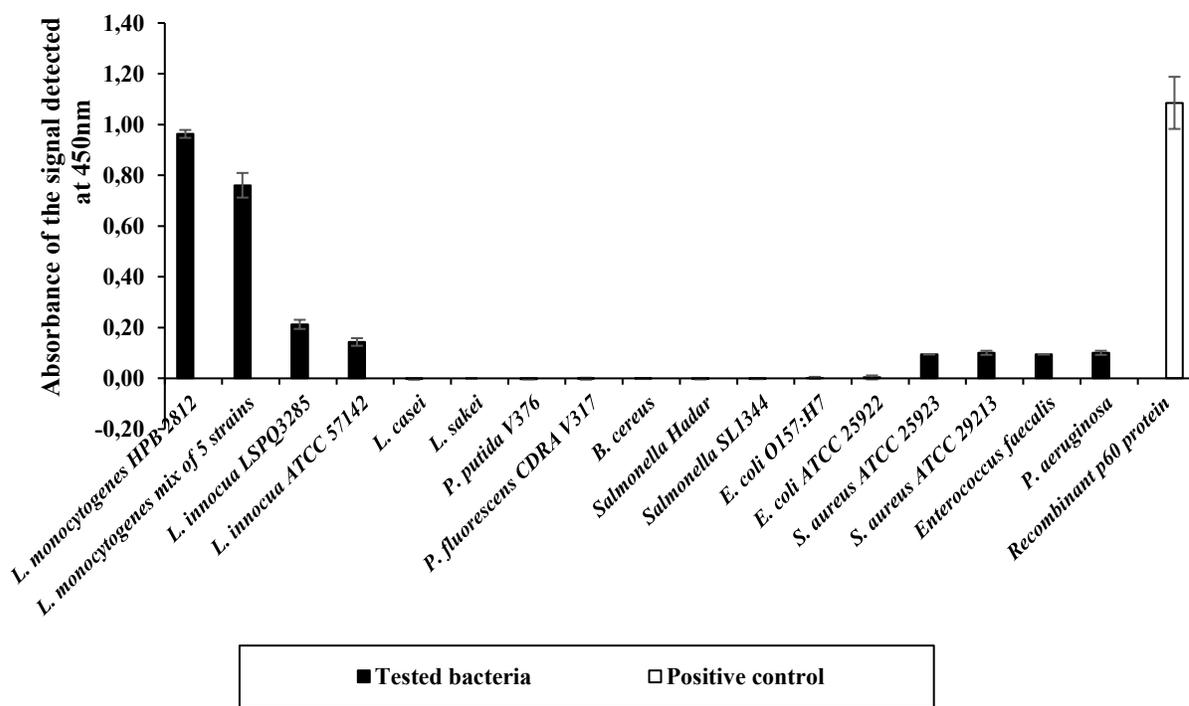


Figure 4.

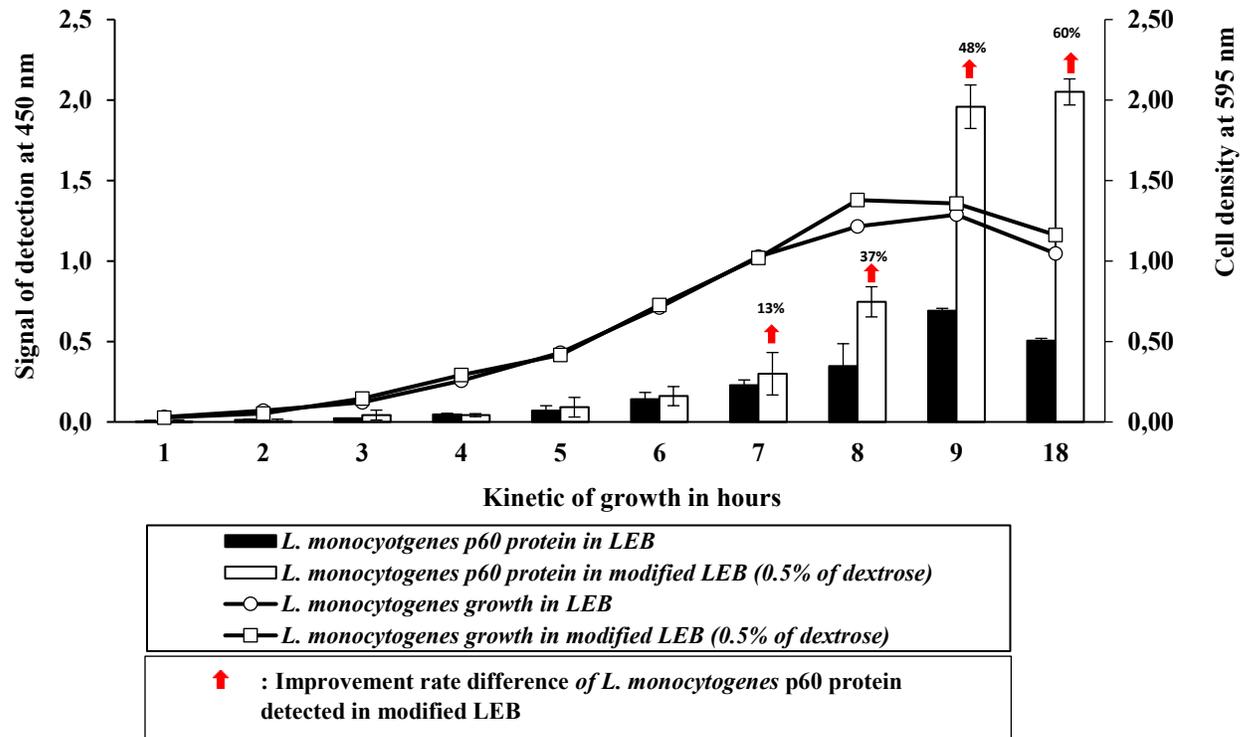


Figure 5.

Table 1: 2-level (2^5) factorial design parameters, matrix and experimental results in function of the nutrients in LEB.

Trial	Levels	Factor A: Dextrose (%)	Factor B: Yeast extract (%)	Factor C: Tryptone (%)	Factor D: Peptone (%)	Factor E: Dibasic potassium phosphate (%)	Response 1: Cell density	Response 2: p60 detected in sandwich ELISA
	Min (- 1)	0.25	0.6	1.7	0.3	0.25		
	Max (+1)	2	3	4.5	2.5	2		
1		2	3	1.7	0.3	2	0.94±0.02	0.62±0.14
2		0.25	3	4.5	2.5	0.25	0.56±0.06	0.16±0.05
3		2	3	4.5	2.5	2	1.13±0.03	0.03±0.02
4		0.25	3	1.7	2.5	0.25	0.55±0.04	0.12±0.02
5		2	3	1.7	2.5	0.25	0.50±0.04	0.96±0.16
6		2	3	4.5	2.5	0.25	0.52±0.04	0.77±0.28
7		0.25	3	4.5	2.5	2	0.34±0.06	-0.04±0.01
8		0.25	3	1.7	0.3	2	0.60±0.02	-0.01±0.01
9		0.25	0.6	1.7	2.5	0.25	0.57±0.03	0.12±0.02
10		0.25	0.6	4.5	2.5	2	0.46±0.03	-0.02±0.01
11		2	3	4.5	0.3	2	1.29±0.01	1.50±0.06
12		0.25	0.6	1.7	2.5	2	0.43±0.01	-0.02±0.01
13		2	3	1.7	0.3	0.25	0.53±0.02	0.63±0.05
14		0.25	0.6	1.7	0.3	0.25	0.66±0.02	0.11±0.01
15		0.25	3	4.5	0.3	2	0.48±0.03	-0.01±0.01
16		2	3	4.5	0.3	0.25	0.46±0.02	0.15±0.03
17		0.25	0.6	4.5	0.3	0.25	0.48±0.01	0.03±0.02
18		0.25	0.6	4.5	0.3	2	0.36±0.01	-0.04±0.01
19		2	0.6	1.7	2.5	0.25	0.58±0.02	0.39±0.07
20		2	0.6	1.7	2.5	2	1.11±0.01	0.37±0.06
21		2	3	1.7	2.5	2	0.92±0.04	0.41±0.07
22		0.25	0.6	4.5	2.5	0.25	0.53±0.01	0.02±0.01
23		2	0.6	4.5	0.3	2	1.07±0.02	1.07±0.19
24		2	0.6	4.5	2.5	2	0.99±0.06	0.46±0.08
25		0.25	0.6	1.7	0.3	2	0.41±0.02	0.02±0.01
26		2	0.6	1.7	0.3	0.25	0.40±0.01	0.12±0.03
27		0.25	3	1.7	0.3	0.25	0.54±0.04	0.18±0.01
28		0.25	3	4.5	0.3	0.25	0.62±0.06	0.09±0.08
29		0.25	3	1.7	2.5	2	0.69±0.03	0.01±0.01
30		2	0.6	4.5	2.5	0.25	0.47±0.01	0.07±0.01
31		2	0.6	4.5	0.3	0.25	0.47±0.03	0.04±0.01
32		2	0.6	1.7	0.3	2	0.91±0.04	0.44±0.09

Table 2: Parameters of adjustment ($A_{595nm} = 0.37$) for *L. monocytogenes* growth in 5 media.

Medium	A_{18h}	$\mu_{m1\%} (h^{-1})$	$\lambda_{1\%} (h)$
TSB	1.4	0.172	5.8
BHI	1.3	0.192	5.2
LEB	1.2	0.116	8.6
FB	0.7	0.093	10.8
UVM	0.37	0.082	12.2

TSB: Tryptic Soy Broth; **BHI:** Brain Heart Infusion; **LEB:** Listeria Enrichment Broth; **FB:** Fraser Broth; **UVM:** University Vermont Medium. A_{18h} is the maximum asymptotic value of growth after 18 h of incubation; μ_m is the maximum specific growth rate of log phase ($\mu_m = 1/\lambda$). λ is the lag time to achieve $A = 0.37$.

Table 3: Analysis of variance (ANOVA) of the experimental results of *L. monocytogenes* growth and p60 protein detected as a function of the nutrients present in LEB using a (2⁵) factorial design.

Source	Cell density				p60 protein detected in sandwich ELISA			
	F Value	p-value Prob > F	p-value ≤ 0.005 is significant	Confidence levels (%)	F Value	p-value Prob > F	p-value ≤ 0.005 is significant	Confidence levels (%)
Model	4.59	0.004	significant	99.6	3.9	0.0093	significant	99.1
A-dextrose	12.17	0.002	significant	99.8	16.8	0.0004	significant	99.96
B-yeast extract	0.42	0.5215		47.9	2.03	0.1661		83.4
C-tryptone	6.02x10 ⁻³	0.9387		6.1	9.5x10 ⁻⁶	0.9976		0.24
D-peptone	0.015	0.9028		9.7	0.33	0.5721		42.8
E-dibasic potassium phosphate	10.34	0.0035	significant	99.7	0.25	0.6232		37.7

Standard deviation of cell density= 0.20; Standard deviation of p60 protein expression = 0.31

Article 2

Development of a support based on chitosan and cellulose nanocrystals for the rapid and specific Detection of *Listeria monocytogenes* using anti-PepD monoclonal antibodies.

Part A: Optimization of the Antibody Immobilization Method

Marie-Christine Etty^a, Sabato D'Auria^b, Stephane Salmieri^a, Julie Coutu^a, Amina Baraketi^a, Majid Jamshidan^a, Carole Fraschini^c, Monique Lacroix^{a*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Centre, Nutraceutical Institute and Functional Foods, 531 boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

^b Institute of Food Science - CNR, Laboratory for Molecular Sensing, Via Roma, 64 111, 83100 Avellino, Italy.

^c FPInnovations, 570 boulevard Saint-Jean, Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 3J9.

*Corresponding author. E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca. Tel: +1 (450) 687-5010 #4489. Fax: +1 (450) 686-5501.

Contribution des auteurs:

Marie-Christine Etty : étudiante, a réalisé les expériences et la rédaction de l'article.

Sabato d'Auria : Co-directeur de recherche, a participé à l'élaboration des protocoles de recherche et correction de l'article.

Stephane Salmieri : Assistant de recherche, a participé aux expériences et discussion sur l'analyse FTIR et à la correction de l'article.

Amina Baraketi : étudiante, a participé aux expériences.

Julie Coutu : graduée en maîtrise, a participé à l'élaboration des protocoles.

Carole Fraschini : Professeure invitée de l'INRS, a participé à la correction de l'article.

Majid Jamshidan, Ph D, a participé à l'élaboration des études de modélisation mathématique.

Monique Lacroix : Directrice de recherche, responsable scientifique et coordinatrice du projet, a participé à l'élaboration des protocoles, aux discussions sur les résultats des expériences et à la correction de l'article.

Abstract

This paper presents the development of a new support for the detection of *Listeria monocytogenes* in sandwich ELISA format. The support is a membrane based on chitosane, cellulose nanocrystals and glycerol (m-CCG) in which specific monoclonal antibodies anti-p60 protein of *L. monocytogenes* were immobilized by a covalent crosslinking using glutaraldehyde. The chemical characterization of the support by FTIR showed that the m-CCG formation process was stabilized by the formation of hydrogen bonding between each component of m-CCG and the reactive amine groups allowing the antibody immobilization on m-CCG via glutaraldehyde. Moreover, the antibody immobilization method on m-CCG was optimized by mathematics modeling approaches, and it exhibited robustness and predictable detection in presence of 0.6% of cellulose nanocrystals (CNCs), 0.5g of CCG solution per well, after 2h of incubation for the immobilized antibodies. Results also showed that the presence of CNCs at the concentration of 0.6% was the most important factor of the optimization of the anti-PepD monoclonal antibody immobilization method on m-CCG. At this concentration, CNCs improve the resistance of m-CCG during the crosslinking treatment by a modification of the surface topography and the reinforcement of the tensile strength of the membrane m-CCG at more than 30 %.

Keywords:

Chitosan, Cellulose nanocrystals, Antibody immobilization, Covalent crosslinking, Mathematical modeling.

Chemical compounds studied in this article:

Chitosan (PubChem CID: 71853); Glycerol (PubChem CID: 753); Glutaraldehyde (PubChem CID: 3485); Sodium tripolyphosphate (PubChem CID: 24455).

Résumé

Cet article présente le développement d'un nouveau support pour la détection de *Listeria monocytogenes* en ELISA en sandwich. Ce support est une membrane à base de chitosane, de nanocristaux de cellulose et de glycerol (m-CCG) sur laquelle des anticorps monoclonaux spécifiques à la protéine p60 de *L. monocytogenes* ont été immobilisés par un procédé de réticulation covalente utilisant du glutaraldéhyde. La caractérisation chimique par FTIR a montré que le processus de formation de m-CCG a été stabilisé par des liaisons hydrogènes entre chaque composant de m-CCG et les groupement amines présents à la surface de la membrane ont permis l'immobilisation des anticorps sur m-CCG par le glutaraldéhyde. De plus, la méthode d'immobilisation des anticorps sur la m-CCG a été optimisée par la modélisation et a montré une robustesse et une détection prévisible en présence de 0,6% de nanocristaux de cellulose (CNC), 0,5 g de solution de GCC par puits et 2 heures de temps d'incubation pour les anticorps immobilisés. Les résultats ont également montré que la présence de CNC à la concentration de 0,6% était le facteur le plus important de l'optimisation de la méthode d'immobilisation des anticorps monoclaux anti-PepD sur la m-CCG. À cette concentration, les CNC améliorent la résistance de la m-CCG pendant le traitement de réticulation par une modification de la topographie de surface et par le renforcement de la de force de résistance à la traction de la membrane m-CCG à plus de 30%.

Mots clés:

Chitosane, nanocristaux de cellulose, immobilisation d'anticorps, réticulation covalente, modélisation mathématique.

1. Introduction

Nowadays, the persistence of a high number of foodborne illness outbreaks (more than 600 million of cases in the world) (World Health Organization, 2014) and food recalls (e.g. 250 recall incidents per year in Canada) (Public Health Agency of Canada, 2015) represent an important issue in public health throughout the world. Thus, the improvement of existing detection methods is necessary to reduce the cases of consumer illnesses and deaths and their associated economic costs (Thomas et al., 2015). In order to improve detection methods of foodborne pathogens such as *L monocytogenes*, biosensor technology has been developed (Hearty et al., 2006; Velusamy et al., 2010; Yoo & Lee, 2016). This technology is a sensing approach revealing the interactions between pathogenic targets (e.g. nucleic acid, proteins, cells) and bio-receptors (genetic probes, antibodies, enzymes) immobilized on different solid-state surfaces or platforms (Yoo & Lee, 2016). Moreover, among the existing technologies available, the low cost, rapid, portable and easy-to-use optical immunosensing method using a colorimetric sensor is one of the most commonly used (Hearty et al., 2006; Velusamy et al., 2010; Mukherjee et al., 2014; Yoo & Lee, 2016). However, the solid-state surface must meet three criteria to prevent a poor efficiency of the method (Seurynck-Servoss et al., 2007; Emaminejad et al., 2015). The first criterion is the evaluation of the surface area available for antibody binding. The second is the evaluation of the efficiency and the selectivity of antibodies grafted on the support, characterized by a stable linkage of antibodies and a minimal nonspecific protein binding. Finally, the last criterion is the accessibility of the binding site for the immobilized antibodies (antigenic binding fragment, Fab) by the control of the orientation of the fragment crystallizable (Fc) of the antibody. Our new biosensor platform based on chitosan (Cs), cellulose nanocrystals (CNCs) and glycerol (Gly) was chemically crosslinked with antibodies using glutaraldehyde (GA) molecule with the ultimate aim to improve the antigen capture by antibodies during bacterial growth. CNCs were investigated as a filling agent for the preparation of the membrane because they have demonstrated significant reinforcing properties in polymer

matrices such as water-soluble and water-insoluble polymers to produce reinforced nanocomposites (Zoppe et al., 2009; Khan et al., 2012; Sharmin et al., 2012; Zhou & Wu, 2012; Pereda et al., 2014). Gly is a plasticizing agent commonly used in the preparation of film-forming biopolymers, with the aim to avoid the brittleness of the biopolymeric membrane (Srinivasa et al., 2007; Ziani et al., 2008; Leceta et al., 2013). Its presence allowed plasticizing the chitosan-based membrane without affecting its chemical structure (Ziani et al., 2008). Chitosan [α (1–4) 2-amino-2-deoxy β -D-glucan] (Cs) was selected as the major component of the membrane due to its film-forming properties and the abundant availability of free amino groups that can be used for antibody immobilization by chemical crosslinking (Liu & Nan, 2004; Bhumkar & Pokharkar, 2006). After covalent bonding, the bioactivity of the antibody was also fully retained and the membrane remained permeable to dissolved solutes (Seurynck-Servoss et al., 2007). Chemical crosslinking is categorized into three groups and among them covalent attachment between a reactive group located on the solid support (aldehyde, maleimide, hydrazine, epoxide, etc.) and the antibodies (thiol, hydroxyl and primary amine) was selected for this project (Seurynck-Servoss et al., 2007; Emaminejad et al., 2015). The amino residues on m-CCG containing chitosan and antibodies (constant fragment, Fc) were shown to be suitable for the covalent attachment via glutaraldehyde (Seurynck-Servoss et al., 2007). Glutaraldehyde (GA) is the most common crosslinker used to link amino groups with proteins (Musale & Kumar, 2000; Migneault et al., 2006). However, literature also reported that the use of GA could affect the inner structure of the solid support used for antibody immobilization (Albarghouthi et al., 2000; Musale & Kumar, 2000; Migneault et al., 2006). For this reason, an insolubilizing pretreatment with sodium tripolyphosphate (TPP; $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) was found to be an alternative to reduce the subsequent deformation and brittleness of the support due to water desorption induced by the crosslinking method (Shu & Zhu, 2002; Liu & Nan 2004; Bhumkar & Pokharkar, 2006). Consequently, it was necessary to optimize the effect of all chemical interactions implied in the development of the m-CCG membrane used as a support for antibody immobilization (Seurynck-Servoss et al., 2007). To do

so, mathematical modeling was used to determine the predominant chemical interactions between the monoclonal antibodies against anti-pepD protein of *L. monocytogenes* and the surface of the m-CCG membrane and to optimize their bioactivity efficiency as a bio-receptor for the detection of the *L. monocytogenes* pathogen.

This study is a first part of the work done aiming to develop a biopolymer membrane (m-CCG) composed of chitosan, cellulose nanocrystals and glycerol as an immunosensor platform for the rapid and colorimetric detection of *Listeria monocytogenes*.

2. Material and methods

2.1. Production of anti-pepD monoclonal antibodies

The p60 protein is a surface protein involved in the growth of all *Listeria* species (Beauchamp et al., 2012). It is suitable for the detection of *L. monocytogenes* due to the presence of a short sequence of eleven amino acid called peptide PepD (QQQTAPKAPTE) unique to the p60 protein of *L. monocytogenes* (accession number AEO02672 in the NCBI protein database) (Beauchamp et al., 2012). After being synthesized (GenScript Inc., Piscataway, NJ, USA), the peptide was used for the production of the specific mouse anti-pepD monoclonal antibody protein of *L. monocytogenes* p60 protein (anti-PepD mAb) (GenScript Inc., Piscataway, NJ, USA).

2.2. Preparation of the CCG membrane

The CCG membrane (m-CCG) was composed of chitosan (Cs), cellulose nanocrystals (CNCs) and glycerol (Gly). These three components were selected based on their specific properties as described by Khan et al. (2012) in order to produce an adequate functionalized film.

Firstly, 0.3% to 0.6% (w/v) of CNC spray-dried powder (FPInnovations, Pointe-Claire, QC, Canada) was dispersed in water (w/v) overnight at room temperature. Then 1% (v/v) of glacial acetic acid (AA; Laboratoire Mat, Beauport, QC, Canada) was added to the suspension and sonicated at 1,000 J/g with a QSonica Sonicator (Fisher Scientific, Ottawa, QC, Canada). Secondly, a solution of 2% (w/v) of Cs

(HMC+, 85% deacetylated, M_w 1 kDa; Heppe Medical Chitosan, Saale, Deutschland) was added to the CNC/AA suspension and stirred at room temperature with an IKA® RW20 digital mixer (Fisher Scientific) for 2h, followed by the addition of 0.6% (w/v) of Gly (Laboratoire Mat). The CNC/AA/Cs/Gly mixture, namely assigned to "CCG suspension", was then mixed again for 1h to allow complete dissolution/dispersion. Then, the mixture was degassed under vacuum overnight at room temperature and the 0.5-1g of the CCG suspension was cast in a 24-wells microplate (untreated, flat bottom; Sarstedt, Montreal, QC, Canada) and let dry at room temperature for approximately 3 to 5 days until constant weight. The dried m-CCG membranes were stored at room temperature.

2.3. Antibody immobilization method by crosslinking

Crosslinking reaction. The first step consists in insolubilizing the m-CCG using 500 μ L of TPP 5-10% (w/v) (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada). The reaction was carried out for 10 min under shaking (80 rpm) at room temperature, and followed by three washing steps with 1.5 mL of distilled water. Then, 300 μ L of GA 0.2-0.4%, (v/v) (Sigma Aldrich) was covalently attached to the amino group of m-CCG. The reaction was performed for 30 min at room temperature under shaking (80 rpm). The membrane was washed three times with 1.5 mL of distilled water. Thereafter, 300 μ L (p/v) of mouse anti-pepD monoclonal antibodies (mAb anti p60, 10-20 μ g/mL p/v; GenScript Inc., Piscataway, NJ, USA) was immobilized via the aldehyde functional groups added onto the m-CCG after an incubation period of 2-3h under shaking (80 rpm) at room temperature. Films were then washed five times with a phosphate buffer saline solution containing 0.05% (v/v) of Tween® 20 (PBS-T) under shaking at room temperature (three washings of 10 min followed by two washings of 5 min).

The chemical equation of the crosslinking reaction is:



Evaluation of the antibody immobilization efficiency using indirect ELISA.

After crosslinking, 1 mL of bovine serum albumin (BSA) 1% (w/v) in phosphate buffer saline solution (PBS; Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) was used to

block the unspecific interactions on the m-CCG with immobilized anti-PepD mAb. The blocked m-CCG was incubated at room temperature for 1h under shaking (80 rpm) followed by washing with 1.5 mL of PBS-Tween[®] 20 (PBS-T) for 10 minutes. Detection and revelation of immobilized antibodies was performed with 300 μ L of secondary monoclonal antibodies anti-mouse coupled with horseradish peroxidase (MsAb-HRP, 1/17000 v/v; Cedarlane, Burlington, ON, Canada) followed by incubation for 30 min at room temperature under shaking (80 rpm). Three washings of 10 min and two washings of 5 min with PBS-T were also performed. Thereafter, 200 μ L of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Fisher Scientific, Ottawa, QC, Canada) was added into each well for 1-min colour development. The color reaction was stopped by the addition of 100 μ L of 2 M sulfuric acid (H₂SO₄, Sigma Aldrich,). Coloration was read at 450 nm using a microplate reader BioTek ELx800 (Winooski, VT, USA) equipped with Gen5 software.

2.4. Characterization of the CCG membrane in FTIR spectroscopy

Successive steps of the film preparation were followed by FTIR spectroscopy. Spectra were recorded using a Spectrum One spectrophotometer (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) equipped with an attenuated total reflectance (ATR) device for solid analysis and a high linearity lithium tantalate (HLLT) detector. Spectra were analyzed using Spectrum 10.3.9 software. Film samples were stored at room temperature for 48h in a desiccator containing saturated NaBr solution to ensure a stabilized atmosphere of 60% RH at 20°C. Samples were placed onto a zinc selenide crystal, and the analysis was performed within the spectral region of 4000-650 cm^{-1} with 32 scans recorded at a 4 cm^{-1} resolution. After attenuation of total reflectance and baseline correction, spectra were normalized with a limit ordinate of 1.5 absorbance units. Resulting FTIR spectra were compared to evaluate the effects of the addition of film components, based on the intensity and shift of vibrational bands, but also to characterize cross-linking by TPP and GA, and mAb immobilization in the fingerprint region.

2.5. Scanning electron microscopy

A Quanta 450 environmental scanning electron microscope (ESEM™, FEI, Hillsboro, OR, USA) was used in order to observe the effect of the ratio of introduced cellulose nanocrystals (CNCs) on the surface topography of the chitosan-based membrane (m-CCG) at a magnification of 100×.

2.6. Experimental design

Optimization of the antibody immobilization methods for the p60 protein of *L. monocytogenes* was performed following experimental design with Design-Expert software V7.0 (Stat-ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Experimental designs represent a sub-group of mathematical and statistical techniques used for modeling called response surface methodology (RSM) (Dwevedi & Kayastha, 2009). Screening of the immobilization method used to link the anti-pepD monoclonal antibodies (anti-PepD mAb) onto the CCG membrane was performed with a 2-level factorial design (2^6) in order to determine the key parameters. In a preliminary step, different parameters such as concentration of components, temperature and incubation time were tested. Preliminary results (data not shown) allowed determining six parameters to be screened in a 2-level factorial design (2^6 factorial design). These six parameters were: i) concentration of CNC, ii) quantity of CCG solution added to the wells (Quantity per well), iii) the immobilization incubation time (T_{im} mAb), iv) concentration of the anti-pepD monoclonal antibody (anti-PepD mAb), v) concentration of TPP and vi) concentration of GA. A total number of 102 combinations were evaluated (data not shown). Thereafter, a Box-Behnken design was selected since it is the most used in industrial research when more than two key factors are involved (Khuri & Mukhopadhyay, 2010; Jose et al., 2013). It is also simpler and more economical to use, as only three levels are necessary (-1, 0, 1) (Khuri & Mukhopadhyay, 2010). A path steepest ascent method was also applied to the Box-Behnken design after performing the experimentations. This method represents the stepwise regression automatically carried out by the software in order to improve the regression model and to assess

that all relationships between key factors and responses are being considered (Dwevedi & Kayastha, 2009; Joyce & Leung, 2013; Jose et al., 2013).

2.7. Mechanical properties

Tensile strength (TS), tensile modulus (TM) and elongation at break (Eb) were measured to evaluate the mechanical properties of the m-CCG membrane at different concentrations of CNCs (0, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.6% in CCG suspension). These concentrations of CNCs after the formation of the membrane CCG represent respectively 10, 15, 20 and 30% of the polymer dry mass. The surface of Petri dish ($\approx 41 \text{ cm}^2$) and the surface of 24-well microplate ($\approx 1.7 \text{ cm}^2$) were calculated in order to determine the equivalent quantity of the CCG suspension after casting ($0.5 \text{ g} \times 24.1 = 12.05 \text{ g}$). The dried CCG membrane was cut into thin strips (70 mm long and 14 mm width). The thickness of the membrane was averaged using a number of five randomized reading taken on each strip with a Mitutoyo Digimatic Indicator (Type ID-110E; Mitutoyo Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan). Finally, TS, TM and Eb were determined using a Universal Testing Machine (UTM, model H5KT, 1 kN load cell; Tinius-Olsen, Horsham, PA, USA) using an initial distance of 50 mm between clamps and a speed spacer of 50 mm per min.

2.8. Statistical analysis

Experiments were done in triplicate ($n = 3$). For each replicate, an analysis of variance (ANOVA) for multiple factors, and Student *t*-test for 2-independent samples, were performed using SPSS software V16.0, at a 95% significant level.

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of the m-CCG membrane by FTIR spectroscopy

Fig. 2 presents the FTIR spectra related i) to the different components of the m-CCG membrane (**Fig. 2a**) and ii) to the successive steps of crosslinking and mAb immobilization on membrane surface, from m-CCG to m-CCG+TPP+GA+mAb (**Fig. 2b**).

Composition of the m-CCG membrane. The FTIR spectra of membrane chitosan (m-Cs), cellulose nanocrystals (m-CNC), glycerol (Gly solution) and the resulting m-CCG membrane composed of the three components are presented in **Fig. 2a**. From spectra comparison, five infrared regions were identified in relation with the chemical nature of the components, at 3500-3200, 3000-2800, 1700-1500, 1500-1200 and 1200-800 cm^{-1} . Typically, in the region 3500-3200 cm^{-1} , the broad band at 3360-3288 cm^{-1} includes OH stretching from Cs, CNC and Gly, but also NH stretching mode from Cs (Musale & Kumar, 2000; Migneault et al., 2006; Gierszewska & Ostrowska-Czubenko, 2016). Overall, in comparison with m-Cs spectrum, it is observed that the primary structure of Cs was not affected by the presence of CNC and Gly in the m-CCG membrane. A typical double-bounce shape of OH stretching is observed in m-CCG spectrum due to the OH vibration of CNC crystalline structure (Khan et al., 2012). Moreover, the broader shape of this band (with a shift towards lower frequencies) is attributable to an increase of hydrogen bonding in the resulting m-CCG polymer network (Le Tien et al., 2000; Khan et al., 2012; Salmieri et al., 2015). The band at 2980-2820 cm^{-1} is assigned to overlapping symmetric and asymmetric CH stretching vibrations from Cs, CNC and Gly (Khan et al., 2012; Salmieri et al., 2015). It is observed that this band was not influenced by CNC and Gly addition, so that Cs and m-CCG spectra display a similar shape, most probably due to the high concentration of Cs and high vibrational intensities of cyclic CH stretching from glucosamine residues. The bands in the region 1700-1500 cm^{-1} are related to Amide I vibration at 1646 cm^{-1} (C=O stretching) and Amide II at 1553 cm^{-1} (NH bending) which was due to the amino and acetamide groups of Cs. Moreover, the comparison of all FTIR spectra in **Fig. 2a** allowed to observe that these bands were not affected by the other membrane components. Equal ratio of Amide I/Amide II intensities after incorporation of CNC and Gly were obtained (difference between Cs and m-CCG spectra) confirming that membrane components did not interfere on the structure of Cs matrix. This observation for Gly was also made by Ziani et al. (2008). The other regions at 1500-1200 cm^{-1} and 1200-800 cm^{-1} are mainly associated to CH, C-O and CN bending vibrations without any structural effect due to CNC and Gly

addition. Therefore, this preliminary FTIR analysis of the composition of the m-CCG membrane showed that the membrane formation process was stabilized by hydrogen bonding between each component. It also permitted to confirm the availability of Amide bands (1646 cm^{-1} and 1553 cm^{-1}) in CCG membrane which was essential for the antibody immobilization method.

Cross-linking treatments and Ab immobilization onto membrane surface.

The advancement of cross-linking and mAb immobilization was also followed in order to study chemical changes in the structure of m-CCG membranes, via the identification of absorption bands with a focus in the fingerprint region (**Fig. 2b**). Molecular interactions were observed in the region $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, but new covalent linkages were identified in the region $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ with major modifications in amide and amine vibrations. In the region $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, the subsequent treatments of TPP, GA and mAb immobilization induced a decrease of band width, which is congruent with a decrease of H bonding and a decrease of NH_3^+ groups in polymer network due to ionic cross-linking by TPP and covalent cross-linking by GA (Salmieri and Lacroix, 2006; Khan et al., 2012).

A zoom of the region $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ is showed in **Fig. 2c** in order to display the chemical modifications after TPP/GA crosslinking and mAb immobilization, via free aldehyde residual groups of GA, as previously observed by other authors (Albarghouthi et al., 2000; Musale & Kumar; Migneault et al., 2006). During ionic cross-linking by TPP, it is expected that the NH_3^+ groups of chitosan react with phosphate groups, resulting in a deprotonation of Cs and the generation of an insoluble gel. Also, during crosslinking by GA, it is expected that aldehyde groups of GA react instantly with amino groups of Cs to form amide and imine covalent linkages, as already observed by other authors (Monteiro & Airoidi, 1999; Le Tien et al., 2000; Musale & Kumar et al., 2000; Jatariu et al., 2012). Indeed, **Fig. 2c** clearly shows that after crosslinking (spectra m-CCG+TPP and m-CCG+GA), the intensity of Amide I band (1646 cm^{-1}) increased whereas the intensity of NH bending mode from protonated and deprotonated amino groups in Amide II band (1553 cm^{-1}) decreased. A shifting of Amide I band (towards 1636 cm^{-1}) and Amide II band (towards 1542 cm^{-1}) to lower frequencies was also observed. Hence, these

relative changes reveal that crosslinking reactions occurred according to a mechanism implying the reaction of the protonated amine groups (NH_3^+) of Cs with phosphate groups of TPP, followed by the reaction of amino groups (NH_2) from Cs with aldehyde groups of GA, to promote the formation of secondary amide linkage. At this step, the stretching vibration of imines ($\text{C}=\text{N}$) at $1610\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ is overlapped with Amide II band but could contribute to these changes, as reported by Musale & Kumar (2000). Such observations were reported by other studies (Wang et al., 2004; Azeredo & Waldron, 2016) to confirm the structure modifications in this region. In addition, from the differences observed between m-CCG, m-CCG+TPP and m-CCG+TPP+GA spectra, it can be interpreted that the crosslinking degree in polymer network was strengthened as the Amide I vibration increased to the detriment of a successive decrease of NH bending vibrations in Amide II vibrations. Indeed, the comparison of these three spectra indicates subsequent increases of the Amide II to NH bending peak absorbance ratio.

The effect of mAb attachment on m-CCG surface generated similar observations in the resulting m-CCG+TPP+GA+mAb spectrum. As shown in **Fig. 2c**, the region $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ was characterized by a similar drop of NH bending mode and the simultaneous appearance of the Amide II band. These results could be associated with the predominance of peptide (amide) bonds in mAb protein structure (Boulet-Audet et al., 2016). Therefore, this FTIR analysis confirmed that subsequent TPP/GA cross-linking treatments followed by mAb immobilization onto m-CCG membrane surface was carried out successfully. Results suggest that crosslinking and immobilization methods were clearly characterized by investigating **i)** the region $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ for intermolecular hydrogen bonding in polymer network and **ii)** the region $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ for cross-linking treatments and mAb immobilization.

3.2. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used in order to observe the effect of different concentrations of CNCs on the surface topography of the m-CCG

membrane (**Fig. 3**). Results in **Fig. 3a-1** introduce the surface topography of the m-CCG membrane in the absence of CNCs (m-CG). The surface of the m-CG membrane seems smooth and homogenous with some layering. However, **Fig. 3a-2** shows that these layering are not visible at a macroscopic scale and could be due to the peeling of the membrane after drying in microplate wells. **Fig. 3b-1** and **3c-1** illustrate the m-CCG membrane in presence of different concentrations of CNCs, at low concentrations between 10 and 15% of the polymer dry mass and high concentration between 25 and 30% of the polymer dry mass. Results indicate that the presence of CNCs changed the topography of the surface of the membrane. Indeed, at the low and high concentrations of CNCs, the surface became rougher and several aggregates appeared throughout the membrane. These characteristics suggest that cellulose molecule aggregated within the crystalline structures modify the surface topology of the m-CCG to produce an evenly distributed apparent roughness but, with a random orientation of the crystalline structure of aggregates in the membrane. (Khan et al., 2014). Moreover, the modification of the surface of the CCG membrane seemed to be more accentuated at high CNC concentration (**Fig. 3c-1**) than at low CNC concentration (**Fig. 3b-1**). Visually, m-CG is smooth and transparent (**Fig. 3a-2**) whereas m-CCG (**Fig. 3b-2** and **2c-2**) became progressively rougher and opaque due to the increase of the CNC concentration and the formation of the aggregates structures observed in SEM (Wang & Roman et al. 2011). The work reported by Khan et al. (2014) associated these aggregated structures to polyelectrolyte complexes (PECs) formed between Cs and CNCs in presence of acetic acid. Acetic acid conduces to low pH which causes the protonation of the free amine groups (NH_2) in the *N*-glucosamine molecule of chitosan. This protonated amine (NH_3^+) reacts with the anionic form of the sulfate group (SO_3^-) located on the surface of the CNCs to form this PEC (Wang & Roman et al. 2011). Thus, these results suggested that molecular interactions occurred between CNC and Cs, as a main reason explaining the modified surface topography of the m-CCG membrane.

3.3. Response surface methodology (RSM) for the optimization of anti-pepD monoclonal antibodies (anti-PepD mAb) immobilization onto the m-CCG membrane

This section presents the RSM results for the optimization of anti-PepD mAb immobilization onto the m-CCG membrane. The first part (**Table 1**) represents the screening of all the parameters involved in the immobilization method by using a 2-level factorial design to identify the key parameters. The second part consists in using the steepest ascent method in a Box-Behnken design to optimize those key parameters and build a predictable model. Finally, the third part is the validation of the robustness and the prediction of the optimized model.

Screening of the immobilization of monoclonal antibody on the m-CCG membrane method using a 2-level factorial design

The model obtained (Table 1) revealed that the screening of the parameters involved in the immobilization method had a significant effect ($p \leq 0.05$ and confidence levels (CL $\sim 100\%$) on the efficiency of the immobilized monoclonal antibodies. Moreover, the high confidence levels for the parameters A-CNC concentration (CL_{CNC} = 95%), C-quantity of CCG suspension added per well (CL_{quantity per well} $\sim 100\%$) and F-antibody immobilization incubation time (CL_{Tim mAb} $\sim 100\%$) demonstrated that these parameters had the most significant effect on the efficiency of immobilization compared to the other parameters tested (Jose et al., 2013). The optimal efficiency of the antibodies immobilized on m-CCG (maximal absorbance at 450 nm = 1.63) was reached only when the antibody immobilization incubation time was short (2h), the quantity of CCG suspension added per well was minimized (0.5 g) and the concentration of CNCs was maximized (0.6%).

Steepest ascent method in Box-Behnken design. In the second part of the optimization, the three key parameters previously identified were optimized using a Box-Behnken design in RSM. **Table 2** presents the experimental results compared to the predicted values obtained by modeling. Experimental values show that the optimal experimental conditions correspond to trial 7 (Absorbance max = 1.25) for which the concentration of CNC is maximized (0.6%), the quantity of CCG suspension is minimized (0.5 g) and the incubation time is short (2.5 h).

The previous analysis of variance (ANOVA) without steepest ascent method did not permit to obtain a non-significant ($p > 0.05$) lack of fit parameter (**Table 3**). Only a significant polynomial cubic model ($p \leq 0.05$) was obtained. Knowing that a non-significant lack of fit value is important to confirm that the model takes in account the contribution of the relationships between the key factor and the response, the steepest ascent method was applied on the cubic model (Dwevedi et al., 2009; Joyce et al., 2013; Jose et al., 2013). Thus, this modification has permitted to obtain a non-significant ($p > 0.05$) lack of fit and a significant ($p \leq 0.05$) polynomial reduced cubic model where only the CNC concentration had a significant effect ($p \leq 0.05$) on the efficiency of immobilization. Hence, the fitting regression model was defined by the following 2nd order polynomial equation:

$$Y = 0.88 + 0.15A - 0.066B + 0.028C - 0.064AB - 0.14AC - 0.10A^2 + 0.079C^2 - 0.24A^2B - 0.30AC^2$$

where Y represents the efficiency of antibody immobilization (expressed in absorbance units) and A, B and C represent the coded key parameters obtained from the factorial design. A: CNC concentration (%); B: quantity per well (g); C: Tim mAb (h).

The regression coefficient for this equation ($R^2 = 0.91$) suggests that only 9% of the total variation cannot be explained by the model. Thus, this equation is suitable to predict the efficiency of antibody immobilization. The predicted values (**Table 2**) were calculated using this equation and the residual value showed that the predicted response is in agreement with experimental values.

Diagnostic plots were also carried out to verify the presence of any discrepancies between the model and the experimental values (**Fig. 4**). As reported by Jose et al. (2013), this evaluation was composed of three tests. The 1st test concerned the determination of the normality of the residuals in the test of the normal probability plot of studentized residuals. Results showed a linear pattern for the plot of the experimental values (**Fig. 4a**). These observations allowed concluding that the obtained model was suitable for the optimization of the method. The 2nd test consisted in evaluating the relationship between the experimental and the predicted responses. Results seemed to fit with the model because the distribution

of the experimental values vs the predicted values were similar (**Fig. 4b**). The 3rd test concerned the determination of the constant error for the plot of studentized residuals and predicted values. The data plot seemed to be distributed homogeneously and randomly (**Fig. 4c**). These results suggest that the constant error did not change for the predicted data.

The validation section of the optimization was performed in two parts. Firstly, the predicted model in function of Tim mAb was evaluated to validate its robustness on the efficiency of antibody immobilization (Joyce et al., 2013). Secondly, the mechanical properties of m-CCG were evaluated to understand the role played by the effect of CNC concentration on the efficiency of immobilization onto this biopolymer membrane.

Evaluation of the predicted model in function of Tim mAb is presented in **Table 4**. Results showed that, with a high accuracy (± 0.02), the immobilization efficiency was optimized and reliable at 0.6% of CNC, 0.5 g of CCG per well and 2 h of incubation. The 3-dimensional (3D) response surface representation of the optimized polynomial model is presented in **Fig. 5**. The plot describes the effect of the quantity of CCG suspension per well (Quantity per well; g) and the incubation time (Tim mAb; h) at a fixed and optimized CNC concentration (0.6% w/v) on the efficiency of immobilized antibodies on m-CCG. Thus, results show that the immobilization efficiency was higher when the quantity per well was low (0.5 g) despite an increase of Tim mAb. As opposed, an inefficient response (blue zone) was observed when the quantity of suspension per well and the incubation time were higher (1 g and 3 h, respectively). These results suggested that a relationship can be established between the high concentration of CNC and the low quantity of CCG suspension. Indeed, at a concentration of CNC of 0.6% (w/v), it is recommended to minimize the quantity of CCG per well (0.5 g) to allow an efficient antibody immobilization and to reduce the incubation time.

The evaluation of the mechanical properties of m-CCG was illustrated in **Table 5**. The effect of CNC concentration on the efficiency of antibody immobilization on the m-CCG was supported through the evaluation of tensile strength (TS), tensile modulus (TM), and elongation at the break (Eb). Results indicate that TS and TM

were significantly higher ($p \leq 0.05$) when the concentration of CNC reached a maximum of 0.6%, with respective values of 3393 and 60 MPa. In comparison, without CNC, TM and TS were respectively measured at 1385 and 32 MPa respectively (**Table 5**). Moreover, Eb at a concentration of CNC of 30% of the polymer dry mass was significantly lower ($p \leq 0.05$) (Eb = 11.5%) compared to samples without CNC (Eb = 18.3%). Thus, data in **Table 5** show that an increasing CNC concentration improved significantly ($p \leq 0.05$) the resistance of the m-CCG to tension (*i.e.* elongation) and its rigidity compared to the support without CNC. Khan et al. (2012) and Rubentheren et al. (2015) obtained similar improvement of the mechanical properties of chitosan-based films in the presence of CNCs. According to their work, the improvement of TS obtained for m-CCG (> 30 %) is due to a main role played by the CNC filler when incorporated into the biopolymeric matrix.

4. Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that the m-CCG support was successfully optimized for antibody immobilization. Results from FTIR analysis, SEM imaging and the optimization by mathematical modeling showed that the covalent antibody immobilization on the m-CCG membrane method was suitable to promote a stable and efficient binding of anti-pepD monoclonal antibody. The efficiency of this immobilization method on the membrane CCG was found to be promoted not only by covalent linkage but also by the molecular interactions between CNC and chitosan. Furthermore, these interactions allowed improving the resistance of the m-CCG membrane and minimizing the negative effects from covalent treatment in the immobilization process. In addition, mathematical modeling pointed out that a robust and efficient antibody immobilization as an optimal model was composed of 0.6% of CNC, 0.5 g of CCG solution per well and an immobilization time of 2 h. Therefore, this study highlighted the feasibility of production of an immunosensor m-CCG support, via antibody immobilization, for a rapid colorimetric detection of *Listeria monocytogenes*.

Acknowledgements

The project of this research was performed in collaboration with CNR Comessa “Development of biochips for food safety and health” (SD) in Italy. Moreover, authors acknowledge the financial support of the Ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations du Québec (MEIE) International Program [Grant PSR-SIIRI-933] and S.M. Group International Inc. through the Armand-Frappier Foundation at INRS University. Authors would also like to thank FPInnovations for their contribution and support.

References

- Albarghouthi, M., Fara, D.A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K., & Badwan, A. (2000). Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 206(1), 23-34.
- Azeredo, H.M., & Waldron, K.W. (2016). Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 109-122.
- Beauchamp, S., D'Auria, S., Pennacchio, A., & Lacroix, M. (2012). A new competitive fluorescence immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes*. *Analytical Methods*, 4(12), 4187-4192.
- Bhumkar, D.R., & Pokharkar, V.B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 7(2), E138-E143.
- Bouguelia, S. (2012). *Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux*. Université de Grenoble.
- Boulet-Audet, M., Kazarian, S.G., & Byrne, B. (2016). In-column ATR-FTIR spectroscopy to monitor affinity chromatography purification of monoclonal antibodies. *Scientific reports*, 6.
- Coutu, J.V., Morissette, C., D'Auria, S., & Lacroix, M. (2014). Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Microbiology Research International*, 2(46-52).

Dwevedi, A., & Kayastha, A.M. (2009). Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, 100(10), 2667-2675.

Emaminejad, S., Javanmard, M., Gupta, C., Chang, S., Davis, R.W., & Howe, R.T. (2015). Tunable control of antibody immobilization using electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 1995-1999.

Gierszewska, M., & Ostrowska-Czubenko, J. (2016). Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. *Carbohydrate Polymers*, 153, 501-511.

Hearty, S., Leonard, P., Quinn, J., & O'Kennedy, R. (2006). novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 294-312.

Jatariu, A.N., Holban, M. N., Peptu, C.A., Sava, A., Costuleanu, M., & Popa, M. (2012). Double crosslinked interpenetrated network in nanoparticle form for drug targeting—Preparation, characterization and biodistribution studies. *International journal of pharmaceutics*, 436(1), 66-74.

Jose, P. A., Sivakala, K. K., & Jebakumar, S. R. D. (2013). Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces sp.* JAJ06. *International Journal of Microbiology*, 2013.

Joyce, A.P., & Leung, S. S. (2013). Use of response surface methods and path of steepest ascent to optimize ligand-binding assay sensitivity. *Journal of immunological methods*, 392(1), 12-23.

Khan, A., Khan, R.A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tand, V., Kamal, M.R., Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1601-1608.

Khan, A., Vu, K.D., Chauve, G., Bouchard, J., Riedl, B., & Lacroix, M. (2014). Optimization of microfluidization for the homogeneous distribution of cellulose nanocrystals (CNCs) in biopolymeric matrix. *Cellulose*, 21(5), 3457-3468.

- Khuri, A.I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- Le Tien, C., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., Delmas-Patterson, G., Yu, H. L., & Lacroix, M. (2000). Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5566-5575.
- Leceta, I., Guerrero, P., & De la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 339-346.
- Liu, C., Bai, R., & Nan, L. (2004). Sodium tripolyphosphate (TPP) crosslinked chitosan membranes and application in humic acid removal. *In American Institute of Chemical Engineers, Proceedings of the Annual Meeting*.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., & Waldron, K.C. (2006). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 37, 790-802.
- Monteiro, O.A., & Airoidi, C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(2), 119-128.
- Mukherjee, M.D., Solanki, P.R., Sumana, G., Manaka, T., Iwamoto, M., & Malhotra, B. D. (2014). Thiol modified chitosan self-assembled monolayer platform for nucleic acid biosensor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(3), 1201-1213. doi:10.1007/s12010-014-1177-7
- Musale, D.A., & Kumar, A. (2000). Effects of surface crosslinking on sieving characteristics of chitosan/poly (acrylonitrile) composite nanofiltration membranes. *Separation and purification technology*, 21(1), 27-37.
- Pereda, M., Dufresne, A., Aranguren, M.I., & Marcovich, N.E. (2014). Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1018-1026.
- Public Health Agency of Canada. 2011. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods.
- Public Health Agency of Canada. 2015. Statistics: Food Recall Incidents.

<http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-safety-system/food-recalls-incidents/eng/1348756225655/1348756345745>

Rubentheren, V., Ward, T.A., Chee, C.Y., & Nair, P. (2015). Physical and chemical reinforcement of chitosan film using nanocrystalline cellulose and tannic acid. *Cellulose*, 22(4), 2529-2541.

Salmieri, S., Khan, R.A., Safrany, A., & Lacroix, M. (2015). Gamma rays-induced 2-hydroxyethyl methacrylate graft copolymerization on methylcellulose-based films: Structure analysis and physicochemical properties. *Industrial Crops and Products*, 70, 64-71.

Seuryneck-Servoss, S.L., Baird, C.L., Rodland, K.D., & Zangar, R. C. (2007). Surface chemistries for antibody microarrays. *Frontiers in Bioscience*, 12(8-12), 3956-3964.

Sharmin, N., Khan, R.A., Salmieri, S., Dussault, D., & Lacroix, M. (2012). Fabrication and characterization of biodegradable composite films made of using poly (caprolactone) reinforced with chitosan. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(3), 698-705.

Shu, X.Z., & Zhu, K.J. (2002). The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54, 235-243.

Srinivasa, P., Ramesh, M., & Tharanathan, R. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food hydrocolloids*, 21(7), 1113-1122.

Thomas, M.K., Vriezen, R., Farber, J.M., Currie, A., Schlech, W., & Fazil, A. (2015). Economic cost of a *Listeria monocytogenes* outbreak in Canada, 2008. *Foodborne pathogens and disease*, 12(12), 966-971.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology advances*, 28(2), 232-254.

Wang, H., & Roman, M. (2011). Formation and properties of chitosan- cellulose nanocrystal polyelectrolyte- macroion complexes for drug delivery applications. *Biomacromolecules*, 12(5), 1585-1593.

- Wang, D.A., Williams, C.G., Yang, F., & Elisseeff, J.H. (2004). Enhancing the Tissue-Biomaterial Interface: Tissue-Initiated Integration of Biomaterials. *Advanced functional materials*, 14(12), 1152-1159.
- World Health Organization (WHO). (2014). WHO estimates of the global burden of diseases. WHO, 46(3), 1-15.
- Yoo, S.M., & Lee, S.Y. (2016). Optical Biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 7-25.
- Zhou, C., & Wu, Q. (2012). Recent development in applications of cellulose nanocrystals for advanced polymer-based nanocomposites by novel fabrication strategies. *Nanocrystals-synthesis, characterization and applications*, 103-120.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V., & Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 2159-2165.
- Zoppe, J.O., Peresin, M. S., Habibi, Y., Venditti, R. A., & Rojas, O. J. (2009). Reinforcing poly (ϵ -caprolactone) nanofibers with cellulose nanocrystals. *ACS applied materials & interfaces*, 1(9), 1996-2004.

Figure captions

Figure 1: Molecular structures of components using for the development of the CCG membrane as antibodies immobilization support.

Figure 2 FTIR spectra of the m-CCG membrane and pure film components. **a:** Effect on the composition of the m-CCG membrane; **b:** Effect of the cross-linking treatments and antibody immobilization; **c:** Zoom of the 1700-1500 cm^{-1} region.

Figure 3: Micrographs of the m-CCG membrane as affected by the addition of CNCs at 100 \times magnification. **a:** Membrane without CNCs (control); **b:** Membrane containing CNCs at low concentrations (0.2-0.3% w/v); **c:** Membrane containing CNC at high concentrations (0.5- 0.6% w/v). **1:** SEM images; **2:** Images showing film haze and transparency.

Figure 4: Diagnostic plot of the experiment in Box-Behnken RSM for the efficiency of antibody immobilization in function of CNC concentration, quantity of CCG suspension per well and incubation time.

Figure 5: Three-dimensional contour plot of the optimal concentration of CNC (0.6%) on the immobilization efficiency onto the m-CCG membrane, in function of the immobilization time ($T_{\text{im mAb}}$, h) and the quantity of CCG suspension per well (quantity per well, g).

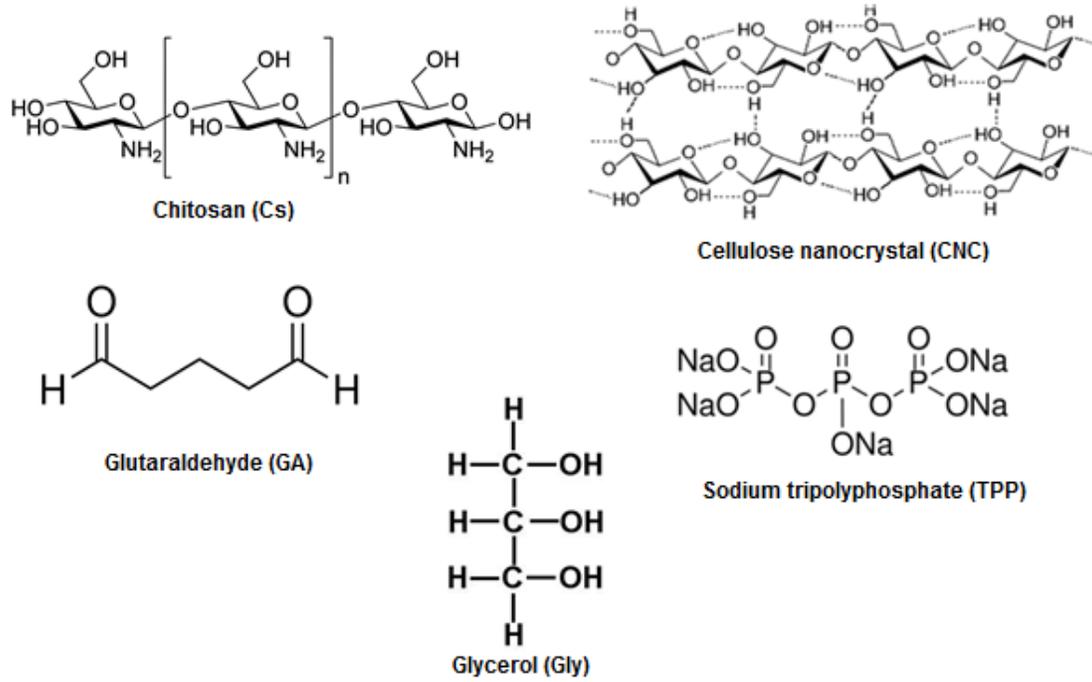
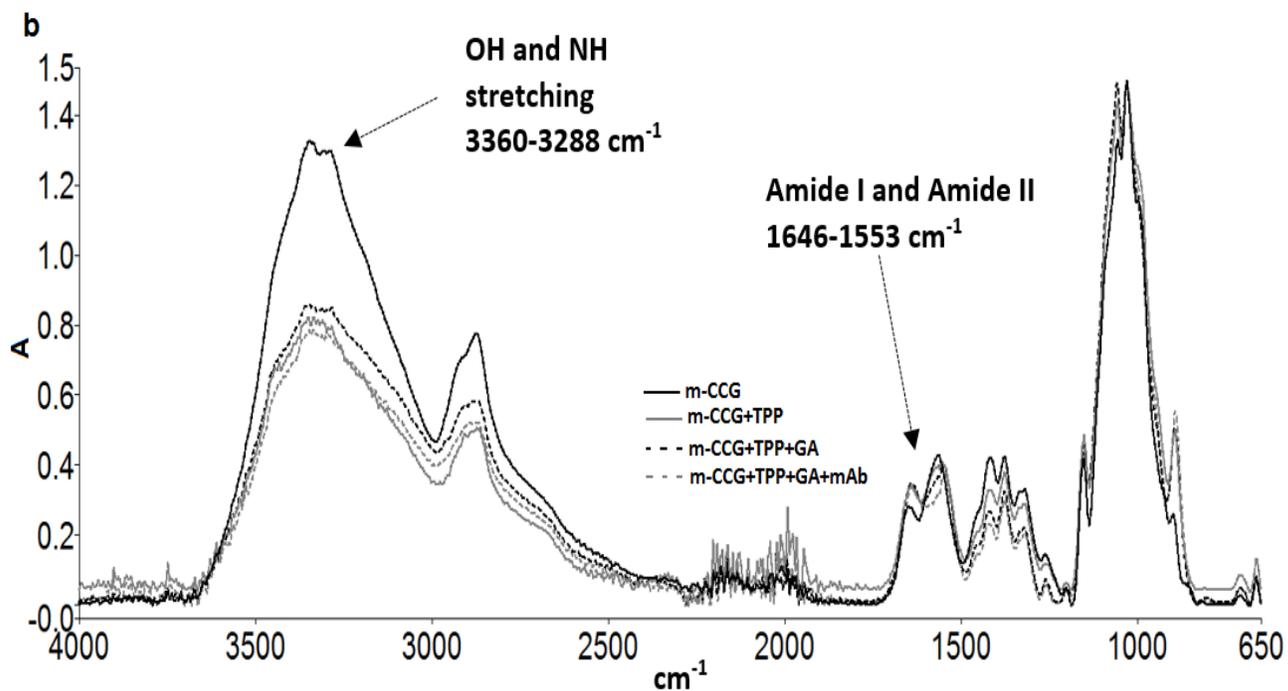
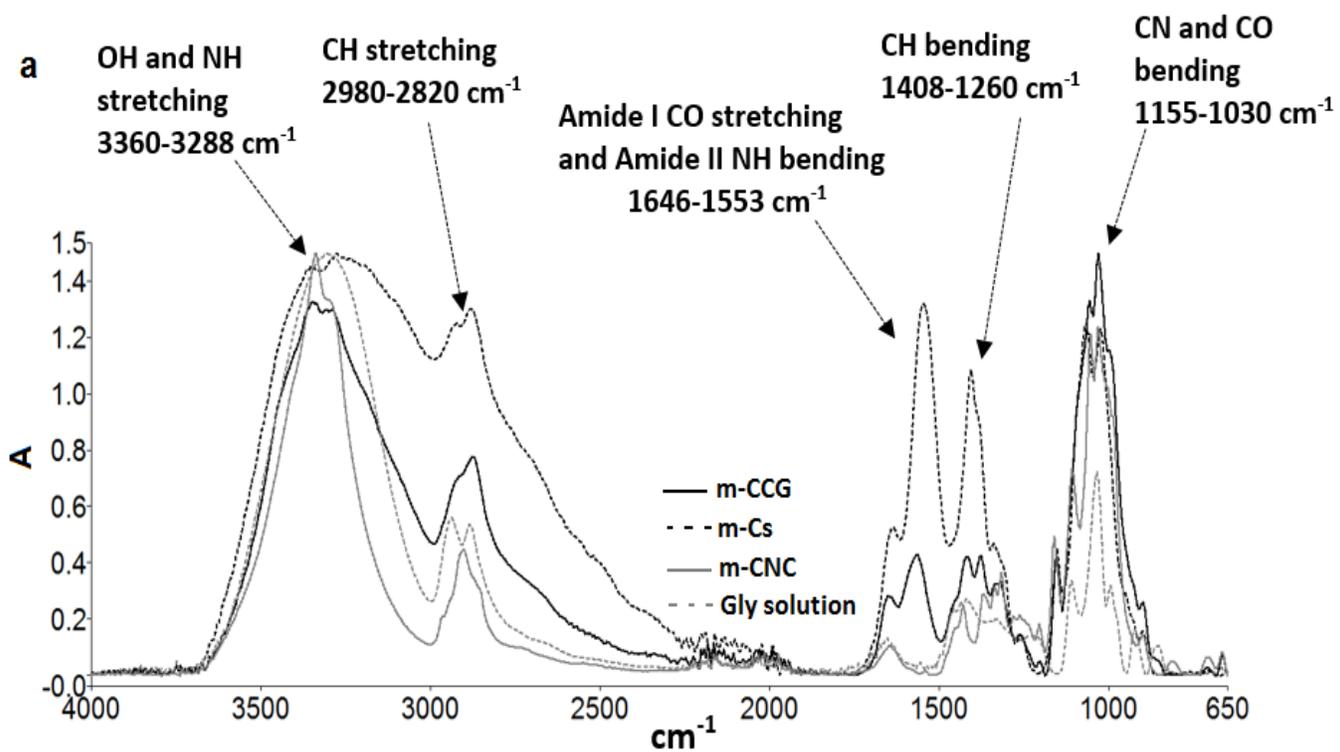


Figure 1.



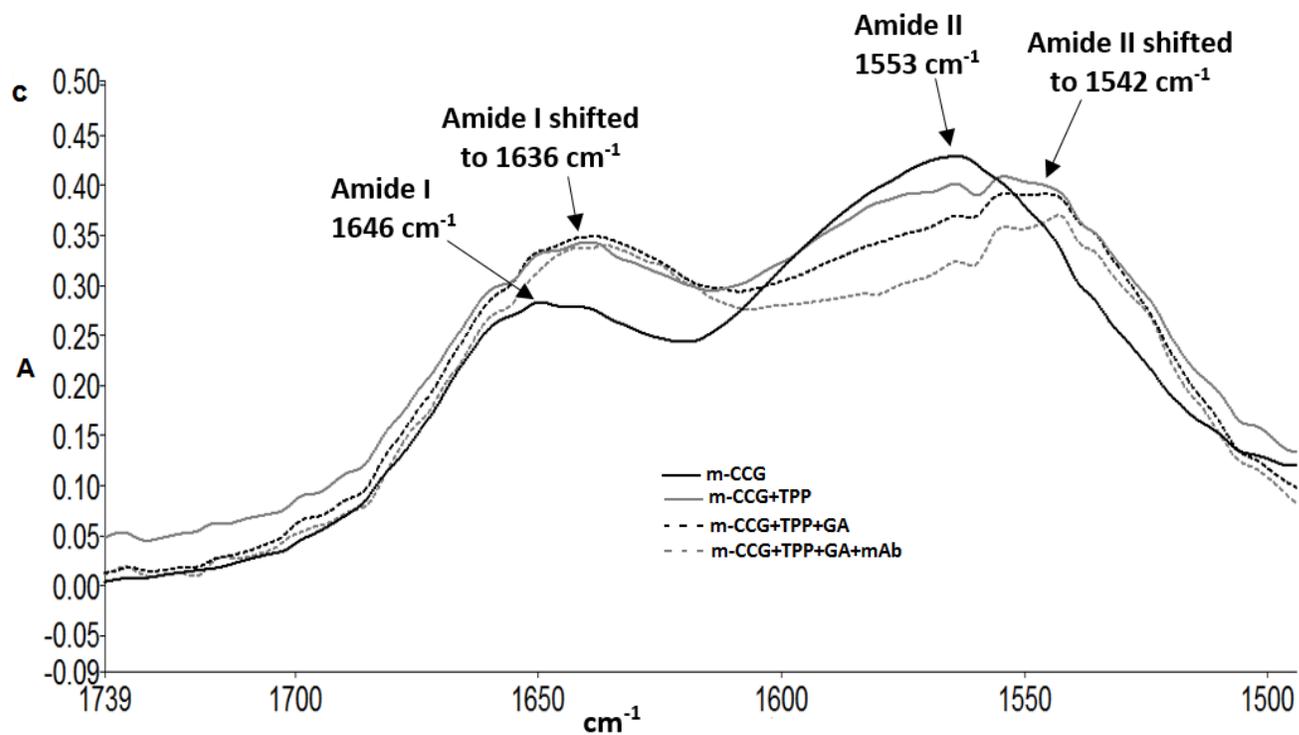


Figure 2.

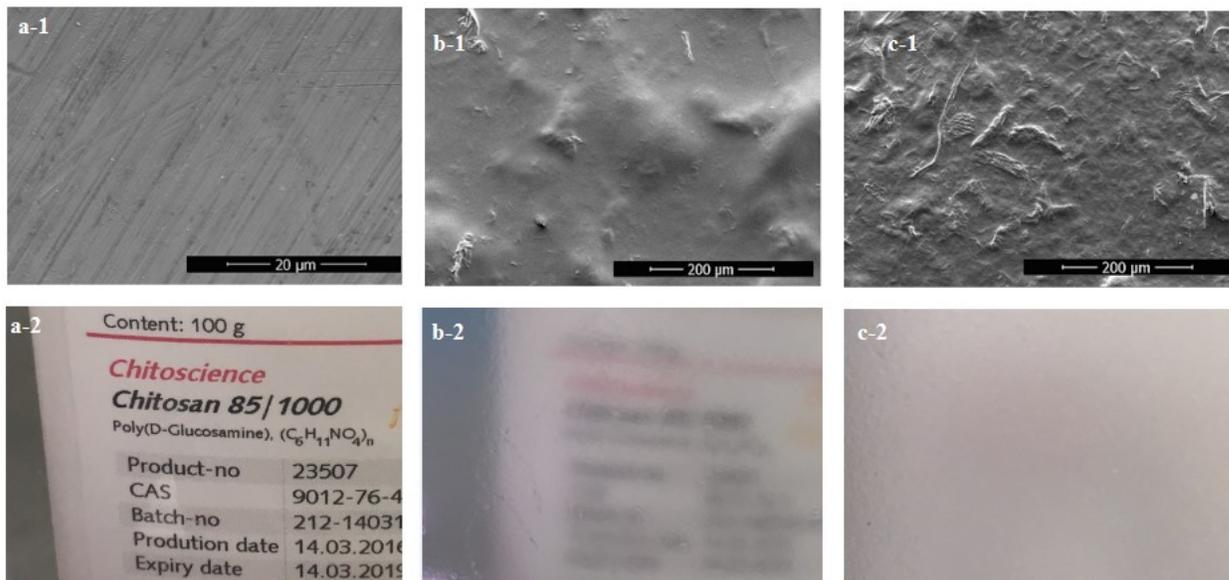
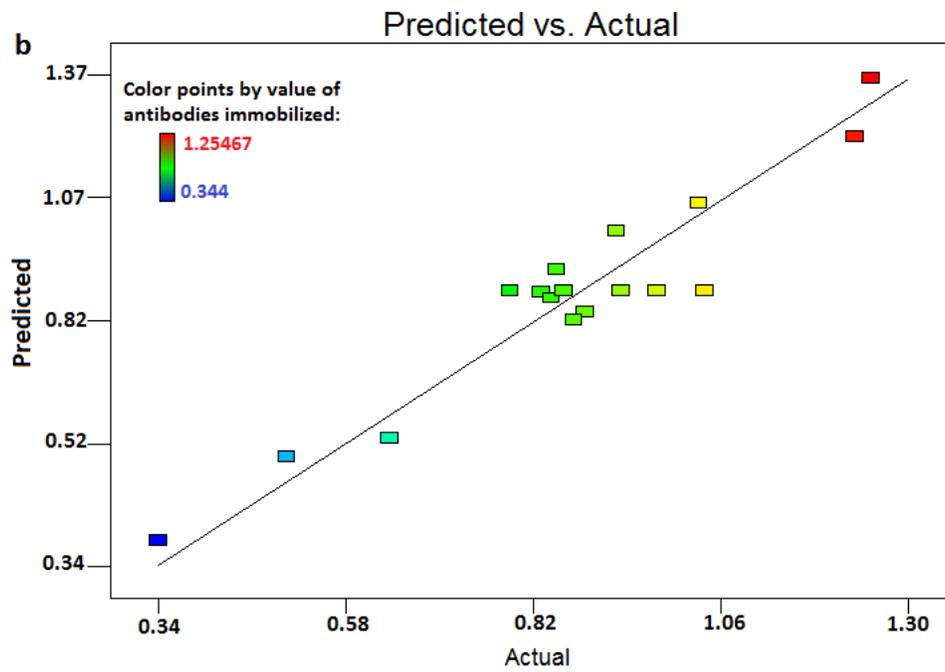
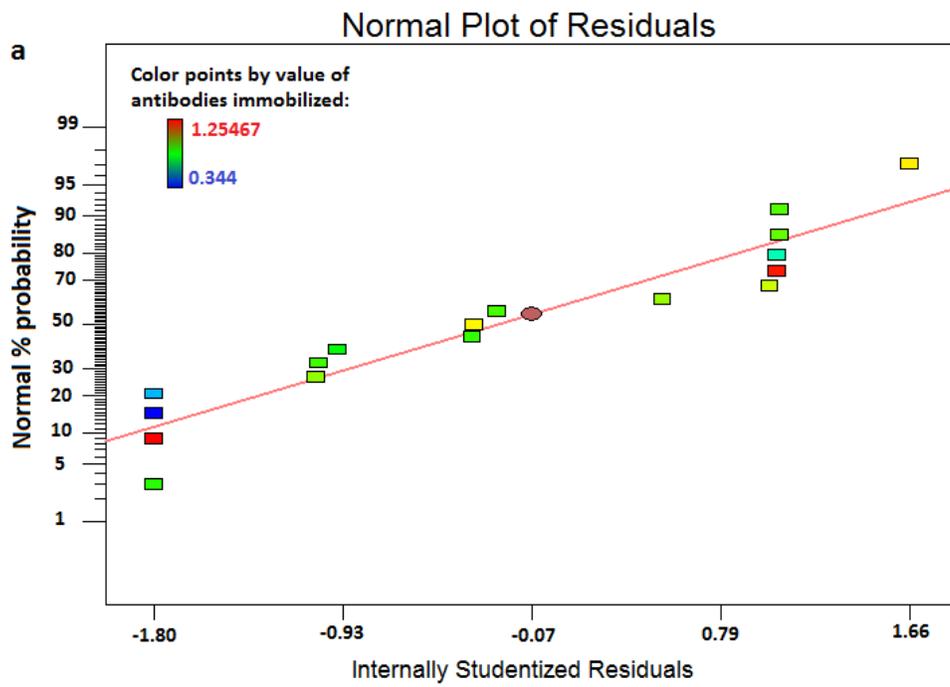


Figure 3.



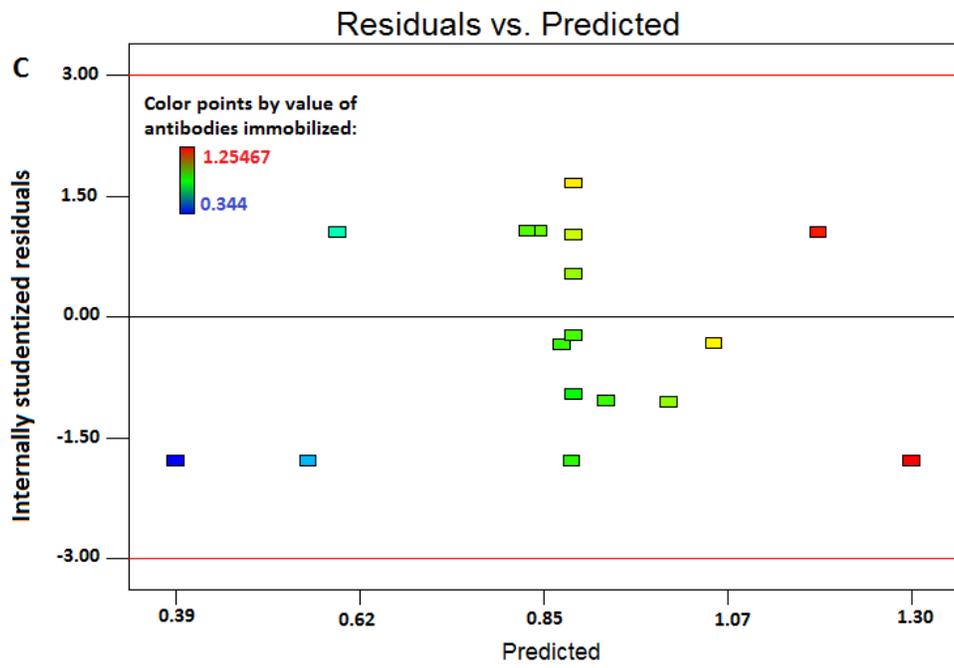


Figure 4.

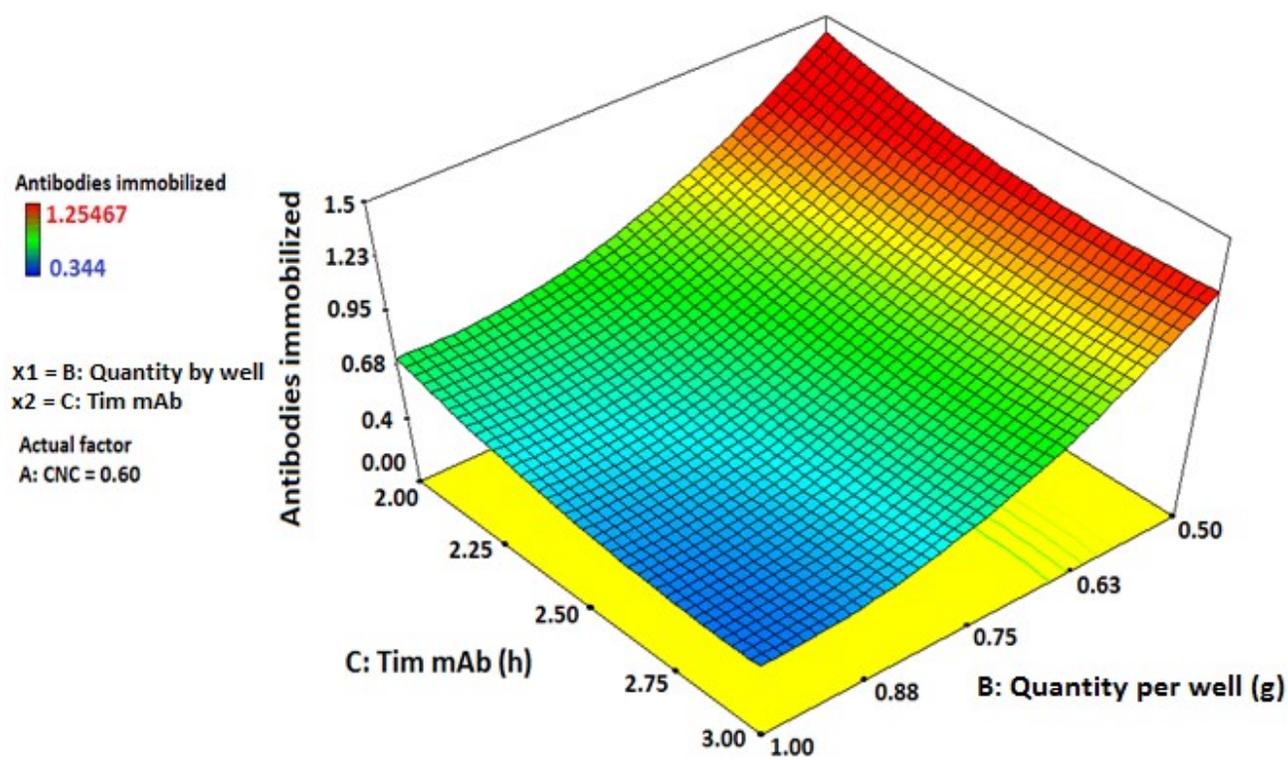


Figure 5.

Table 1. Statistical analysis of the immobilization efficiency onto m-CCG membrane experimental results, using a 2⁶ factorial design

Source	Mean Square	F Value	p-value Prob > F^a	Confidence levels (%)
Model	0.13	8.00	< 0.0001	-100
A-CNC	0.07	3.97	0.0540	95
B-Anti-PepD mAb	0.01	0.88	0.3533	65
C-Quantity per well	1.35	80.54	< 0.0001	-100
D-TPP	5,00E-06	3,00E-04	0.9868	1
E-GA	3,00E-03	0.19	0.6645	34
F-Tim mAb	2.68	160.08	< 0.0001	-100
Std. Dev.	Mean	C.V.%	R²	R_{Adj}²
0.13	0.80	16.20	0.93	0.82

Std. Dev: Standard deviation. ^a: p-value ≤ 0.005 is significant.

Table 2. Experimental results obtained in indirect ELISA for the optimization of the immobilization efficiency on the m-CCG membrane, using Box-Behnken design

Trial	Parameters			Efficiency of mAb immobilized		
	A: CNC (%)	B: Quantity per well (g)	C: Tim mAb (hours)	Absorbance Experimental Value	Absorbance Predicted Value	Residual
1	0.3	0.75	2.5	0.94±0.07	0.88	0.05
2	0.3	0.75	2.5	1.04±0.10	0.88	0.16
3	0.3	0.75	2.5	0.98±0.11	0.88	0.097
4	0.0	0.75	3.0	1.23±0.13	1.19	0.048
5	0.6	1.00	2.5	0.51±0.04	0.56	-0.048
6	0.3	0.50	3.0	1.03±0.10	1.06	-0.023
7	0.6	0.50	2.5	1.25±0.04	1.30	-0.048
8	0.6	0.75	2.0	0.88±0.06	0.83	0.048
9	0.6	0.75	3.0	0.64±0.07	0.59	0.048
10	0.3	0.75	2.5	0.86±0.03	0.88	-0.022
11	0.3	1.00	2.0	0.85±0.03	0.87	-0.024
12	0.3	0.50	2.0	0.93±0.12	1.00	-0.073
13	0.0	0.50	2.5	0.83±0.08	0.88	-0.048
14	0.0	1.00	2.5	0.34±0.04	0.39	-0.048
15	0.3	0.75	2.5	0.79±0.01	0.88	-0.091
16	0.0	0.75	2.0	0.89±0.05	0.84	0.048
17	0.3	1.00	3.0	0.85±0.06	0.93	-0.072

^a: mAb: monoclonal antibodies. ^b: Each experiment was performed in triplicate (n = 3).

Table 3. Statistical analysis of the experimental results for the optimization of the immobilization efficiency onto m-CCG membrane, using Box-Behnken design

Source	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F ^a	Confidence level (%)
Model	9	0.083	7.72	0.0067	99.3
A-CNC	1	0.086	7.91	0.0260	97.4
B-Quantity per well	1	0.018	1.62	0.2433	75.7
C-Tim mab	1	6.2 x 10 ⁻³	0.57	0.4750	52.5
AB	1	0.017	1.53	0.2564	74.4
AC	1	0.084	7.77	0.0270	97.3
A²	1	0.044	4.04	0.0844	91.6
C²	1	0.026	2.43	0.1627	83.7
A²B	1	0.12	10.91	0.0131	98.7
AC²	1	0.18	16.50	0.0048	99.5
Residual	7	0.011			
Lack of Fit	3	0.012	1.30	0.3902	61.0
Pure Error	4	9.6x10 ⁻³			
Cor Total	16	0.083			
	Std. Dev.	Mean	C.V.%	R²	R_{Adj}²
	0.10	0.87	11.90	0.91	0.80

Df = degree of freedom; Std. Dev: Standard deviation. Cor total: Total sum of squares corrected for the mean. ^a: p-value ≤ 0.005 is significant.

Table 4. Evaluation of the predicted model on the experimental value obtained for the immobilization efficiency on the m-CCG membrane, in function of the time of antibody immobilization.

Value of parameter tested			Response: Antibodies immobilized		Residual	Standard deviation	Mean
CNC (%) ^a	Quantity per well (g) ^a	Time (h)	Experimental value ^b	Predicted value			
0.6	0.5	2.0	1.24±0.09	1.21	0.03	0.02	1.22
0.6	0.5	2.5	1.07±0.08	1.25	-0.18	0.13	1.16
0.6	0.5	3.0	0.64±0.07	0.97	-0.33	0.23	0.80

^a: Value of the optimized component of the membrane CCG. ^b: Each experiment was performed in triplicate (n = 3).

Table 5. Effect of the concentration of CNC (%) on the mechanical properties (TS, TM, Eb) of the m-CCG membrane.

CNC concentration (% CCG suspension)	CNC concentration (% polymer dry mass)	Tensile strength (TS) MPa^a	Tensile modulus (TM) MPa^a	Elongation at the break (Eb) in %^a
0	0	32±2	1385 ±122	18.3 ±2.9
0.2	10	54±2	2434 ±197	16.9 ±0.7
0.3	15	56±1	2515 ±205	13.0 ±2.9
0.4	20	60±3	3119 ±428	12.2 ±0.4
0.6	30	60±1	3393 ±217	11.5 ±1.1

^a: Each experiment was performed in triplicate (n = 3).

ues.

Article 3

Development of a support based on chitosan and cellulose nanocrystals for the rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* p60 protein using anti-PepD monoclonal antibodies.

Part B: Detection of *Listeria monocytogenes* from environmental samples in contact with minced pork

Marie-Christine Etty ^a, Sabato D'Auria^b, Stephane Salmieri^a, Carole Fraschini^c,
Monique Lacroix^{a*}

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Centre, Nutraceutical Institute and Functional Foods, 531 boulevard des Prairies. Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7.

^b Institute of Food Science -CNR, Laboratory for Molecular Sensing, Via Roma, 64 111. 83100 Avellino, Italy

^c FPIInnovations, 570 boulevard Saint-Jean, Pointe-Claire, Quebec, Canada, H9R 3J9.

*Corresponding author. E-mail: monique.lacroix@iaf.inrs.ca. Tel: 450-687-5010 #4489. Fax: 450-686-5501.

Contribution des auteurs:

Marie-Christine Etty : étudiante, a réalisé les expériences et la rédaction de l'article.

Sabato d'Auria : Co-directeur de recherche, a participé à l'élaboration des protocoles de recherche et correction de l'article.

Carole Fraschini : Professeure invitée de l'INRS, a participé à la correction de l'article.

Stephane Salmieri : Assistant de recherche, a participé à la correction de l'article.

Monique Lacroix : Directrice de recherche, responsable scientifique et coordinatrice du projet, a participé à l'élaboration des protocoles, aux discussions sur les résultats des expériences et à la correction de l'article.

Abstract

This paper presents the application of a new support based on chitosan and reinforced with cellulose nanocrystals (m-CCG) for the detection of *L. monocytogenes* p60 protein in sandwich ELISA by an anti-pepD monoclonal antibody. This support consists of biopolymer membrane optimized for the covalent immobilization of the specific monoclonal antibodies against the unique short peptide of eleven amino acids (PepD, QQQTAPKAPTE) of *L. monocytogenes* p60 protein (anti-PepD mAb). Using the optimized immobilization method of anti-PepD mAb on m-CCG (m-CCG + anti-PepD mAb), the detection via sandwich ELISA of *L. monocytogenes* culture was improved by 17% in Tryptic soy broth and by 24% in Listeria enrichment broth containing 0.5% of dextrose (modified LEB) on m-CCG compared to standard ELISA support. Moreover, the evaluation of the selectivity of detection of *L. monocytogenes* by anti-PepD mAb immobilized on m-CCG allowed the absence of any cross-reaction between the support and the nine other bacteria commonly found in food environment. Finally, the application of m-CCG on an environmental sample in contact with minced pork previously inoculated with *L. monocytogenes* (10^2 CFU/mL) demonstrated that at this level of contamination, the p60 protein can be specifically detected after only a direct selective enrichment of 48h in modified LEB compared to double enrichment before other accredited methods of immunological detection of *L. monocytogenes* and without any effect of the sample matrix on the detection of the p60 protein.

Key words:

Chitosan, cellulose nanocrystals, antibodies immobilization, p60 protein, *L. monocytogenes*, sandwich ELISA, environmental sample.

Résumé

Cet article présente l'application d'un nouveau support à base de chitosane et renforcé avec des nanocristaux de cellulose (m-CCG) pour la détection de *L. monocytogenes* en ELISA en sandwich par les anticorps monoclonal anti-protéine p60. Ce support est une membrane à base de biopolymères optimisée pour l'immobilisation covalente des anticorps monoclonaux spécifiques contre un court peptide de onze acides aminés (PepD, QQQTAPKAPTE) unique à la protéine p60 de *L. monocytogenes* (mAb anti-PepD). Grâce à l'utilisation de la méthode optimisée d'immobilisation de mAb anti-PepD sur m-CCG (m-CCG + mAb anti-PepD), la détection en ELISA sandwich de la culture de *L. monocytogenes* a été améliorée de 17% dans le bouillon Tryptic de soja et de 24% dans le bouillon Listeria enrichment broth contenant 0,5% de dextrose (LEB modifié) sur m-CCG par rapport au support standard d'ELISA. De plus, l'évaluation de la sélectivité de détection de *L. monocytogenes* par les mAb anti-PepD immobilisés sur m-CCG permet de montrer l'absence de réaction croisée entre le support et les 9 autres bactéries ciblées dans l'environnement alimentaire. Finalement, l'application de m-CCG sur un échantillon environnemental en contact avec la viande de porc haché faiblement contaminée par de *L. monocytogenes* (10^2 UFC/mL) montrent que à ce niveau de contamination, la protéine p60 peut être détectée spécifiquement après un unique enrichissement sélectif de 48h dans LEB modifiée comparativement au double enrichissement utilisée pour les méthodes de détection immunologique accréditées pour *L. monocytogenes* et ce, sans aucun effet de la matrice d'échantillon sur la détection de la protéine p60.

Mots-clés : Chitosane, Nanocristaux de cellulose, immobilisation des anticorps, protéine p60, *Listeria monocytogenes*, ELISA en sandwich, Échantillon environnementale.

1. Introduction

Listeria monocytogenes is one of the most important foodborne pathogens in the world (World Health Organization, 2014). In Canada for example, it is the most prevalent cause of mortality rate by year (34%) associated with foodborne illnesses due to pathogenic bacterial contamination (Canadian Food Inspection Agency, 2016). This bacterium is the causative agent of listeriosis, a disease mainly manifested by febrile gastroenteritis, meningitis, spontaneous abortion and typhoid listeriosis (Lopez, 2008; Canadian Food Inspection Agency, 2011a). The infectious dose to have this fatal illness is 10^3 CFU/mL of *L. monocytogenes* in food products and the industrial environment (Canadian Food Inspection Agency, 2011a). An important outbreak of *L. monocytogenes* in Canada happened in 2008 with 24 deaths and the global cost (government, affected individuals, industry, etc.) was nearly 242 million of Canadian dollars (\$ CAD) (Thomas et al., 2015). This outbreak and many recent recalls of food products associated to *L. monocytogenes* in 2016 (nearly 40 recalls) shows that the inability of current methods of detection to reduce the cases of the illnesses and deaths as well as the cost associated to this pathogen (Canadian Food Inspection Agency, 2016). Moreover, Ivanek et al. (2004) reported that the annual cost of *L. monocytogenes* food safety in the important firms could be estimated between \$0.01 billion to \$2.4 billion. The main flaw of the official method is the long time of the enrichment step of *L. monocytogenes* before the detection (Lopez, 2008; Bouguelia, 2012). Depending on the initial concentration of *L. monocytogenes*, the enrichment step can take for current traditional methods (growth media) between 1 to 7 days to see a visible colony in agar or bacterial growth in culture media. For the rapid methods using molecular and immunological tests, the enrichment step is between 18h to 72h for enrichment before the detection step (Lopez, 2008; Bouguelia, 2012). This is problematic for products potentially contaminated with *L. monocytogenes* (meat, vegetable, ready to eat foods) which have a short shelf life (between 2 to 5 days) (Canadian Food Inspection Agency, 2011b). These delays of the analysis represent health and economic risks for the industry which has the obligation to

put these short shelf life products early on the market with a possible contamination of *L. monocytogenes* (Bouguelia, 2012; Carpentier & Cerf, 2011). To solve this, recent research focused on the development of biosensor methods allowing detection in real time of *L. monocytogenes* during its growth (Bouguelia, 2012; Hearty et al., 2006). These methods show the feasibility to detect specifically and in real time *L. monocytogenes*, but in certain cases of biosensor technologies, such as surface plasmon resonance (SPR), they are not simple to use and expensive (Bouguelia, 2012; Hearty et al., 2006). For this reason, this paper presents the application of a potential support of detection for a simple and rapid immuno-sensing assay of *L. monocytogenes* from an environmental sample during bacterial growth (Etty et al., 2017a; Etty et al., 2017b). Environmental samples were selected because the products were contaminated generally during their process of fabrication where the product surface was in certain case the source of the cross-contamination (Carpentier & Cerf, 2011). The immuno-sensing method is based on biosensor technology with an antibody immobilized on the solid-state surface as a bioreceptor to detect a ligand. The resulting detection is converted or revealed by a transducer which can be optical or electro chemical for example (Yoo & Lee, 2016; Velusamy et al., 2010). The bioreceptor and the revelation approach define the type of biosensor developed. In this work, the technology developed is an optical immune-sensor using colorimetry as revelation method. Moreover, the immune-sensing developed was based on the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Velusamy et al., 2010). This immunoassay allows having a better specificity and sensitivity of detection (2 to 5 times higher) (Beauchamp, 2012a). It is also selected because the method can be easily modified, is simple to use and accessible to a wide range of targets on the same pathogen (cell, toxins, proteins, peptides, etc.). The principle of the sandwich ELISA requires two antibodies: the primary antibody is the bioreceptor used to capture the antigen; followed by detection of the antigen captured by a second antibody (antibody of detection). In this project, the bioreceptor was a monoclonal antibody directed against a short peptide D (PepD) of *L. monocytogenes* p60 protein and the antibody of the detection was a polyclonal antibody against the

same protein (Beauchamp, 2012a). The p60 protein of *L. monocytogenes* as an antigen in sandwich ELISA is a suitable target because it is a surface protein essential for the cell viability of all *Listeria* species and possesses a bacteriolytic activity (Beauchamp et al., 2012b; Wuenscher et al., 1993; Faith et al., 2007). It is also suitable for the specific detection of *Listeria monocytogenes* due to the presence of a small sequence of eleven amino acid called peptide PepD (QQQTAPKAPTE) unique for the p60 protein of *L. monocytogenes* (Beauchamp et al., 2012b). Thus, in the first part of this work, the membrane based on chitosan, cellulose nanocrystal and glycerol (m-CCG) (Khan et al., 2012) was optimized for the immobilization monoclonal antibody against the p60 protein of *L. monocytogenes* (Etty et al., 2017a). Development of a support such as m-CCG for an efficient immune-sensing depends on three conditions (Seurynck-Servoss et al., 2007; Emaminejad et al., 2015). These are a) a sufficient surface area available on the support for antibody immobilization; b) a stable attachment of antibodies and their bioactivity after immobilization to allow an efficient detection and to reduce nonspecific interactions which affect the selectivity of detection; and c) the control of antibody orientation during the immobilization on the support to allow the accessibility of the binding site of the antibody immobilized (antigenic binding fragment, Fab). We have previously reported that with a treatment of glutaraldehyde on CCG membrane, it is possible to immobilize covalently the monoclonal antibodies anti p60 protein on m-CCG via the available amine groups present at the surface of m-CCG and anti-PepD mAb. This covalent interaction between the antibodies and the m-CCG can lead to two possible orientations of antibodies immobilized (Figure 1) which can affect the efficiency of anti-PepD mAb as bioreceptor: lysine residues on the fragment crystallizable (Fc) region (Fig. 1a) or sites located in the heavy chain of the antigen binding fragment (Fab). The link in the Fc region promotes the accessibility of the two arms of the antigen binding fragment (Fab), contrariwise to the second site in the Fab (Fig 1b). The covalent link in the Fab region is disadvantageous for the recognition of the antigen because it promotes an orientation of the antibody on the support which compromises efficient accessibility of the antigen binding fragment (Fab) for its antigen.

Therefore, the aim of this paper was to present the second part of the work which consisted of evaluating the efficiency of the antibody immobilized on m-CCG as an immune-sensor platform for the rapid, specific and colorimetric detection of *Listeria monocytogenes* from environmental samples in contact with food (Etty et al., 2017a). This work was also performed to evaluate the bioactivity of the antibody, the accessibility of the binding site of antigen on the antibody (Fab) and the selectivity of detection affected by the non-specific reaction.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

L. monocytogenes HPB 2812 (serotypes 1/2a) from Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) was used for the detection test of *L. monocytogenes* in sandwich ELISA. For cross-reactivity monitoring, five Gram-positive and five Gram-negative bacteria were tested. The Gram-positive bacteria were *Listeria innocua* LSPQ 3285 (non-pathogenic *Listeria* species), *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The Gram-negative bacteria were *Pseudomonas putida* V376, *Pseudomonas fluorescens* CDRA V317, *Salmonella* SL1344, *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* ATCC 25922. Sub-cultures of all these strains were done in Tryptic Soy Broth (TSB, Alpha BioSciences Inc., Baltimore, MD, USA) for 24 h at 37°C. A new inoculation of 1mL of their sub-cultures in 9 mL of TSB and *Listeria* enrichment broth containing 0.5% of dextrose (modified LEB) was also done and incubated 18 h at 37°C. Modification of LEB was done in a previous study to improve the expression of the p60 protein of *L. monocytogenes* in a selective enrichment medium (Etty et al., 2017b).

2.2. Preparation of the CCG membrane

CCG membrane (m-CCG) based on chitosan, cellulose nanocrystal and glycerol was developed and optimized by Etty et al. (2017b). In the first step, 0.6 % of cellulose nanocrystal (CNC) powder (FPInnovations Inc, Pointe-Claire, QC,

Canada) were suspended in water (w/v) overnight at room temperature. The suspension was then mixed and sonicated with 1% (v/v) of glacial acetic acid (AA; Laboratoire Mat, Beauport, QC, Canada) with QSonica Sonicator (Fisher Scientific, Ottawa, QC, Canada) for 1kJ/gram of CNC. After that, in the second step, 2% (w/v) of chitosan powder (Cs) (HMC+, 85% deacetylated, M_w 1 kDa; Heppe Medical Chitosan, Saale, Germany) was added to the CNC-AA mixture. The dissolution of chitosan powder in CNC/AA blend was performed at room temperature and under strong shaking with RW20 digital mixer (Fisher Scientific) for 2h. Then, 0.6% (v/v) of glycerol (Gly, Laboratoire Mat) was added to the CNC-AA-Cs mixture and the suspension obtained was then mixed again 1h to ensure complete dissolution. Then, the polymer blend of CNC-AA-Cs-Gly (CCG suspension) was degassed under vacuum overnight. Finally, 0.5g of degassed CCG suspension was casted in each well of 24-wells microplate (untreated, flat bottom; Sarstedt, Montreal, QC, Canada). Drying of the CCG suspension in the microplate was done at room temperature and followed by water evaporation until weight stabilization (3 to 5 days). The m-CCG obtained in microplates were stored at room temperature.

2.3. Production of the recombinant p60 protein and the anti-PepD monoclonal antibody

The peptide D (QQQTAPKAPTE, accession number AEO02672 in the NCBI protein database) unique to p60 protein of *L. monocytogenes* was synthesized by stepwise solid-phase peptide synthesis (SPPS), purified and coupled with an additional N-terminal cysteine residue the aim to produce immune response in five Balb/c mice. The result of this immune response was the production of the specific mouse anti-PepD monoclonal antibody protein of *L. monocytogenes* (anti-PepD mAb) (GenScript Inc., Piscataway, NJ, USA) was produced toward the p60 protein synthesized (Beauchamp et al., 2012b). Rabbit anti-PepD polyclonal antibody protein was also carried out with this same method in rabbit by GenScript Inc (NJ, USA) as antibody of detection after the specific capture of the p60 protein of *L.*

monocytogenes. Finally, the positive control called recombinant p60 protein was produced in the pUC57 DNA plasmid transformed into competent *E. coli* BL21 (DE3) and purified using the nickel column (GenScript Inc., Piscataway, NJ, USA) (Beauchamp et al., 2012b).

2.4. Crosslinking methods for the antibody immobilization onto the membrane

In the first step of the crosslinking method, 500 μ L of sodium tripolyphosphate (TPP) (5% (w/v)) (Sigma Aldrich, ON, Canada) was used for the insolubilization of m-CCG. The reaction was performed during 10 minutes under shaking (80 rpm) at room temperature followed by three washing steps with 1.5 ml of distilled water. Then, the crosslinking method was performed in two parts. In the first part, the amine group of the m-CCG was linked to the aldehyde groups of glutaraldehyde (300 μ L of GA, 0.2% (v/v)) (Sigma Aldrich) during 30 minutes at room temperature under shaking (80 rpm). Three washing steps with 1.5 ml of distilled water were carried out. In the second step, the free aldehyde group added on the m-CCG was linked to the amine group of the mouse anti-PepD monoclonal antibody (anti-PepD mAb) (300 μ L, 10 μ g/mL (p/v), GenScript Inc.). This second crosslinking reaction was performed during 2h under shaking (80 rpm) and at room temperature followed by three washing of 10 minutes and two washing of 5 minutes with phosphate saline buffer with 0.05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) under shaking.

2.5. Detection of *L. monocytogenes* p60 protein in sandwich ELISA support

The optimized CCG membrane contained in 24-well polystyrene microplates (Sarstedt, ON, Canada) used for the immobilization of the anti-PepD monoclonal antibodies (m-CCG+ anti-PepD mAb) was compared with the standard method of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used by Coutu et al. (2014) in 96-well polystyrene microplates (microplate, Corning, ON, Canada) for the detection of p60 protein of *L. monocytogenes*.

A quantity of 100 μ L of mouse anti-PepD monoclonal antibodies (8 μ g/mL) was added into each well of a 96 well polystyrene microplate (microplate) and incubated overnight at 4°C. Then, the wells were washed three times 10 minutes

with 250 μ L of phosphate buffer saline supplemented with 0.05% Tween 20 (PBS-T). The blocking steps for the microplate and for m-CCG containing immobilized anti-PepD mAb were performed with bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, ON, Canada) in phosphate buffer saline (PBS) in the aim to block the non-specific binding (NSB) sites. For the microplate, NSB were blocked using 150 μ L of BSA 1% (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature whereas, for a m-CCG, NSB sites were blocked with 1mL of BSA 6% (Sigma-Aldrich) and incubated overnight at 4°C. Both supports of detection were washed once with 250 μ L of PBS-T for the microplate and 1.5 mL for m-CCG. After the washing, each sample (p60 protein of *L. monocytogenes* in TSB, LEB and the recombinant p60 protein (1 μ g/mL (v/v), R-p60) were added on the microplate (100 μ L of R-p60) and on m-CCG+ anti-PepD mAb (300 μ L of R-p60). Incubation was done during 1 h at 37°C followed by the washing step. Three washing steps of 10 minutes with PBS-T were performed for the microplate while for a m-CCG, three washing with PBS-T of 10 minutes and two additional washing of 5 minutes were performed. Then, rabbit anti-p60 polyclonal antibodies (anti-p60 pAb, 2.5 μ g/mL in diluting buffer, PBS-T containing 0.25% BSA) was added onto the microplate (100 μ L of anti-p60 pAb) and on m-CCG (300 μ L of anti-p60 pAb) and the mixture was incubated at 37°C during 1 h. The same three washing steps done for the microplate and the five washing steps done for m-CCG were performed again. Thereafter, secondary anti-rabbit monoclonal antibodies coupled with HRP (sAb-HRP anti-rabbit, Cedarlane, ON, Canada) in the diluting buffer (1/17000) was added for an additional 1h of incubation at 37°C on the microplate (100 μ L of sAb-HRP anti-rabbit) and m-CCG (300 μ L of sAb-HRP anti-rabbit). Revelation step was done by adding of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (detection substrate, TMB, Fisher Scientific, ON, Canada) and H₂SO₄ 2M (v/v) (to stop the enzymatic reaction) on the microplate and m-CCG after respectively three and five washing steps with PBS-T. For the microplate, a volume of 100 μ L of TMB and 50 μ L of H₂SO₄ were used while for m-CCG, 200 μ L of TMB and 100 μ L of H₂SO₄ were used. Samples were read at 450 nm using a microplate reader BioTek ELx800 (Winooski, VT, USA) equipped with the software Gen5.

The formula used for the calculation of the rate of increasing of p60 protein detected during the bacterial growth on m-CCG compared to the microplate is shown below:

$$\text{Improvement rate difference (\%)} = \frac{(\text{Abs for m-CCG} - \text{Abs for microplate})}{(\text{Abs for m-CCG} + \text{Abs for microplate})} \times 100$$

2.6. Sampling procedures for the environmental samples containing *L. monocytogenes*

Sampling was performed according to Canada procedures for food and environmental samples (Canadian Food Inspection Agency, 2013; Lahou and Uyttendaele 2014). A sterile surface of 900 cm² (30 cm x 30 cm) of stainless steel was used for the environmental sampling. 25 g of minced pork were used to perform the contamination of the stainless steel with food samples containing *L. monocytogenes*. The contaminated minced pork was previously irradiated at 45 kGy using underwater irradiation at the Irradiation center of Canada (Nordion Inc., Laval, Canada) and at a dose rate of 11.136 kGy per hour.

Serial dilutions (10-fold) of 1 ml of a sub-culture of *L. monocytogenes* in TSB was performed in 0.1% peptone water (w/v) (Alpha BioSciences Inc., Baltimore, MD, USA) prior to spreading (200 µL) in triplicate onto Palcam agar (Alpha BioSciences Inc.) plates. The Palcam agar plates inoculated were incubated at 37°C for 48 h. The number of viable bacteria (CFU/mL) in the sub-culture was determined from the colonies grown on Palcam agar plate with the aim to inoculate the minced pork with 10² CFU/mL. The concentration of 10² CFU/mL of *L. monocytogenes* was chosen because it is lower than the infectious dose (10³ CFU/mL) to contract listeriosis. Thus, 0.5 ml of sub-cultured *L. monocytogenes* diluted at 10⁴ CFU/mL was used to inoculate 25 g of minced pork in triplicate for both samples to test a final concentration of 10² CFU/mL in the meat. The minced pork was mixed in order to properly disperse the inoculum of *L. monocytogenes* in the meat. Then, the minced pork containing *L. monocytogenes* was homogeneously distributed on the stainless-steel surface for the environmental sample. The meat was removed from the surface and was used to verify the CFU/mL of *L. monocytogenes* by the

method of serial dilution in peptone water and Palcam agar plate. A swabbing of the contaminated surface was performed with the two faces of dry sponge-stick (3M™, ON, Canada) by “Z” patterns (face 1 the left to the right and face 2 up to down) illustrated in Canada public health methods (Canadian Food Inspection Agency, 2013). The contaminated sponge-stick was introduced into the bag and the stick was broken off by bending movement to allow the sponge to drop into the bag. Finally, according the HPB methods for the microbiological analysis of foods (MFHPB30) (Public Health Agency of Canada, 2011), 100 mL of Listeria Enrichment Broth (LEB, Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) modified with 0.5% of dextrose (Sigma, ON, Canada) was used for the growth of *L. monocytogenes* from the contaminated sponge during 48h at 37°C. Cultures obtained were used to detect *L. monocytogenes* in sandwich ELISA on membrane m-CCG. *L. innocua* LSPQ3285 was also tested for the cross-reactivity using the same procedure.

2.7. Statistical analyses

The experiment was carried out in triplicate. Analyses of variance (ANOVA) for multiple factors and Student *t*-test for 2-independent samples were performed using SPSS software V16.0 and with 95% significance level for each replicate.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the efficiency of the CCG membrane on the detection of *L. monocytogenes* p60 protein

The detection (absorbance, A) of the p60 protein of *L. monocytogenes* in Tryptic soy broth (TSB) and Listeria enrichment broth optimized with 0.5% of dextrose (modified LEB) was performed in sandwich ELISA onto the CCG membrane optimized for the antibody immobilization and on 96-well microplate (microplate) (Fig. 2) (Etty et al., 2017a, b). This test allowed to evaluate the bioactivity of the anti-PepD monoclonal antibodies (anti-PepD mAb) immobilized onto m-CCG for the detection of the p60 protein of *L. monocytogenes*. Results showed that both the p60 protein of *L. monocytogenes* in different media and the positive control (recombinant p60 protein) were detectable ($A_{450\text{nm}} > 0.1$) by anti-PepD mAb

whatever the support of immobilization used (Fig. 2). However, the detection of the p60 protein was higher when anti-PepD mAb was immobilized on m-CCG ($A_{\text{TSB}}=0.65$; $A_{\text{modified LEB}}=0.85$; $A_{\text{positive control}}=1.15$) compared to the immobilization on the microplate ($A_{\text{TSB}}=0.47$; $A_{\text{modified LEB}}=0.52$; $A_{\text{positive control}}=0.60$). In terms of efficiency, the improvement of the detection on m-CCG was of 17% in TSB, 24% in modified LEB and 32% for the recombinant p60 protein of *L. monocytogenes*. This improvement of the detection demonstrated that the optimization of carbon source in LEB (modified LEB) also promote a better detection of *L. monocytogenes* p60 protein on m-CCG than the detection of the p60 in TSB as reported by Etty et al. (2017b) on the standard support. This improvement of the detection also suggested that the accessibility of the Fab region in anti-PepD mAb by the p60 protein was not compromised by the crosslinking methods on m-CCG as compared to antibody immobilization on standard support where a physical adsorption method leads to a random orientation of antibodies (Seurnyck-Servoss et al., 2007). Thus, it is probable that the covalent link formed between the m-CCG and anti-PepD mAb via the glutaraldehyde reaction was mostly located in the Fc region (Fig. 1a) rather than in the Fab region of the anti-PepD mAb (Fig 1b). Seurnyck-Servoss et al. (2007) and Emaminejad et al. (2015) showed that the crosslinking method in the Fc region is suitable to give mechanical advantages of the antibody in ELISA such as robustness and sturdiness and permeability to dissolved solutes. The crosslinking method was also suggested to potentially allow efficient orientation of the antibodies and to conserve the high capacity of binding and the bioactivity of the antibodies (Seurnyck-Servoss et al., 2007; Emaminejad et al., 2015). Thus, all of these results suggested that the CCG membrane is a suitable support for the detection of the p60 protein of *L. monocytogenes* in sandwich ELISA because it seems to improve the efficiency of capture of the antigen by the antibody.

3.2. Evaluation of the immobilization methods on the selectivity of the monoclonal antibodies of capture of the *L. monocytogenes* p60 protein

Sandwich ELISA was used to evaluate the effect of the immobilization methods onto m-CCG on the selectivity of mouse monoclonal antibodies anti-PepD of the p60 protein (anti-PepD mAb) towards *L. monocytogenes* p60 protein (Fig. 3). Results showed that the selectivity of anti-PepD mAb towards *L. monocytogenes* p60 protein was not affected by the immobilization methods on m-CCG whatever the medium used (TSB or modified LEB) (Fig. 3). Indeed, the detection (absorbance, A) of *L. monocytogenes* by the p60 protein was higher ($A_{\text{TSB}}=1.54$; $A_{\text{LEB}}=1.46$) than the detection of the 10 other bacteria tested ($A_{\text{TSB}} \leq 0.22$; $A_{\text{modified LEB}} \leq 0.1$). This level of signal detection is also similar to the positive control, the recombinant p60 protein of *L. monocytogenes* ($A_{\text{recombinant p60 protein}}=1.45$). Moreover, the comparison of results in modified LEB and TSB revealed that the use of anti-PepD mAb immobilized on m-CCG with the modified LEB increases the selectivity of the test of detection compared to TSB. The detection of the non-pathogenic *Listeria sp* as *L. innocua* LSPQ 3285 and the other Gram-positive bacterium as *S. aureus* ATCC 25923 in modified LEB was below the detection limit ($A_{450 \text{ nm}} = 0.1$) while their detection in TSB was above the limit ($A_{\text{TSB}} \sim 0.22$). Therefore, all these observations demonstrated that m-CCG combined with the modified LEB is a suitable support of immobilization for anti-PepD mAb and for the detection of *L. monocytogenes* p60 protein. The specificity of detection is maintained on m-CCG as with the method of sandwich ELISA developed by Coutu et al. (2014) in microplates.

3.3. Detection of *L. monocytogenes* p60 protein from food and environmental samples

Figure 4 presents the detection of *L. monocytogenes* p60 protein from stainless surface in contact with contaminated minced pork ($10^2 \pm 1$ CFU/mL). Results showed that only the p60 protein of *L. monocytogenes* was detected (Fig. 3). The signal absorbance (A) for *L. monocytogenes* was higher ($A=1.16 \pm 0.39$) than the signal of *L. innocua* ($A=0.02 \pm 0.02$). The signal detection of the p60 protein of *L. monocytogenes* was also similar ($A > 1$) to the positive control (1 $\mu\text{g/mL}$ of recombinant p60 protein, $A=1.13 \pm 0.02$). All of these results supported that the CCG membrane containing the anti-PepD mAb immobilized is efficient to detect

specifically the p60 protein of *L. monocytogenes* from the environmental sample after only 48h of enrichment in modified LEB and without a reaction of cross-reactivity with *Listeria innocua*. Results also suggested that the meat containing *L. monocytogenes* and using to contaminate the environmental sample did not affect the detection of the p60 protein of *L. monocytogenes* on m-CCG. The evaluation of the matrix effect of the sample is important for the detection in sandwich ELISA because it can affect the expression of the antigen in the immunoassay test (Karaszkiwicz, 2005).

4. Conclusion

In conclusion, this second part of the work allowed demonstrating that the covalent immobilization of the anti-PepD monoclonal antibody (anti-PepD mAb) on the membrane based on chitosan, cellulose nanocrystal and glycerol (m-CCG) is suitable for the development of an optical immune-sensor (sandwich ELISA) on the solid-state surface. Indeed, the use of the optimal model obtained for the immobilization of anti-PepD mAb on m-CCG permitted to improve the detection of the p60 protein of *L. monocytogenes* compared to the standard support of sandwich ELISA. The detection on m-CCG was increased by more than 17% in TSB, 24% in LEB with 0.5% of dextrose (modified LEB) and 32% for the recombinant p60 protein of *L. monocytogenes* compared to the standard support. Those results demonstrated that the optimization of the carbon source in the selective medium as LEB (modified LEB) promote a better detection of *L. monocytogenes* p60 protein than the detection of this protein in TSB by anti-pepD mAb on m-CCG. Results also suggest site of the covalent link between glutaraldehyde reacts more with the amine groups of anti-PepD monoclonal antibodies in the lysine residues on Fc regions of anti-PepD mAb than in the Fab. The availability of the Fab of anti-PepD mAb is better on m-CCG and the covalent immobilization of anti-PepD mAb on m-CCG promotes a stability and a better control of the antibody orientation. Moreover, with the test of detection selectivity, results showed that m-CCG is a good support to maintain the selectivity of *L. monocytogenes* in sandwich ELISA because it reduced the non-specific interaction

of undesirable proteins during the detection of the p60 protein. Finally, the work showed that the CCG membrane can be used for the specific detection of the p60 protein from an environmental sample in contact with minced pork contaminated at 10^2 CFU/mL of *L. monocytogenes*. The detection of p60 protein of *L. monocytogenes* at the initial contamination of 10^2 CFU/mL in the meat present on the environmental sample was not affected by this food matrix. The detection of the p60 protein can also be done after only a direct selective enrichment of 48h in modified LEB compared to double enrichment before other accredited methods of immunological detection. Therefore, the m-CCG containing immobilized anti-PepD mAb presents a potential to be used as a support of the capture step of the p60 protein during *L. monocytogenes* growth from the environmental sample in modified LEB. This coupling of the capture of p60 protein and the enrichment step of *L. monocytogenes* also represents a simple immunosensor method which provides a feasible way to optimize the reduction of the enrichment time of *L. monocytogenes*, thus reducing the time required for analysis.

Acknowledgements

This project was performed in collaboration with CNR Comessa "Development of biochips for food safety and health" (SD) in Italy. Moreover, authors were grateful for the financial support of the Ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations du Québec (MEIE) International Program [Grant PSR-SIIRI-933] and S.M. Group International Inc. through the Armand-Frappier Foundation at INRS University. Authors would also like to acknowledge the contribution and the support of FPIInnovations.

References

- Beauchamp, Stephane. 2012a. « Évaluation de la résistance du génome bactérien à l'irradiation gamma et évaluation préliminaire d'un essai compétitif immunofluorescent pour la détection de *Listeria monocytogenes*. » INRS-Institut Armand-Frappier.
<http://espace.inrs.ca/1966/1/Beauchamp, Stéphane-PDF-2.pdf>.

- Beauchamp, Stéphane, Sabato D'Auria, Anna Pennacchio and Monique Lacroix. 2012b. « A new competitive fluorescence immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes*. » *Analytical Methods* 4 (12): 4187.
doi:10.1039/c2ay25997d. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay25997d>.
- Bouguelia, Sihem. 2012. « Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux. » *CREAB / SPrAM / INAC / CEA Grenoble*.
- Canadian Food Inspection Agency (ACIA). 2011a. « HPB Methods for the Microbiological Analysis of Foods-MFHPB-30. » *Food and Nutrition*.
<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2-eng.php>.
- Canadian Food Inspection Agency (ACIA). 2011b. « Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. »
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.php
- Canadian Food Inspection Agency (ACIA). 2013. « Environmental and Finished Dairy Product Sampling Monitoring for *Listeria monocytogenes*. »
<http://www.inspection.gc.ca/food/dairy-products/manuals-inspection-procedures/product-inspection/monitoring-for-listeria-monocytogenes/eng/1335465632611/1335466303763?chap=6>.
- Canadian Food Inspection Agency (ACIA). 2016. « Complete listing of all food recalls causing by *Listeria* in 2016. » <http://www.inspection.gc.ca/au-sujet-de-l-acia/salle-de-nouvelles/avis-de-rappel-d-aliments/liste-complete/fra/1351519587174/1351519588221?ay=2016&fr=22&fc=0&fd=0&ft=1>.
- Carpentier, Brigitte & Olivier Cerf. 2011. « Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. » *International Journal of Food Microbiology* 145 (1). Elsevier B.V.: 1-8.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>.
- Coutu, J.V., Morissette, C., D'Auria, S., & Lacroix, M. (2014). Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*,

- an important foodborne pathogen. *Microbiology Research International*, 2(46-52).
- Emaminejad, S., Javanmard, M., Gupta, C., Chang, S., Davis, R.W., & Howe, R.T. (2015). Tunable control of antibody immobilization using electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 1995-1999.
- Etty, M.C., D'Auria, S., Salmieri, S., Coutu, J.V., Baraketi, A., Jamshidan, M., S., Fraschini, C., & Lacroix, M. (2017a). Development of a support based on chitosan and cellulose nanocrystals for the rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* using anti-PepD monoclonal antibodies, part A: Optimization of the antibody immobilization method, Unpublished.
- Etty, M.C., D'Auria, S., Fraschini, C., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2017b). Effect of the optimized selective enrichment medium on the expression of the p60 protein using as *L. monocytogenes* antigen in specific sandwich ELISA, *Journal of immunological methods* (submitted).
- Faith, Nancy G., Sophia Kathariou, Brien L. Neudeck, John B. Luchansky et Charles J. Czuprynski. 2007. « A P60 mutant of *Listeria monocytogenes* is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice. » *Microbial Pathogenesis* 42 (5-6): 237-241.
doi:10.1016/j.micpath.2007.01.004.
- Hearty, S., Leonard, P., Quinn, J., & O'Kennedy, R. (2006). novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 294-312. doi:10.1016/j.mimet.2005.12.009.
- Ivanek, R., Gröhn, Y. T., Tauer, L. W., & Wiedmann, M. (2005). The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 44(7-8), 513-523. DOI: 10.1080/10408690490489378
- Karaszkiwicz, James W. 2005. "Critical Factors in Immunoassay Optimization." *Gaithersburg, MD: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.*
- Khan, A., Khan, R.A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tand, V., Kamal, M.R., Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties

of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1601-1608.

Lahou, Evy et Mieke Uyttendaele. 2014. « Evaluation of three swabbing devices for detection of *Listeria monocytogenes* on different types of food contact surfaces. » *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (1): 804-814. doi:10.3390/ijerph110100804.

Lopez, J. 2008. « *Listeria monocytogenes*. » In *ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE VACCINS POUR LES ANIMAUX TERRESTRES (mammifères , oiseaux et abeilles)*, 6^eéd., 2:1356-1373. s.l.: s.n.

Public Health Agency of Canada. 2011. « *Listeria monocytogenes*. » <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/listeria-monocytogenes-eng.php>.

Public Health Agency of Canada. 2016. « Estimations annuelles des maladies d'origine alimentaire au Canada. » <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladie-origine-alimentaire-canada/estimations-annuelles-maladies-origine-alimentaire-canada.html>.

Seurnyck-Servoss, S. L., A. M. White, C. L. Baird, K. D. Rodland and R. C. Zangar. 2007. « Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays. » *Analytical biochemistry* 371 (1): 105-115.

Thomas, M Kate, Rachael Vriezen, Jeffrey M Farber, Andrea Currie, Walter Schlech et Aamir Fazil. 2015. « Economic Cost of a *Listeria monocytogenes* Outbreak in Canada, 2008. » *Foodborne pathogens and disease* 12 (12): 966-71. doi:10.1089/fpd.2015.1965. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84949758060&partnerID=tZOtx3y1>.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology advances*, 28(2), 232-254.

World health organization (WHO). 2014. « WHO estimates of the global burden of diseases. » *WHO* 46 (3): 1-15. doi:10.1016/j.fm.2014.07.009. <http://stacks.iop.org/0022->

3727/38/i=19/a=012?key=crossref.a9148d60a4a15e1a23ed321d2f7271a3%5Cnhttp://link.aip.org/link/APPLAB/v98/i16/p161501/s1&Agg=doi%5Cnhttp://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5753167%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/.

Wuenschel, M.D., S. Köhler, A. Bubert, U. Gerike and W. Goebel. 1993. « The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. » *Journal of bacteriology* 175 (11): 3491-501. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099071>.

Yoo, S.M., & Lee, S.Y. (2016). Optical Biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 7-25.

Figure captions

Figure 1: Illustration of the possible sites of linkage in the anti-PepD monoclonal antibodies during antibody immobilization onto the CCG membrane by the crosslinking method. **a:** Covalent link in the fragment crystallizable (Fc) of the antibody; **b:** Covalent link in the heavy chain of the antigen binding fragment (Fab) of the antibody.

Figure 2: Comparison in sandwich ELISA of the effect of the antibodies immobilized on the standard microplate and the CCG membrane on the detection of the p60 protein of *L. monocytogenes* expressed in tryptic soy broth (TSB) and listeria enrichment broth with 0.5% of dextrose (modified LEB). Each experiment was performed in triplicate (n = 3).

Figure 3: Evaluation in sandwich ELISA of the selectivity of detection of *L. monocytogenes* by the anti-PepD monoclonal antibodies of *L. monocytogenes* p60 protein (anti-PepD mAb) immobilized on the CCG membrane.

Figure 4: Application of the CCG membrane containing monoclonal antibodies immobilized for the detection of the p60 protein the bacterial growth culture in modified LEB from environmental sample in contact with minced pork contaminated with *Listeria* spp.

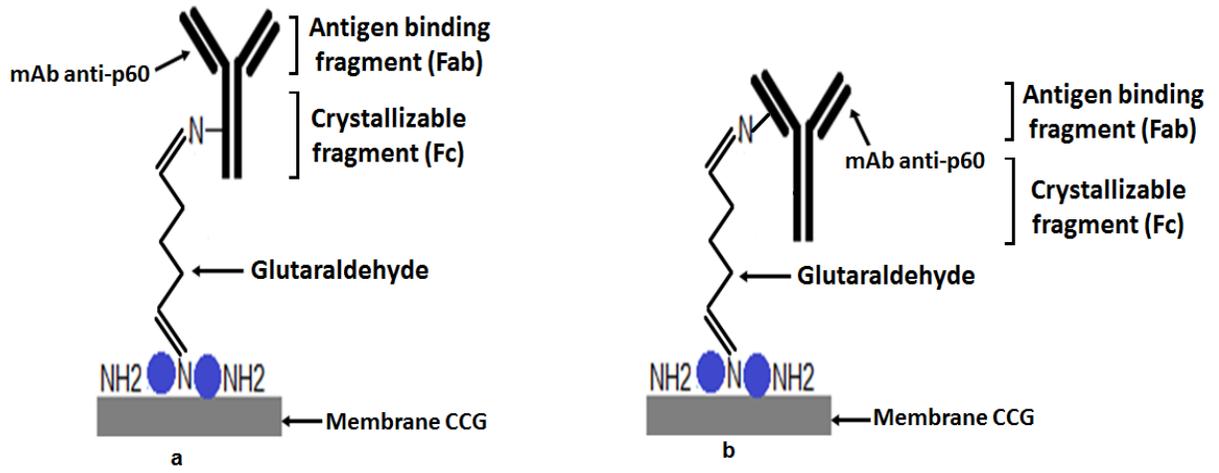


Figure 1.

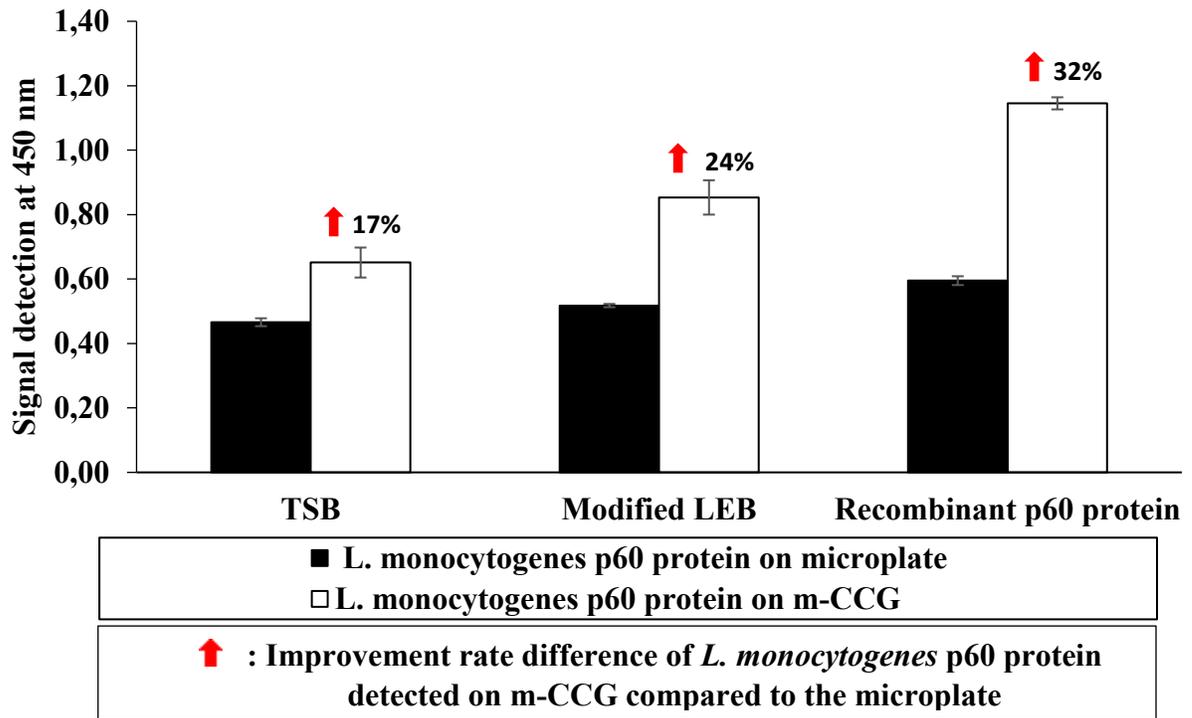


Figure 2.

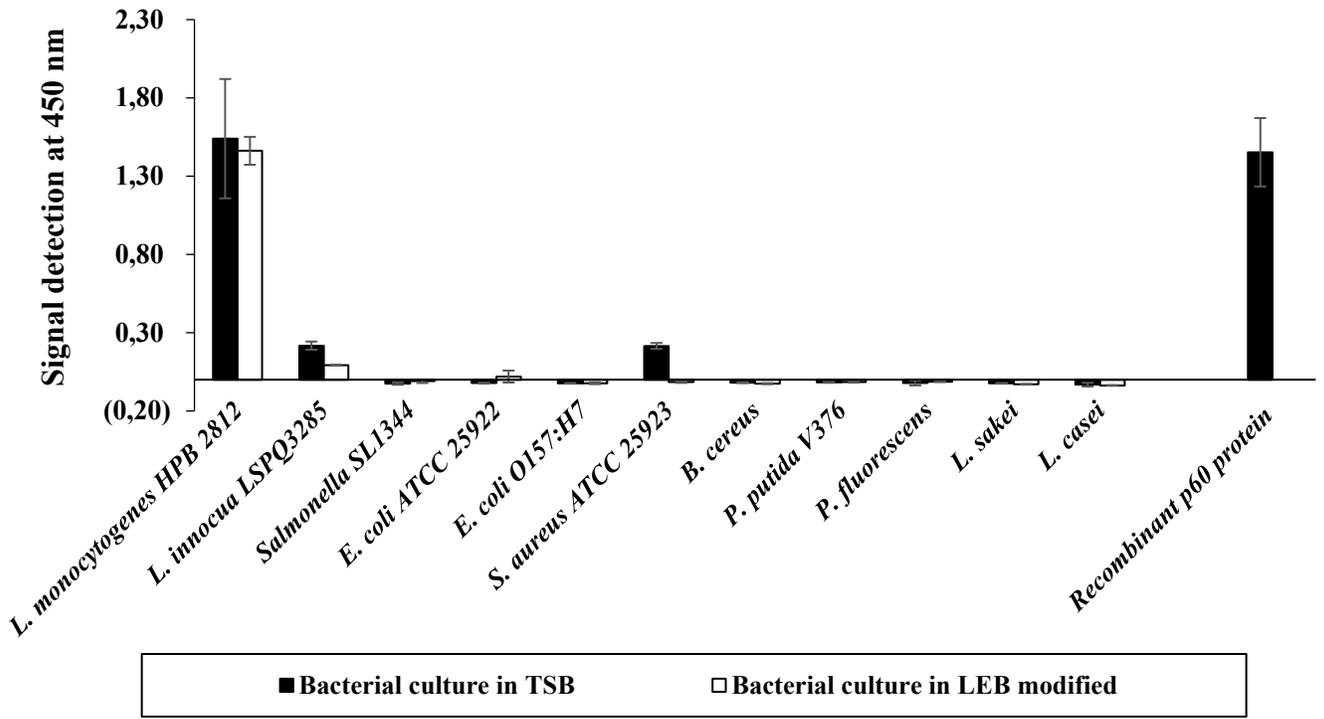


Figure 3.

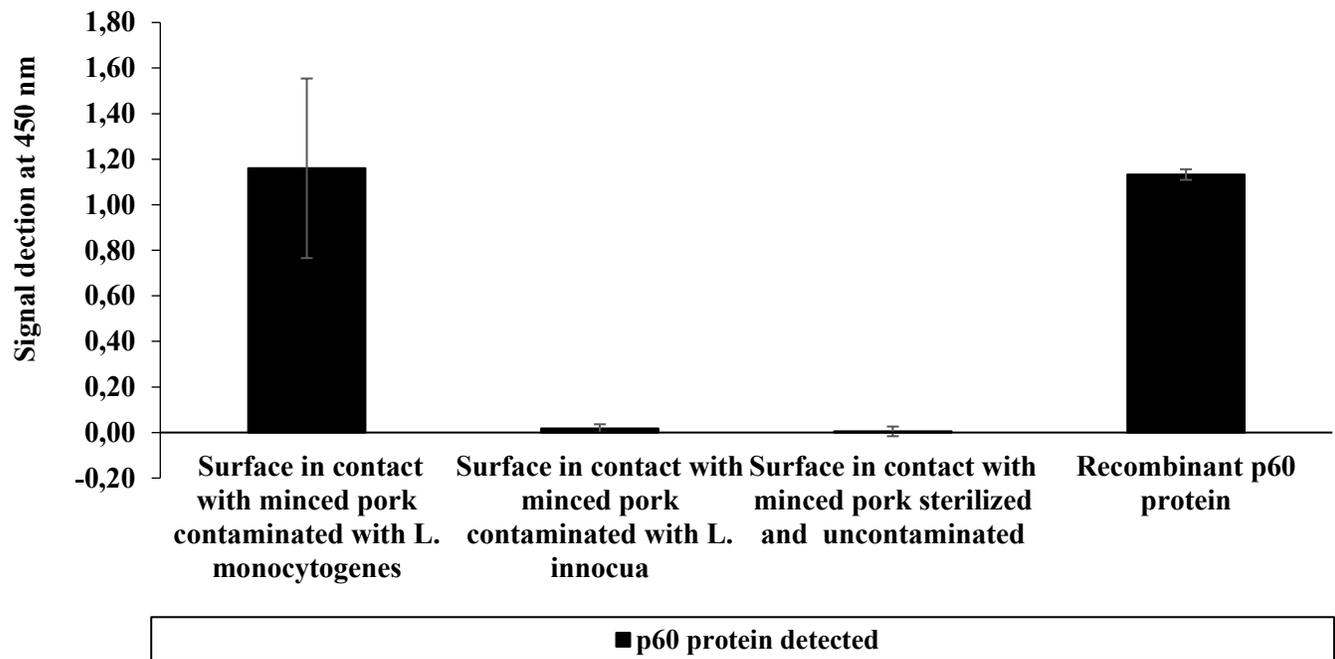


Figure 4.

Chapitre III: Discussion Générale

1. Mise au point et optimisation d'une méthode de détection pour *L. monocytogenes*

Les premiers résultats de la mise au point d'une méthode de détection rapide et spécifique pour *L. monocytogenes* ont permis de sélectionner le peptide D de la protéine p60 et de produire un anticorps monoclonal spécifique à celle-ci. Le choix de la protéine p60 est idéal puisque le but du projet est de réduire le temps de détection durant la croissance bactérienne. L'implication de la protéine p60 dans la virulence de *L. monocytogenes* (invasion des cellules) a été étudié par (Faith et al., 2007) et son implication dans la croissance des *Listeria* sp. a été étudié par (Bubert et al., 1992; Kohler et al., 1991). Avec l'évaluation de l'effet des cinq milieux de culture (TSB, BHI, LEB, FB et UVM) sur la croissance de *L. monocytogenes* et l'expression de la protéine p60 (**Article 1**), le projet confirme que la protéine p60 semble impliquée dans la croissance de *L. monocytogenes* puisqu'elle est exprimée à un seuil minimal de détection ($A_{450nm}=0.1$) dès le début de la croissance ($A_{595nm}=0.37$). L'article 1 permet également de montrer que les agents sélectifs des milieux d'enrichissement prolongent la phase de latence de *L. monocytogenes* par une modification de sa morphologie et une inhibition de l'expression de la protéine p60 durant cette phase. Ainsi, tous ces résultats confirment que la protéine p60 est présente dès le début de la division cellulaire de la bactérie et par sa fonction d'hydrolyse du peptidoglycane, elle favorise une croissance rapide de *L. monocytogenes* (Beauchamp et al., 2012; Bubert et al., 1992; Coutu et al., 2014; Kohler et al., 1991; Ruhland et al., 1993). De plus, grâce aux résultats des différents tests d'ELISA en sandwich (**Article 1**), il peut être affirmé que la reconnaissance de pepD de la protéine p60 par l'anticorps permet de détecter spécifiquement *Listeria monocytogenes*. Les résultats révèlent également que le changement de milieu de culture n'affecte pas la spécificité de détection de pepD par mAb anti-PepD. Dans le cadre de l'objectif 1, ces différents points validés permettent d'assurer une maîtrise de la spécificité du biorecepteur (mAb anti-PepD) au ligand (la protéine p60 de *L. monocytogenes*). Ces différents

points validés assurent également une disponibilité du ligand de la bactérie *L. monocytogenes* (la protéine p60) pendant la croissance de la bactérie, et ce, quel que soit le milieu utilisé.

2. Optimisation d'un milieu d'enrichissement sélectif pour la croissance de *Listeria monocytogenes* et l'expression de la protéine p60 dans un court délai de croissance

Le projet étant destiné à une application en industrie alimentaire, il était donc primordial de déterminer un milieu d'enrichissement permettant d'augmenter le seuil de croissance de la bactérie tout en inhibant les bactéries indésirables retrouvées dans les cas de contamination de l'environnement alimentaire. Pour cela, l'Article 1 présente une évaluation des milieux d'enrichissement sélectifs LEB, FB et UVM. Parmi ceux testés, le milieu *Listeria* enrichment broth (LEB) s'est avéré être le meilleur milieu d'enrichissement sélectif de croissance de *L. monocytogenes* permettant d'atteindre le niveau de croissance de la bactérie dans les milieux non sélectifs (TSB et BHI). Néanmoins, la phase de latence de *L. monocytogenes* (λ) est plus longue et l'expression de la protéine p60 (A_{450nm}) est plus faible dans le LEB que dans le TSB par exemple ($\lambda_{TSB}=5.2h > \lambda_{LEB}=8.6h$ et $A_{TSB\ 450nm}=1.38 > A_{LEB\ 450nm}=0.59$). Or, la seule différence dans la composition des milieux LEB et TSB (en carbone, azote, sel, vitamines et sels minéraux) de ces deux milieux est la présence d'agent sélectifs tandis que le type de sucre utilisé est ce qui différencie le LEB des autres milieux d'enrichissement sélectifs. Donc, une optimisation de la composition du milieu LEB fut nécessaire puisque ses composantes retardent la croissance de *L. monocytogenes* et l'expression de la protéine p60. Par l'utilisation du plan factoriel, il a été montré que seule la modification du dextrose présent dans le LEB pouvait améliorer significativement l'expression de la protéine p60 sans affecter la croissance de la bactérie. À 0.5% de dextrose dans le LEB au lieu de 0.25%, l'expression de la protéine est optimisée, mais la croissance maintenue. Les observations microscopiques dans les cinq milieux testés au départ et dans le LEB modifié montrent que les cellules

durant la phase latence sont déformées en présence des agents sélectifs. La bactérie a une cellule en forme de coccobacille dans les milieux non sélectifs alors qu'en présence et d'agents sélectifs, elles s'allongent. Par contre, à la fin de la phase exponentielle, la déformation cellulaire occasionnée par les agents sélectifs n'est plus visible dans le LEB et le LEB modifié. Besse (2002) révèle que le dextrose est une source de carbone rapidement assimilable par *Listeria monocytogenes*. Son assimilation améliore la croissance et favorise la réparation des dommages subi par sa cellule grâce à la concentration des acides aminés au niveau de la membrane. Or, la protéine p60 est une protéine de surface membranaire qui intervient dans la division cellulaire et qui nécessite des acides aminés pour être produite. D'où, par l'ajout de dextrose, la concentration des acides aminés au niveau de la membrane favorise une production plus précoce de la protéine p60 dans le LEB modifié. Les résultats montrent que même si la croissance est similaire dans les milieux LEB et LEB modifié, une amélioration de 13% de la détection de la protéine p60 dans le LEB modifié est observable dès les 7 premières heures de cinétique. La sélectivité du milieu aux espèces *Listeria spp.* et la spécificité de détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* sont également observables dans le milieu LEB modifié. Ainsi à travers cette étude, il a été montré que le milieu LEB contenant 0.5% de dextrose est le milieu d'enrichissement sélectif optimal pour minimiser l'effet de l'environnement d'expression de la protéine p60 (le ligand) et pour assurer le maintien de sa spécificité de détection par les anticorps monoclonaux anti-p60 (le biorécepteur).

3. Développement et optimisation d'un support de détection de la protéine p60 de *L. monocytogenes* transférable vers la version définitive du kit commercialisable

Lors des travaux sur le support de détection, une membrane (m-CCG) à base de chitosane, de nanocristaux de cellulose (CNC) et de glycérol a été développée. Une étude par spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier (FTIR) a permis de caractériser les composantes chimiques impliquées dans la formation

de la membrane CCG (**Article 2**). Elle a permis également de déterminer les interactions chimiques existantes entre les différentes composantes de la membrane CCG. La membrane CCG contient des groupements hydroxyle (OH) et amines NH₂ et un réseau hydrogène qui représente l'interaction principale entre les trois composés. L'apport en amine dans la membrane CCG par le chitosane est très important pour le développement d'un support de détection. À l'aide de la FTIR, il a pu être confirmé que l'interaction du chitosane avec la CNC et le glycérol n'empêchait pas la disponibilité des amines dans la membrane CCG. De plus, bien que la CNC et le glycérol ne contiennent pas de groupement d'intérêt pour le projet, leur utilisation reste nécessaire car le glycérol est nécessaire pour rendre la membrane plus flexible et pour réduire sa perméabilité au liquide (plastifiant) (Guerrero & De la Caba, 2013; Srinivasa et al., 2007; Ziani et al., 2008) . L'observation au microscope à balayage (SEM) a permis également de montrer que la CNC modifiait la topographie de surface (**Article 2**). Cette modification de la topographie de surface n'affecte pas la disponibilité en amine mais change la structure de m-CCG. Khan et al. (2012) explique que cette modification structurale renforce les propriétés mécaniques de la membrane à base de chitosane. Par la suite, la méthode de réticulation via le glutaraldéhyde a été réalisée pour immobiliser les anticorps monoclonaux anti-p60 sur la membrane CCG. Les groupements amines disponibles dans la membrane CCG et dans le fragment constant (Fc) de mAb anti-PepD ont été liés par une réaction covalente avec deux groupes aldéhyde d'une même molécule de glutaraldéhyde. Une deuxième étude par FTIR a permis de confirmer la formation de ce lien covalent entre la membrane CCG et le glutaraldéhyde (m-CCG+TPP+GA) et le glutaraldéhyde sur m-CCG avec les anticorps monoclonaux anti-p60 (m-CCG + TPP + GA + mAb). L'immobilisation covalente des anticorps à la surface de la membrane CCG a été choisie puisque la membrane développée contient naturellement un groupe réactif (NH₂). La méthode est également simple à réaliser et assure une immobilisation plus stable des anticorps.

L'optimisation de cette méthode s'est faite en deux parties. Dans la première, des tests préliminaires d'évaluation de l'effet et de l'importance des paramètres de la

méthode d'insolubilisation et de réticulation ont été effectuée. Il a été montré que traitement préalable de la membrane CCG au TPP avant la réticulation est nécessaire pour optimiser l'immobilisation (**Figure 6-11**). Ce traitement est notamment nécessaire pour éviter la déformation (augmentation du poids, tortuosité des pores, bris et repliement) de la membrane CCG occasionné par l'absorption de GA lors de la réticulation au GA (Musale & Kumar, 2000) ou d'autres étapes de la détection en condition aqueuse. L'augmentation du poids de m-CCG occasionnée également par l'insolubilisation au TPP (51% pour m-CCG+TPP) semble réduire la déshydratation (Musale & Kumar, 2000) que peut subir la membrane CCG si elle avait été traitée uniquement au glutaraldéhyde. Le traitement d'insolubilisation de la membrane CCG au TPP avant le traitement de réticulation au GA conduit à une augmentation du poids de la membrane de moins de 50% pour la combinaison des deux traitements (m-CCG+TPP+GA) au lieu d'une augmentation de m-CCG de 63% (m-CCG+GA) (**Figure 6**). Les résultats pour la quantification des aldéhydes libres montrent également que le test du Purpald est un bon outil pour déterminer la concentration de saturation en aldéhydes libres à la surface de la membrane CCG et l'effet du TPP sur la méthode de réticulation de m-CCG. A travers le test Purpald, l'effet de l'absorption des aldéhydes en absence de TPP et de l'excès en aldéhydes libres à la surface de la membrane CCG sur le signal de détection des anticorps monoclonaux anti-p60 immobilisé par réticulation a été mis en évidence.

De plus, l'effet visuel de la CNC observé sur l'insolubilisation de m-CCG par le TPP a démontré que la modification de la topographie de surface due à la CNC permet une insolubilisation homogène de la membrane CCG. La CNC semble favoriser une bonne réticulation au glutaraldéhyde et une bonne détection. Cette influence de la CNC a aussi été confirmée lors de l'optimisation par la méthodologie de surface de réponse dans l'**Article 2**. Dans la première étape de la méthode qui est le plan factoriel, la concentration de la CNC, le poids de la membrane CCG ajouté par puits et le temps d'immobilisation des anticorps ont été déterminés comme les trois facteurs clés de l'efficacité d'immobilisation des anticorps. Par la suite, le plan Box Ben a permis de montrer que seule la

concentration de la CNC dans les facteurs clés avait un effet significatif ($p \leq 0.05$) sur l'efficacité du signal d'immobilisation puisqu' à concentration maximale (0.6% (p/v)), la CNC renforce de plus de 30 % les propriétés mécaniques de la membrane CCG (**Article 2**) de telle manière que l'immobilisation est plus rapide (2 heures de temps d'immobilisation) et qu'une augmentation du poids de la membrane n'est pas nécessaire. Aussi, l'optimisation des concentrations de TPP (5% (v/v)), du glutaraldéhyde (0.2% (v/v)) et des anticorps monoclonaux (10 ug/mL) n'est pas nécessaire ($p > 0.05$) puisque pour la superficie de la microplaque dans laquelle est fixé la membrane CCG (support de détection développé) est de 1.7cm^2 et le pourcentage de déacétylation du chitosane choisi est de 85%. L'augmentation des concentrations du TPP et du GA sur la membrane CCG aurait été un gaspillage. La variation de leur concentration dans le plan factoriel (**Article 2**) n'a pas d'effet significatif ($p > 0.05$) sur l'immobilisation. Aussi, à partir de l'optimisation mathématique, un modèle a pu être obtenu et permet de prédire l'efficacité d'immobilisation à un niveau de confiance de 99.3%. La combinaison optimale de la méthode d'immobilisation est une concentration de CNC de 0.6%, un poids de la membrane CCG par puits de 0.5g et un temps d'immobilisation de 2 heures. Avec cette combinaison une amélioration du signal de détection dans le TSB (17%) et dans le LEB modifié (24%) a été observée comparativement à la microplaque standard. Ce résultat suggère que l'immobilisation covalente d'anticorps assure une meilleure accessibilité du site de liaison de la protéine p60 dans mAb anti-PepD (région Fab). Cette amélioration de détection est une condition importante du développement d'un support d'immobilisation covalent des anticorps via ses groupements amines. Ainsi, cette amélioration du signal de détection permet de supposer que le lien covalent formé en présence du glutaraldéhyde entre les amines de la membrane CCG avec ceux de mAb anti-PepD semble se faire dans le fragment constant (Servoss et al., 2007). Ou, le site de liaison dans le support optimisé permet également une détection spécifique de la protéine p60 de *L. monocytogenes* (**Article 3**) et une réduction des réactions non spécifiques de la protéine p60 à la membrane CCG (**Figure 12**) à une concentration de 6% de BSA.

Enfin, la dernière partie de ces travaux, consistait à une optimisation de la méthode de détection d'ELISA en sandwich et a permis de réduire le temps d'analyse de 3 heures après la capture de la protéine p60 par les anticorps monoclonaux sur la membrane CCG comparativement à 6 heures pour les tests actuellement utilisés. Cette optimisation (**Figure 14**) montre qu'il est possible de réduire le temps d'incubation à 30 minutes pour l'étape de détection de capture de la protéine par les anticorps polyclonaux anti-p60 et pour l'étape de révélation du sandwich formé par des anticorps monoclonaux secondaires couplés à la peroxydase de raifort. Ce temps est suffisant pour détecter la protéine et ne nécessite pas une longue méthode de lavage (trois lavages de 5 minutes au maximum) puisque moins d'anticorps non fixés seront à retirer par lavages. Aussi, il a été montré que le temps d'incubation de la détection pouvait être plus court (5 minute au minimum) tandis que celui des anticorps de révélation devait au minimum être de 15 minutes pour obtenir un signal de détection visible ($A > 0.1$). Cette observation est due au fait que les anticorps de détection sont de type polyclonal d'où un rapport de 1 protéine p60 capturée pour 2 anticorps polyclonaux au minimum (augmentation de la sensibilité de détection) (Coutu et al., 2014) tandis que les anticorps de révélation sont des anticorps monoclonaux. D'où, un rapport de 1 pour 1 existe entre l'anticorps polyclonal détectant la protéine p60 et l'anticorps de révélation détectant l'anticorps polyclonal à la surface de la protéine p60 (détection du sandwich). Ce rapport aide à comprendre les limites de la réduction du temps des étapes de détection et de révélation de la capture de la protéine p60 de *L. monocytogenes*. Enfin, l'application de l'optimisation de la membrane CCG (**Article 2**) et du temps de détection et de révélation (**Figure 14**) ont permis de détecter spécifiquement la protéine p60 dans des échantillons environnementaux inoculés avec *L. monocytogenes* sans réaction croisée avec *L. innocua* (*Listeria* sp. non-pathogène) (**Article 3**). Ce qui montre que la modification des conditions de température et la réduction du temps de la méthode n'affecte pas la spécificité du test de détection et ne favorise pas de réaction croisée.

4. Transfert de la membrane CCG optimisée vers la version définitive du kit de détection

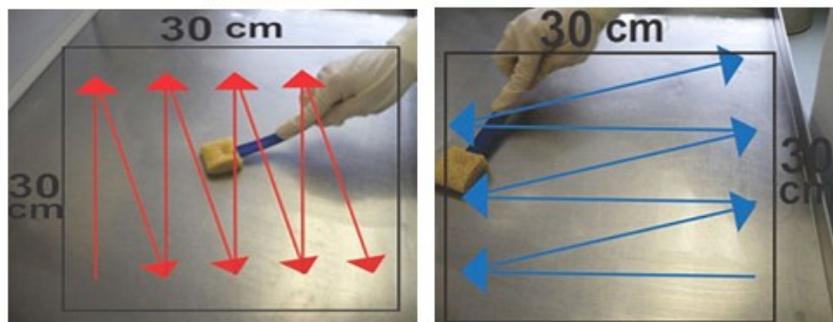
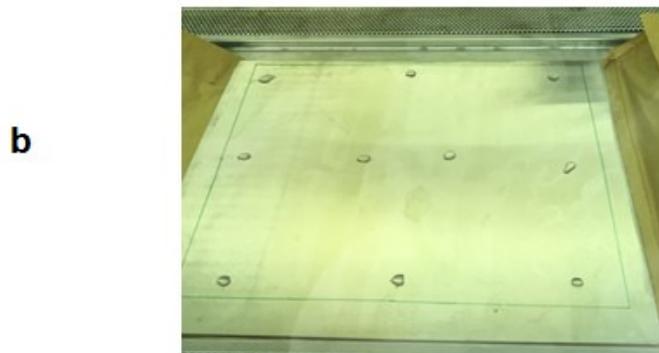
Cette partie discutée fait partie intégrante de l'objectif 3 mais il est présenté dans une section séparée puisqu'il représente l'objectif final du projet de recherche. En effet l'objectif final du projet était d'obtenir une version définitive du kit permettant de coupler la capture de la protéine p60 et la croissance de *L. monocytogenes* provenant d'un échantillon de surface (environnemental). D'où, un transfert de la membrane a été effectué sur une spatule de bois afin d'insérer la membrane CCG optimisée et fixée sur un support dans un échantillon de surface contaminé. La détection de *L. monocytogenes* dans la viande de porc a également été testée bien que la détection de cette bactérie dans les aliments ne soit pas l'objectif du projet. Les résultats obtenus (**Figure 15**) démontrent que la version spatule de la membrane CCG peut permettre une détection de la protéine p60 en continu durant la croissance de *L. monocytogenes*. Cette augmentation continue confirme le lien de proportionnalité existant entre l'expression de la protéine p60 et la croissance de *L. monocytogenes*. Par les résultats sur la réduction du temps de croissance (**Figure 16**) et de détection (**Figure 14**), il est également démontré que le délai du temps d'analyse peut être réduit de 48 heures à 33 - 36 heures d'incubation selon le volume d'échantillon à tester. Ces 33 heures comprennent 3 heures de détection en ELISA en sandwich et 30 heures de croissance de *L. monocytogenes* équivalent à 12 log/mL pour un échantillon de surface ou un échantillon de viande de porc dont la contamination initiale était de 2 log/ 900 cm² ou 2 log/mL (**Tableau 5**). Ainsi, ces observations montrent que cette version peut être potentiellement utilisée pour réduire le temps d'analyse de détection de moins de 48 heures pour des échantillons contenant plus de 10² UFC/mL ou par 900 cm². Cette réduction du temps d'analyse à moins de 48 heures est prometteur puisque pour une concentration en dessous de la dose à risque (10³ UFC/mL), ce délai d'analyse est inférieur à la durée de vie minimale des aliments contaminés par *L. monocytogenes* (48 heures) et au temps d'enrichissement maximal des méthodes

de détection rapide. Également, il met en évidence l'efficacité de la méthode de détection dans le LEB avec une sensibilité de détection (2 log) dans un délai plus court d'enrichissement. Même si les résultats (**Figure 15**) montrent que *L. innocua* est détectable. L'échantillon *L. innocua* testé avec les spatules contenant m-CCG est le même qui est utilisé sur la membrane CCG en microplaque dans l'**Article 3**. Or, en microplaque cet échantillon n'est pas détectable (**Article 3**). D'où la réduction de la spécificité du test de détection ne semble pas venir d'un problème avec les anticorps monoclonaux anti-p60 mais des réactions non spécifiques identifiées sur la membrane CCG (**Figure 12**). Le blocage de la membrane lors du transfert vers une autre version reste donc un paramètre à optimiser pour que le support dans le kit de détection ne conduise pas à des faux positives.

En conclusion de cette partie, la méthode de détection développée comprend les étapes suivantes qui sont illustrées ensuite par la (**Figure 16**):

- La première étape (a) sera la préparation de la membrane CCG sur le support insérable dans le milieu d'enrichissement des échantillons et l'immobilisation des anticorps après séchage et stérilisation par irradiation gamma des membranes CCG.
- La seconde étape (b) consistera à échantillonner la surface à tester selon la procédure illustrée de santé Canada (Canadian Food Inspection Agency, 2013).
- La troisième étape (c) sera de procéder à l'enrichissement de l'échantillon dans le bouillon LEB modifié en présence de la membrane contenant les anticorps spécifiques de capture de la protéine p60 de *L. monocytogenes*. La capture se fera en continu durant la croissance et ce jusqu'à un seuil minimal de croissance de 0.37 de densité cellulaire.
- La dernière étape (d) consistera premièrement à récupérer la membrane et à procéder aux étapes de détection de la capture avec les anticorps polyclonaux anti-p60 et de révélation du sandwich par les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort et le TMB.

-



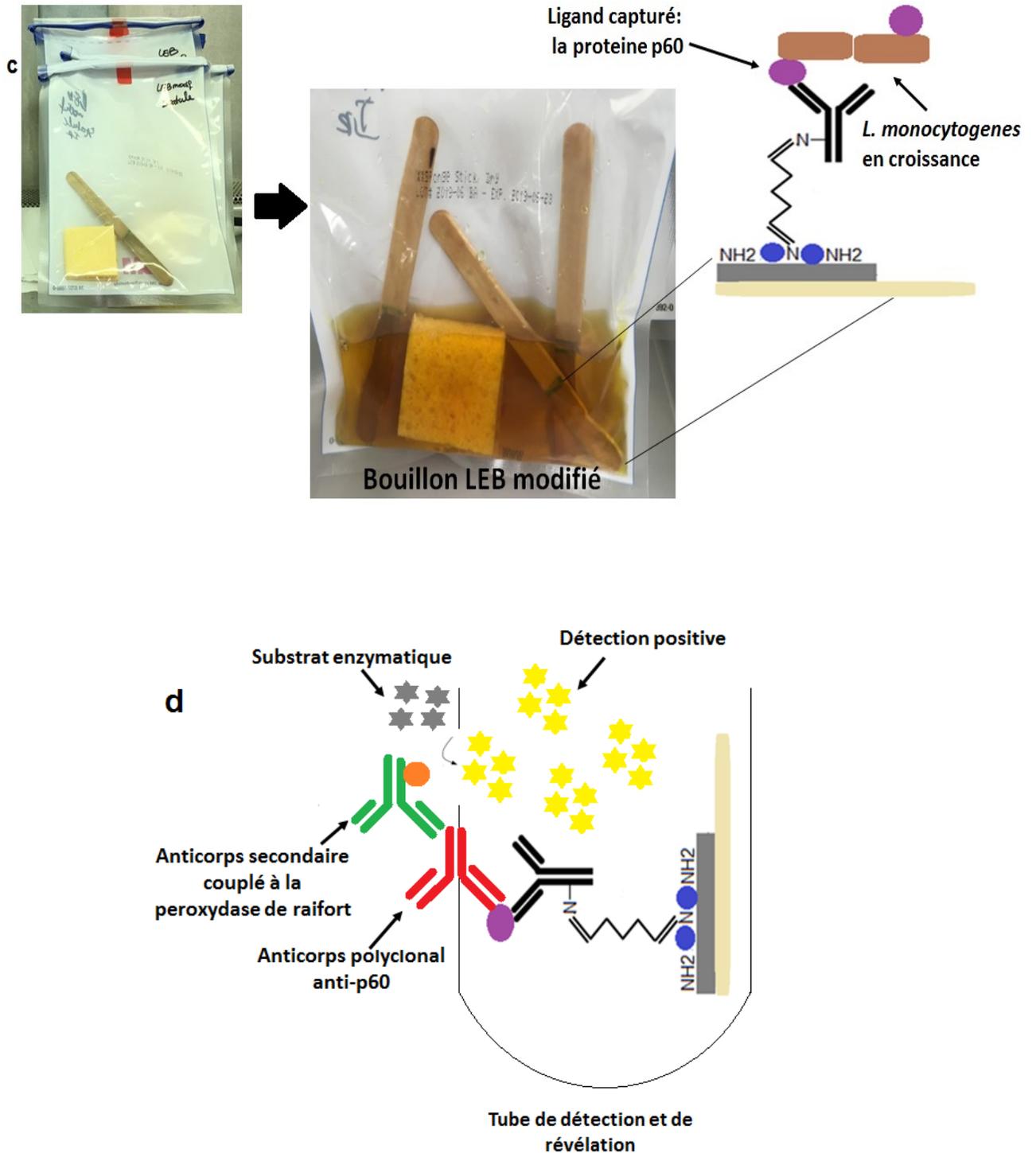


Figure 16: Illustration de la méthode d'échantillonnage environnemental et du format final du kit de détection en développé pour la capture de la protéine p60 de *L. monocytogenes* durant sa croissance (Public health agency of Canada; 2011Canadian Food Inspection Agency, 2013; Lahou & Uyttendaele, 2014)

Chapitre IV: Conclusion Générale

En conclusion, les études effectuées au cours de ce projet de recherche permettent premièrement de mettre en évidence le lien de corrélation qui existe entre l'expression de la protéine p60 et la phase de croissance de *L. monocytogenes* en culture dans différents milieux. La protéine p60 est exprimée dès le début de la phase exponentielle et son expression, comme la croissance de *L. monocytogenes*, est également affectée par les agents sélectifs du milieu. Néanmoins, le milieu d'enrichissement sélectif Listeria enrichment broth (LEB) modifié en dextrose (0,5%) a permis de réduire les effets des agents sélectifs et d'optimiser l'expression de la protéine p60 de *Listeria monocytogenes*. Ensuite, les travaux sur le développement d'un support de détection à base de chitosane, de nanocristaux de cellulose et de glycérol (m-CCG) permettent d'affirmer que m-CCG est capable de détecter spécifiquement la protéine p60 de *L. monocytogenes*. Le succès de l'utilisation de la membrane CCG vient de la présence naturelle de groupements amines qui permet d'immobiliser de façon stable les anticorps monoclonaux anti-p60 via la molécule de glutaraldéhyde. Cette méthode d'immobilisation est appelée réticulation et par le lien covalent qui se forme entre la membrane CCG et les anticorps la disponibilité des du site de capture de la protéine p60 n'est pas affectée au point d'empêcher la détection ELISA. L'efficacité de la membrane CCG comme support de détection vient également des nanocristaux de cellulose qui renforcent les propriétés mécaniques et modifient la topographie de surface de la membrane CCG. Grâce au renforcement de la résistance de la membrane CCG et à la modification de sa surface, l'insolubilisation est plus homogène et la méthode d'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-p60 plus efficace et modélisable. Enfin, les travaux sur l'application combinée du milieu LEB modifié et de la membrane CCG optimisée met en évidence leur potentiel dans la réduction du temps d'analyse de moins de 48 heures de la détection spécifique de *L. monocytogenes* durant une seule étape d'enrichissement. Toutefois, une optimisation de la procédure de

blocage restera à faire lors du choix définitif de la version transférable dans le kit de détection commercialisable.

Références bibliographiques

Albarghouthi, M., Fara, D.A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K., & Badwan, A. 2000. "Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads". *International Journal of Pharmaceutics*, 206(1), 23-34.

Anthony D. Hitchins, Karen Jinneman and Yi Chen. 2017. Bacteriological Analytical Manual: "*Detection of Listeria monocytogenes in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods*" Chapter 10.

<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm>

Beauchamp, Stéphane. 2012a. "*Évaluation de la résistance du génome bactérien à l'irradiation gamma et évaluation préliminaire d'un essai compétitif immuno-fluorescent pour la détection de Listeria monocytogenes*". Mémoire. Québec, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Maîtrise en microbiologie appliquée, 85 pages.

Beauchamp, Stéphane, Sabato D'Auria, Anna Pennacchio, and Monique Lacroix. 2012b. "A New Competitive Fluorescence Immunoassay for Detection of *Listeria monocytogenes*." *Analytical Methods*, 4(12): 4187.

<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay25997d>.

Besse, N.Gnanou. 2002. "Influence of Various Environmental Parameters and of Detection Procedures on the Recovery of Stressed *L. Monocytogenes*: A Review." *Food Microbiology*, 19(2–3): 221–34.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002001904484>.

Bhumkar, Devika R, and Varsha B Pokharkar. 2006. "Studies on Effect of pH on Cross-Linking of Chitosan with Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note." *AAPS PharmSciTech*, 7(2): E50.

Bierne, Hélène, and Pascale Cossart. 2007. "*Listeria Monocytogenes* Surface Proteins: From Genome Predictions to Function." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 377–97.

Bouguelia, Sihem. 2012. PhD CREAB / SPrAM / INAC / CEA Grenoble "*Développement de Biopuces Dédiées À La Détection de Bactéries Pathogènes À Faibles Taux.*"

Boumail, Afia, Salmieri, Stephane, Klimas, Emilie, Tawema, Pamphile O., Bouchard, Jean, Lacroix, Monique et al. 2013. "Characterization of Trilayer Antimicrobial Diffusion Films (ADFs) Based on Methylcellulose-Polycaprolactone Composites." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4): 811–21.

Brundage, R. A., Smith, G. A., Camilli, A., Theriot, J. A., & Portnoy, D. A. (1993). Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11890-11894.

Bubert, Andreas, Michael Kuhn, Werner Goebel, and Stephan Kohlert. 1992. "Functional Properties of the p60." *Microbiology*, 174(24): 8166–71.

Canadian Food Inspection Agency. 2013. "Environmental and Finished Dairy Product Sampling Monitoring for *Listeria Monocytogenes*."

<http://www.inspection.gc.ca/food/dairy-products/manuals-inspection-procedures/product-inspection/monitoring-for-listeria-monocytogenes/eng/1335465632611/1335466303763?chap=6> (April 9, 2017).

CECMA. 2009. Lignes Directrices et Normes Pour L'interprétation Des Résultats Analytiques En Microbiologie Alimentaire.

Cournoyer, Jason J, Jason J, Kshirsagar, Tushar, Fantauzzi, Pascal P, Figliozzi, Gianine M, Makdessian, Taline, Yan, Bing. 2002. "Color Test for the Detection of Resin-Bound Aldehyde in Solid-Phase Combinatorial Synthesis." *Journal of Combinatorial Chemistry*, 4, 120–24.

Court, Marielle. 2014. "La Listériose Progresse En Europe." Le Figaro.fr, Santé. <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2014/02/21/22029-listeriose-progresse-europe> (March 31, 2017).

Coutu, J. V., Morissette, C., D'Auria, S., & Lacroix, M. 2014. Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Microbiology Research International*, 2(4), 46-52.

Dong, Hong, Strawhecker, Kenneth E., Snyder, James F., Orlicki, Joshua A., Reiner, Richard S., Rudie, Alan W. 2012. "Cellulose Nanocrystals as a Reinforcing Material for Electrospun Poly(methyl Methacrylate) Fibers: Formation, Properties and Nanomechanical Characterization." *Carbohydrate Polymers*, 87(4): 2488–95.

Doyle, Michael P., Larry R. Beuchat, and Thomas J. Montville. 2001. Food Microbiology: *Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. ed. ASM Press. Washington, DC, p 6-10.

Emaminejad, Sam, Javanmard, Mehdi, Gupta, Chaitanya, Chang, Shuai, Davis, Ronald W., Howe, Roger T. 2015. "Tunable Control of Antibody Immobilization Using Electric Field." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7): 201424592. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1424592112>.

Faith, Nancy G., Kathariou, Sophia, Neudeck, Brien L., Luchansky, John B., Czuprynski, Charles J. 2007. "A P60 Mutant of *Listeria Monocytogenes* Is Impaired in Its Ability to Cause Infection in Intragastrially Inoculated Mice." *Microbial Pathogenesis*, 42(5–6): 237–41.

Fao and OMS. 2005. Rapport de La Conférence Régionale de La FAO Pour l'Afrique. Rome.

Flynn, Dan. 2014. "USDA: U.S. Foodborne Illnesses Cost More Than \$15.6 Billion Annually." Food safety news.

<http://www.foodsafetynews.com/2014/10/foodborne-illnesses-cost-usa-15-6-billion-annually/#.WOnJGIWcHIU> (April 9, 2017).

Forsythe, Stephen J. 2011. *The Microbiology of Safe Food*. 2nd ed. John Wiley & Sons, p 496.

Geng, T., Kim, K. P., Gomez, R., Sherman, D. M., Bashir, R., Ladisch, M. R., Bhunia, Arun K. 2003. "Expression of Cellular Antigens of *Listeria Monocytogenes* That React with Monoclonal Antibodies C11E9 and EM-7G1 under Acid-, Salt- or Temperature-Induced Stress Environments." *Journal of Applied Microbiology*, 95(4): 762–72.

Geng, Tao, Byoung-Kwon Hahm, and Arun K Bhunia. 2006. "Selective Enrichment Media Affect the Antibody-Based Detection of Stress-Exposed *Listeria Monocytogenes* due to Differential Expression of Antibody-Reactive Antigens Identified by Protein Sequencing." *Journal of Food Protection*, 69(8): 1879–86.

Habibi, Youssef, Lucia, Lucian A., Rojas Orlando J. 2009. "Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications." *Chemical reviews*, 110(6), 3479-3500.

Health Canada. 2011. "HPB Methods for the Microbiological Analysis of Foods-MFHPB-30." Food and Nutrition.

<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2-eng.php> (April 9, 2017).

Hearty, Stephen, Paul Leonard, John Quinn, and Richard O’Kennedy. 2006. "Production, Characterisation and Potential Application of a Novel Monoclonal Antibody for Rapid Identification of Virulent *Listeria Monocytogenes*." *Journal of Microbiological Methods*, 66(2): 294–312.

Horwitz, W. 2000. "AOAC 992.18." AOAC International.

Karaszkiwicz, James W. 2005. "Critical Factors in Immunoassay Optimization." Gaithersburg, MD: Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.

Khan, Avik, Khan, Ruhul A., Salmieri, Stephane, Le Tien, Canh, Riedl, Bernard, Bouchard, Jean, Chauve, Gregory, Tan, Victor, Kamal, Musa R., Lacroix, Monique. 2012. "Mechanical and Barrier Properties of Nanocrystalline Cellulose Reinforced Chitosan Based Nanocomposite Films." *Carbohydrate Polymers*, 90(4): 1601–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.037>.

Krajewska, B. (2005). Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and purification technology*, 41(3), 305-312.

Köhler, S., Leimeister-Wächter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F. A. G. W., & Goebel, W. (1990). The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, 58(6), 1943-50.

Kohler, S., A. Bubert, M. Vogel, and W. Goebel. 1991. "Expression of the lap Gene Coding for Protein p60 of *Listeria Monocytogenes* Is Controlled on the Posttranscriptional Level." *Journal of Bacteriology*, 173(15): 4668–74.

Krajewska, Barbara. 2004. "Application of Chitin- and Chitosan-Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review." *Enzyme and Microbial Technology* 35(2–3): 126–39.

Kumar, Mnvr. 2000. "A Review of Chitin and Chitosan Applications." *Reactive & Functional Polymers*, 46(1): 1–27.

Lahou, Evy, and Mieke Uyttendaele. 2014. "Evaluation of Three Swabbing Devices for Detection of *Listeria Monocytogenes* on Different Types of Food Contact Surfaces." *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1): 804–14.

Law, Jodi Woan-Fei, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan, and Learn-Han Lee. 2014. "Rapid Methods for the Detection of Foodborne Bacterial Pathogens:

Principles, Applications, Advantages and Limitations.” *Frontiers in Microbiology* 5(January): 770.

Leceta, I., P. Guerrero, and K. De la Caba. 2013. “Functional Properties of Chitosan-Based Films.” *Carbohydrate polymers*, 93(1): 339–46.

Lee, H Y, Chai, L. C, Nakaguchi, Y, Nishibuchi, M, Radu, S. 2013. “Review on Protocol Development for Detection and Identification of *Listeria Monocytogenes* in Foods.” *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(4): 2523–30.

Liu, Chunxiu, Renbi Bai, and Li Nan. 2004. “Sodium Tripolyphosphate (TPP) Crosslinked Chitosan Membranes and Application in Humic Acid Removal.” AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings.

Lopez, J. 2008. “*Listeria Monocytogenes*.” In ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE VACCINS POUR LES ANIMAUX TERRESTRES (Mammifères, Oiseaux et Abeilles), 1356–73.

MAPAQ. 2010. “Les Agents Pathogènes Les plus Souvent Associes Aux Toxi-Infections Alimentaires.”

https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Laboratoire/agents_pathogenes.pdf (March 9, 2017).

McKellar, R. C. (1994). Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 60(12), 4219.

De Mesquita, João P., Claudio L. Donnici, Ivo F. Teixeira, and Fabiano V. Pereira. 2012. “Bio-Based Nanocomposites Obtained through Covalent Linkage between Chitosan and Cellulose Nanocrystals.” *Carbohydrate Polymers*, 90(1): 210–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.025>.

Migneault, Isabelle, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand, and Karen C. Waldron. 2004. “Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking.” *BioTechniques*, 37(5): 790–802.

Musale, Deepak A., and Ashwani Kumar. 2000. "Effects of Surface Crosslinking on Sieving Characteristics of Chitosan/poly(acrylonitrile) Composite Nanofiltration Membranes." *Separation and Purification Technology*, 21(1–2): 27–38.

Organisation mondiale de la santé (OMS). 20105a. "Maladies D'origine Alimentaire: Estimations de l'OMS Sur La Charge Mondiale de Morbidité." : 2. [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/fr/\(9](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/fr/(9) Mars, 2017).

Organisation mondiale de la santé (OMS). 2015b. "Sécurité Sanitaire Des Aliments." Media centre, Aide-mémoire N°399. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/fr/>. (1 Novembre, 2017)

Public Health Agency of Canada. 2011. "*LISTERIA MONOCYTOGENES*." <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/listeria-monocytogenes-eng.php> (November 1, 2016).

Revillard, Jean-Pierre. 2001. Immunologie. 4th ed. *De Boeck Supérieur*, p 26-30.

Ruhland, G J, M Hellwig, G Wanner, and F Fiedler. 1993. "Cell-Surface Location of *Listeria*-Specific Protein p60--Detection of *Listeria* Cells by Indirect Immunofluorescence." *Journal of general microbiology*, 139(3): 609–16.

Santé publique Canada. 2016. "Estimations Annuelles Des Maladies D'origine Alimentaire Au Canada." <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladie-origine-alimentaire-canada/estimations-annuelles-maladies-origine-alimentaire-canada.html> (March 9, 2017).

Scallan, E, oekstra, RM, Angulo, FJ, Tauxe, RV, Widdowson, M-A, Roy, SL et al. 2011. "Foodborne Illness Acquired in the United States—major Pathogens." *Emerging Infectious Diseases*

Seuryneck-Servoss, S. L., A. M. White, et al. 2007. "Evaluation of Surface Chemistries for Antibody Microarrays." *Analytical Biochemistry* 371(1): 105–15.

Seurynck-Servoss, S. L., C. L. Baird, K. D. Rodland, and R. C. Zangar. 2007. "Surface Chemistries for Antibody Microarrays." *Frontier in Bioscience*, 12(8–12): 3956–64.

Shu, X.Z, and K.J Zhu. 2002. "The Influence of Multivalent Phosphate Structure on the Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Films for Controlled Drug Release." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(2): 235–43.

Solve, Marianne, Jeppe Boel, and Birgit Norrung. 2000. "Evaluation of a Monoclonal Antibody Able to Detect Live *Listeria Monocytogenes* and *Listeria Innocua*." *International Journal of Food Microbiology*, 57(3): 219–24.

Srinivasa, P. C., M. N. Ramesh, and R. N. Tharanathan. 2007. "Effect of Plasticizers and Fatty Acids on Mechanical and Permeability Characteristics of Chitosan Films." *Food Hydrocolloids*, 21(7): 1113–22.

Thomas, M Kate, Riezen, Rachael, Farber, Jeffrey M, Currie, Andrea, Schlech, Walter Fazil, Aamir. 2015. "Economic Cost of a *Listeria Monocytogenes* Outbreak in Canada, 2008." *Foodborne pathogens and disease* 12(12): 966–71.

Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. "Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants." *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3):584–640.

Velusamy, Vijayalakshmi, Arshak, KhalilKorostynska, Olga, Oliwa, Kamila, Adley, Catherine. 2010. "An Overview of Foodborne Pathogen Detection: In the Perspective of Biosensors." *Biotechnology Advances*, 28(2): 232–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>.

Yoo, Seung Min, and Sang Yup Lee. 2016. "Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms." *Trends in Biotechnology*, 34(1): 7–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.012>.

Zhou, Chengjun, and Qinglin Wu. 2012. "Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies." *Nanocrystals – Synthesis, Characterization and Applications properties*, 103–20.

Ziani, Khalid, Javier Oses, Veronique Coma, and Juan I. Maté. 2008. "Effect of the Presence of Glycerol and Tween 20 on the Chemical and Physical Properties of Films Based on Chitosan with Different Degree of Deacetylation." *LWT - Food Science and Technology*, 41(10): 2159–65.