

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Mémoire de MASTER

Pour l'obtention du diplôme

En

Médecine vétérinaire

THEME

ETUDE DE LA SENSIBILITE DES STAPHYLOCOQUES ET DES ENTEROBACTERIES D'ORIGINE ALIMENTAIRE AUX BIOCIDES

Présenté par :

Mlle ZENNOUN Sabrina

Soutenu le : 14 Septembre 2022

➤ **Devant le jury composé de:**

- Président : **Mr GOUSSEM.R**

Professeur à l'ENSV

- Promotrice : **Mme BOUAYAD. L**

Professeure à l'ENSV

- Examinatrice : **Mme BOUHAMED.R**

MCB à l'ENSV

Année universitaire : 2021 / 2022

Déclaration sur l'honneur

Je soussigne **ZENNOUN Sabine**, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des auteurs ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Sabine Zennoun', written in a cursive style. The signature is located in the lower right quadrant of the page.

Remerciements :

Je remercie Dieu, le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de ma chère promotrice Professeur « **BOUAYAD Leila** ». Je lui adresse toute ma reconnaissance pour sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Je désire aussi remercier les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, au Docteur « **GOUCEM R** » pour avoir accepté de présider le jury ainsi au Docteur « **BOUHAMED R** » pour avoir accepté d'examiner mon travail*

Mes remerciements les plus sincères et les plus profonds vont à ma famille et mes amis qui m'ont toujours encouragé pour avancer.

Enfin, je profite de cette dernière occasion pour exprimer ma gratitude à tout le corps enseignant et à tous les membres de notre école que j'ai côtoyé au cours de ces cinq années

Merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, rien de tout cela n'aurait été possible sans vous.

Dédicaces :

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A la femme,

*Qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **Zahoua***

A l'homme,

*Mon précieux, à qui je dois ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **Badre-ddine**.*

*A mes chères sœurs **Rayene** et **Imene** qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout le long de mes études. Que Dieu les protège et leur offre la chance et le bonheur.*

Imene j'aurai aimé que tu sois la

*A mon petit frère **chamse-ddine** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur à toute la famille*

*A **Rochdi**, et mes deux adorables neveux **Sofia** et **Zakaria** bienvenue dans notre petite famille.*

A mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie

*A tous les cousins, cousines et amis spécialement : **Cehd**, **Sihem Amina**, **Chiraz**, **Amena**, **Lydia**, **Nesrine**, **Meriem**, **Rayhane**, **Riad** et **Moncef**.*

Merci pour leurs amours et leurs encouragements.

Sabrine Zennoun

Résumé

Le présent travail a pour objectif d'évaluer le pouvoir inhibiteurs des différents biocides sur des isolats de *Staphylococcus et d'entérobactéries* d'origine alimentaire.

Onze biocides de différentes familles ont été testés sur 11 isolats de staphylocoques et sur 15 isolats d'entérobactérie. La méthode adoptée pour ces tests est la méthode de diffusion sur gélose de Kirby Bauer

Les résultats obtenus indiquent que la majorité de produits utilisés aux différentes concentrations n'ont pas un effet inhibiteur significatif.

Les rayons d'inhibition sont presque nuls, à part l'AMINE et le DDAL AQ qui ont montré une inhibition intermédiaire vis-à-vis des entérobactéries et staphylocoques.

Mots clés : Biocides, effet inhibiteur, Staphylocoques, Entérobactéries.

Abstract

The objective of the present work is to evaluate the inhibitory power of different biocides on isolates of *Staphylococcus* and *Enterobacteriaceae* of food origin.

Eleven biocides of different families were tested on 11 isolates of staphylococcus and 15 isolates of enterobacteria. The method adopted for these tests is the diffusion method on Kirby Bauer agar

The results obtained indicate that the majority of products used at different concentrations do not have a significant inhibitory effect.

The inhibition radii are almost non-existent, except for AMINE and DDAL AQ which showed an intermediate inhibition against enterobacteria and staphylococci.

Keywords: Biocides, inhibitory effect, Staphylococci, Enterobacteria.

ملخص:

لهدف من العمل الحالي هو تقييم القوة المثبطة للمبيدات الحيوية المختلفة على عزلات *Staphylococcus* و *Enterobacteriaceae* من أصل غذائي.

تم اختبار 11 مبيد حيوي من عائلات مختلفة على 11 عزلة من المكورات العنقودية و 15 عزلة من البكتيريا المعوية. الطريقة المعتمدة لهذه الاختبارات هي طريقة الانتشار على كيربي باور آجار
تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن غالبية المنتجات المستخدمة بتركيزات مختلفة ليس لها تأثير مثبت كبير.
إن نصف قطر التثبيط غير موجود تقريبًا ، باستثناء أمين و DDAL AQ الذي أظهر تثبيطًا وسيطًا ضد البكتيريا المعوية والمكورات العنقودية.

•
الكلمات الرئيسية: المبيدات الحيوية، التأثير المثبط، المكورات العنقودية، البكتيريا المعوية

Liste des tableaux

Tableau 1 : Type de produits biocides et leur discription (Commission europeene, 2012) Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 2 : Differentes familles de biocides antibacteriens et les structures bacteriennes ciblée (ANSES, 2018)	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 3 : Espèces bacterinnes etudiées :	18
Tableau 4: biocides utilisés	19
Tableau 5 : Résultats des tests de sensibilité aux biocides (Diametres d'inhibiton)	24
Tableau 6 : Résultats des tests de sensibilités des isolats de staphylococcus aux biocides (rayons d'inhibitions)	25
Tableau 7 : Profil d'inhibition des isolats de staphylocoques	26
Tableau 8 : Sensibilité des isolats de staphylococcus et leur pourcentages.....	27
Tableau 9 : Résultats de test de sensibilité des Enterobacteries aux biocides (rayons d'inhibitions)	28
Tableau 10: Profil d'inhibiton des isolats d'enterobacteries aux biocides.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 11: Sensibilité des isolats des enterobacteries et leur pourcentage.....	31
Tableau 12 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'AMINE sur les staphylocoques.....	32
Tableau 13: Resultats de l'effet inhibiteur de l'AMINE sur les enterobacteries	32
Tableau 14 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'DDAL AQ sur les staphylocoques	33
Tableau 15 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'DDAL AQ sur les Enterobacteries.....	33
Tableau 16: Résultats de l'effet inhibiteur de DDAC AQ sur les staphylocoques	34
Tableau 17: Résultats de l'effet inhibiteur de DDAC AQ sur les Enterobacteries	34
Tableau 18: Résultats de l'effet inhibiteur du détergent moussant , chlorés , acide péracétique et l'eau de javel.....	35
Tableau 19 : Résultats de l'effet inhibiteur du détergent moussant , chlorés , acide péracitique et l'eau de javel.....	35

Liste des figures

Figure 1 Laboratoire d'HIDAOA ,L'école nationale supérieure vétérinaire	18
Figure 2 Disposition des 7 disques en gélose (MH)	23
Figure 3: Résultats des test de sensibilité des isolats aux biocides utilisés (Diamètre d'inhibition)	25
Figure 4 : Résultats des tests de sensibilité de staphylocoques aux biocides (rayons d'inhibitions)	26
Figure 5 : Résultats de test de sensibilité des isolats de staphylocoques aux biocides (rayons d'inhibitions)	28
Figure 6 : Résultats des tests de sensibilité des isolats des Enterobacteries aux biocides (rayons d'inhibitions)	29
Figure 7 : Résultats de la sensibilité des isolats d'Enterobacteries	31
Figure 8 : Résultats de l'effet inhibiteur de l' AMINE sur les bacteries étudiées	32
Figure 9 : Résultats de l'effet inhibiteur de l' DDAL AQ sur les bacteries étudiées.....	33
Figure 10: Résultats de l'effet inhibiteur d' DDAC AQ sur les bacteries étudiées	34
Figure 11: Résultats de l'effet inhibiteur de détergent moussant , chlorés ,acide peracétique et l'eau de javel.....	36

Liste des abréviations

(AMM): Autorisation de mise sur le marché

(ANSES) : Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail

(CMI) : Concentration minimale inhibitrice

(EB) : *Entérobactérie*

(GN) :Gélose nutritive

(HOCL) : Acide hypochloreux

(MH) : Muller Hinton

(RPB) : Règlement sur les produits de biocides

(ST) : *Staphylococcus*

(UE): Union Européenne

Sommaire

Introduction.....	1
Partie bibliographique.....	2
CHAPITRE I BIOCIDES	3
I.1. Définition	4
I.2. Réglementation.....	4
I.2.2. Règlement délégué (UE) No. 698/2017	5
I.3. Classification et usage :.....	5
CHAPITRE II	12
IMPACT DES RESIDUS DES BIOCIDES SUR LA COLONISATION BACTERIENNE.....	12
II.1. Modes d'action des biocides et mécanismes de résistance chez les bactéries.....	13
II.1.1. Mode d'action des principales familles de substances biocides	13
II.1.2. Mécanismes de résistance	13
II.2. Méthodes d'évaluation de la résistance.....	14
Partie expérimentale.....	16
I. Objectif	17
II. Durée de l'études :	17
III. Lieu de l'étude :.....	17
IV. Matériels :.....	18
IV.1. Isolats bactériens étudiés :.....	18
IV.2. Biocides utilisés.....	19
IV.3. Matériels de laboratoire et Milieux de culture.....	20
V. Méthodes.....	20
V.1. Repiquage et revivification des isolats	20
V.2. Préparation des suspensions bactériennes	20
V.3. Préparation des disques des biocides à tester	21
V.4. Test de sensibilité aux biocides	22
Mode opératoire	22
V.5. Lecture	23
VI. Résultats	23
VI.1. Test de sensibilité des deux bactéries aux biocides	23

VI.2. Sensibilité des staphylocoques aux biocides	25
VI.3. Sensibilité des entérobactéries aux biocides.....	28
VI.3. Résultats de l'inhibition de la croissance bactérienne par biocide	31
VII. Discussion	36
Bibliographie.....	40

Introduction

L'industrie alimentaire est très concernée par les problèmes liés aux nettoyages et à la désinfection des locaux pour lutter contre les différentes sources de contamination. Ces opérations ont pour but d'éliminer les salissures ainsi que les contaminations d'origines microbiennes et chimiques.

Au quotidien, l'hygiène des surfaces dans l'industrie agroalimentaire constitue une préoccupation majeure. Afin d'assurer et de maintenir la propreté physique et l'innocuité vis-à-vis des contaminants, ces établissements procèdent à des désinfections rigoureuses par l'utilisation de désinfectants tels que les biocides.

Les biocides sont des substances destructrices des microorganismes tels que (les virus, bactéries, champignons...) (**Commission européenne, 2012**).

Ces désinfectants sont regroupés en familles, la famille la plus utilisée en agroalimentaire est celle des chlorées et les ammoniums quaternaires. Ces derniers sont connus pour leur forte activité antibactérienne, néanmoins leur toxicité est aussi élevée, d'où la nécessité de faire un bon rinçage final lors du protocole de nettoyage-désinfection afin d'éliminer toute trace de résidus.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris ce travail qui vise à étudier les différents biocides et leur efficacité à neutraliser les bactéries d'origine alimentaires.

Notre travail comporte :

1- Partie bibliographique : comporte deux chapitres :

- Le 1^{er} chapitre traite les différents biocides existant et leur utilité
- Le 2^{ème} chapitre évalue la résistance microbienne aux biocides.

2- Partie expérimentale où seront développés l'objectif de l'étude, les matériels et méthodes utilisés, les résultats obtenus et leur discussion et enfin une conclusion.

Partie

bibliographique

CHAPITRE I BIOCIDES

I.1. Définition

Un produit biocide est défini comme « toute substance ou ~~un~~ mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, qui est destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique » (**Commission européenne, 2012**).

De manière plus concise, les biocides sont représentés par des substances ayant des propriétés physico- chimiques capables de combattre les organismes vivants nuisibles, contribuant ainsi à la protection de l'Homme, des animaux, des plantes et de l'environnement. A titre d'exemple, les désinfectants, les insecticides et les produits de protection du bois sont répertoriés en tant que biocides. Ces produits sont généralement utilisés sous forme de formulations contenant une ou plusieurs substances actives d'origine minérale ou organique, associées à un ou plusieurs co-formulants. La substance active exerce une action sur ou contre les organismes nuisibles tandis que les co-formulants, dépourvus d'activité biologique, apporteront des propriétés supplémentaires, telles qu'une amélioration de la formulation et une facilité d'utilisation à la ou les substance(s) active(s) composants les produits(**Commission européenne, 2012**).

I.2. Réglementation

Puisque les biocides sont définis comme des produits permettant de détruire des nuisibles, un cadre législatif s'impose pour gérer ces substances.

I.2.1. Règlement sur les produits biocides [RPB, règlement (UE) No. 528/2012]

La mise en place par la Commission Européenne du Règlement sur les Produits Biocides (RPB) (UE) No. 528/2012 vise à encadrer la mise sur le marché des produits biocides et à harmoniser leurs utilisations en Europe. Le présent RPB impose de fournir une évaluation approfondie des risques pour l'Homme, l'animal ou l'environnement, et une preuve de l'efficacité de toutes substances actives définies comme produits biocides avant de faire l'objet d'une autorisation de mise sur le marché, délivrée au niveau national ou européen. En France, le ministère en charge

de l'environnement associé à l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) délivre les autorisations de mise sur le marché (AMM) de produits biocides qui découlent d'une évaluation préalable des substances actives et des produits biocides. Le RPB prévoit également une reconnaissance mutuelle des produits biocides entre tous les états membres si les fabricants souhaitent les commercialiser sur tout ou une partie du territoire européen (**Commission européenne, 2012**).

I.2.2. Règlement délégué (UE) No. 698/2017

Le règlement (UE) No. 698/2017 correspond au programme d'examen des substances actives existantes contenues dans des produits biocides visé dans le RPB. Bien qu'il permette de fournir la liste positive des substances actives présentes dans les produits biocides selon les usages (ex. désinfectants pour le traitement des surfaces alimentaires).

I.3. Classification et usage :

Les biocides sont classés en quatre grands groupes répartissant 22 types de produits différents (**Commission européenne, 2012**). On y retrouve :

- ✓ GROUPE 1 : Les **désinfectants** : Types de Produits 1 à 5 (ex. : utilisation dans le domaine privé et en santé publique, en hygiène humaine ou vétérinaire, pour la désinfection des surfaces ou des eaux de boisson).

- ✓ GROUPE 2 : Les **produits de protection** : Types de Produits 6 à 13 (ex. : produits de protection du bois contre les insectes ou les champignons, produits de protection du cuir, produits de protection des fluides utilisés dans la transformation des métaux).

- ✓ GROUPE 3 : Les **produits de lutte contre les nuisibles** : Types de Produits 14 à 20 (ex. : rodenticides, insecticides).

- ✓ GROUPE 4 : Les **autres produits biocides** : Types de Produits 21 et 22 (ex : peintures antisalissure appliquées sur les bateaux, fluides utilisés dans la taxidermie et la thanatopraxie).

L'usage et la description des différents biocides sont répertoriés dans le tableau N°1

Tableau 1 : Types de produits biocides et leur description (Commission européenne, 2012).

GROUPE 1 : Désinfectants		
Ces types de produits ne comprennent pas les produits nettoyants qui ne sont pas destinés à avoir un effet biocide, notamment la lessive liquide, la lessive en poudre et les produits similaires.		
Numéro	Types de produits	Description
TP1	Hygiène humaine	Les produits de cette catégorie sont des produits biocides utilisés pour l'hygiène humaine, appliqués sur la peau humaine ou le cuir chevelu ou en contact avec celle-ci ou celui-ci, dans le but principal de désinfecter la peau ou le cuir chevelu.
TP2	Désinfectants et produits algicides non destinés à l'application directe sur des êtres humains ou des animaux	<p>Produits utilisés pour désinfecter les surfaces, les matériaux, les équipements et le mobilier qui ne sont pas utilisés en contact direct avec les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux. Les lieux d'utilisation incluent notamment les piscines, les aquariums, les eaux de bassin et les autres eaux, les systèmes de climatisation, ainsi que les murs et sols dans les lieux privés, publics et industriels et dans d'autres lieux d'activités professionnelles.</p> <p>Produits utilisés pour désinfecter l'air, les eaux non utilisées pour la consommation humaine ou animale, les toilettes chimiques, les eaux usées, les déchets d'hôpitaux et le sol.</p> <p>Produits utilisés comme produits algicides pour le</p>

		<p>traitement des piscines, des aquariums et des autres eaux, ainsi que pour le traitement curatif des matériaux de construction.</p> <p>Produits utilisés pour être incorporés dans les textiles, les tissus, les masques, les peintures et d'autres articles ou matériaux, afin de produire des articles traités possédant des propriétés désinfectantes.</p>
TP3	Hygiène vétérinaire	<p>Produits utilisés pour l'hygiène vétérinaire, tels que désinfectants, savons désinfectants, produits d'hygiène buccale ou corporelle ou ayant une fonction antimicrobienne.</p> <p>Produits utilisés pour désinfecter les matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux.</p>
TP4	Surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux	<p>Produits utilisés pour désinfecter le matériel, les conteneurs, les ustensiles de consommation, les surfaces ou conduits utilisés pour la production, le transport, le stockage ou la consommation de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux (y compris l'eau potable) destinés aux hommes ou aux animaux.</p> <p>Produits utilisés pour l'imprégnation des matériaux susceptibles d'entrer en contact avec des denrées alimentaires.</p>
TP5	Eau potable	Produits utilisés pour désinfecter l'eau potable destinée aux hommes et aux animaux.

GROUPE 2 : Produits de protection

Sauf indication contraire, ces types de produits ne concernent que des produits visant à prévenir le développement microbien et le développement des algues.

Numéro	Types de produits	Description
TP6	Protection des produits pendant le stockage	<p>Produits utilisés pour protéger les produits manufacturés, autres que les denrées alimentaires, les aliments pour animaux, les produits cosmétiques, les médicaments ou les dispositifs médicaux, par la maîtrise des altérations microbiennes afin de garantir leur durée de conservation.</p> <p>Produits utilisés comme produits de protection pour le stockage ou l'utilisation d'appâts rodenticides, insecticides ou autres.</p>
TP7	Produits de protection pour les pellicules	<p>Produits utilisés pour protéger les pellicules ou les revêtements par la maîtrise des altérations microbiennes ou de la croissance des algues afin de sauvegarder les propriétés initiales de la surface des matériaux ou objets tels que les peintures, les plastiques, les enduits étanches, les adhésifs muraux, les liants, les papiers et les œuvres d'art.</p>
TP8	Produits de protection du bois	<p>Produits utilisés pour protéger le bois provenant de scieries, y compris pendant la phase de transformation dans la scierie, ou les produits du bois par la maîtrise des organismes qui détruisent ou déforment le bois, y compris les insectes.</p> <p>Ce type de produits comprend à la fois les produits de traitement préventifs et curatifs.</p>

TP9	Produits de protection des fibres, du cuir, du caoutchouc et des matériaux polymérisés	<p>Produits utilisés pour protéger les matières fibreuses ou polymérisées telles que le cuir, le caoutchouc, le papier ou les produits textiles par la maîtrise des altérations microbiologiques.</p> <p>Ce type de produits comprend les produits biocides qui empêchent l'accumulation de microorganismes sur la surface des matériaux et qui préviennent ou empêchent la formation d'odeurs et/ou qui présentent d'autres types d'avantages.</p>
TP10	Produits de protection des matériaux de construction	Produits utilisés pour protéger les ouvrages de maçonnerie, les matériaux composites ou les matériaux de construction autres que le bois par la lutte contre les attaques microbiologiques et les algues.
TP11	Produits de protection des liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication	<p>Produits utilisés pour protéger l'eau ou les autres liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication par la lutte contre les organismes nuisibles tels que les microbes, les algues et les moules.</p> <p>Les produits utilisés pour désinfecter l'eau potable ou l'eau des piscines ne sont pas compris dans ce type de produits.</p>
TP12	Produits anti-biofilm	Produits utilisés pour prévenir ou lutter contre la formation d'un biofilm sur les matériaux, équipements et structures utilisés dans l'industrie, par exemple sur le bois et la pâte à papier ou les strates de sable poreuses dans l'industrie de l'extraction du pétrole.
TP13	Produits de protection des fluides de travail ou de coupe	Produits pour lutter contre les altérations microbiennes des fluides utilisés pour le travail ou la coupe du métal, du verre ou d'autres matériaux.

GROUPE 3 : Produits de lutte contre les nuisibles

Numéro	Types de produits	Description
TP14	Rodenticides	Produits utilisés pour lutter contre les souris, les rats ou autres rongeurs, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP15	Avicides	Produits utilisés pour lutter contre les oiseaux, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP16	Molluscicides, vermicides et produits utilisés pour lutter contre les autres invertébrés	Produits utilisés pour lutter contre les mollusques, les vers et les invertébrés non couverts par d'autres types de produits, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP17	Piscicides	Produits utilisés pour lutter contre les poissons, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP18	Insecticides, acaricides et produits utilisés pour lutter contre les autres arthropodes	Produits utilisés pour lutter contre les arthropodes (tels que les insectes, les arachnides et les crustacés), par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP19	Répulsifs et appâts	Produits utilisés pour lutter contre les organismes nuisibles (qu'il s'agisse d'invertébrés comme les puces ou de vertébrés comme les oiseaux, les poissons ou les rongeurs), en les repoussant ou en les attirant, y compris les produits utilisés, pour l'hygiène humaine ou vétérinaire, directement sur la peau ou indirectement dans l'environnement de l'homme ou des animaux.
TP20	Lutte contre d'autres vertébrés	Produits utilisés pour lutter contre les vertébrés autres que ceux déjà couverts par les autres types de produits de ce groupe, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou

		en les attirant.
GROUPE 4: Autres produits biocides		
Numéro	Types de produits	Description
TP21	Produits antisalissure	Produits utilisés pour lutter contre le développement et le dépôt d'organismes salissants (microbes et formes supérieures d'espèces végétales ou animales) sur les navires, le matériel d'aquaculture ou d'autres installations utilisées en milieu aquatique.
TP22	Fluides utilisés pour L'embaumement et la Taxidermie	Produits utilisés pour désinfecter et préserver la totalité ou certaines parties de cadavres humains ou animaux.

CHAPITRE II

IMPACT DES RESIDUS DES BIOCIDES SUR LA COLONISATION BACTERIENNE

II.1. Modes d'action des biocides et mécanismes de résistance chez les bactéries

II.1.1. Mode d'action des principales familles de substances biocides

Les modes d'action des biocides antibactériens peuvent être définis en fonction des structures bactériennes ciblées. Ainsi, quatre sites d'action sont décrits. Ils sont représentés dans le tableau N°2.

Tableau N°2. : Différentes familles de biocides antibactériens et les structures bactériennes ciblées (ANSES, 2018)

Action sur la paroi Cellulaire	Action sur la membrane	Action sur les Protéines	Action sur les acides nucléique
Alcools	Acides	Acides	Acides
Aldéhydes	Alcools	Alcools	Alcools
Bases	Ammoniums quaternaires	Aldéhydes	Aldéhydes
Phénols	Bases	Bases	Biguanides
	Biguanides	Biguanides	Halogènes et dérivés
	Isothiazolinones	Isothiazolinones	Métaux
	Métaux	Métaux	Oxydants
	Oxydants Phénols	Oxydants	
		Phénols	

La grande majorité des biocides antibactériens agissent sur plusieurs cibles compte-tenu de la réactivité chimique de la plupart d'entre eux (ANSES, 2018).

II.1.2. Mécanismes de résistance

La résistance des bactéries aux biocides peut être classée en deux catégories : intrinsèque et acquise. La résistance intrinsèque se définit comme une propriété déjà existante et inhérente à une espèce donnée, entraînant une baisse de la sensibilité ou une insensibilité au biocide (ANSES, 2018).

Dans le cadre de cette saisine, seuls les phénomènes liés à la résistance acquise, susceptible de se développer lors de l'usage de biocides antibactériens, sont analysés.

La résistance est acquise, soit par transfert de gènes de résistance lors du contact entre deux bactéries selon un mécanisme principal dit de conjugaison en plus des mécanismes d'expression, de transduction et transformation, soit par mutation sur le chromosome bactérien de gènes régulateurs (ANSES, 2018).

Concernant les mécanismes de résistance acquise, de nombreux travaux démontrent qu'ils reposent sur plusieurs grands mécanismes : modulation de l'activité des pompes à efflux, inactivation du biocide, modification de la cible, transfert horizontal de gènes, ou encore modification des propriétés membranaires. Ces mécanismes de résistance visent à contrer le mode d'action du biocide, c'est-à-dire empêcher la liaison du biocide à son site d'action (ANSES, 2018).

A cela s'ajoute les cas particuliers que représentent les biofilms et l'effet protecteur par les protozoaires. Pour les biofilms, à côté des mécanismes cités précédemment, existent certains effets inhérents à ses structures comme par exemple les diffusions limitées des substances biocides à travers la matrice, la diversité des états physiologiques des bactéries en lien avec des gradients de nutriments et d'oxygène, les phénomènes de communication, les interactions avec une grande diversité de constituants des biofilms et la plus grande capacité à transférer du matériel génétique porteur de gènes de résistance (ANSES, 2018).

II.2.Méthodes d'évaluation de la résistance

Les travaux relatifs à l'évaluation de la résistance des bactéries aux substances biocides ont communément l'objectif de savoir si certaines espèces bactériennes ont intrinsèquement une capacité d'adaptation à l'exposition aux biocides en devenant plus résistantes à ce biocide. Dans les cas où une telle capacité d'adaptation est observée, il s'agit alors d'en apprécier l'amplitude, en connaître la stabilité, et étudier si une résistance croisée, vis-à-vis d'autres antibactériens (autres biocides ou antibiotiques), se développe aussi (ANSES, 2018).

Trois phases ont été établies après une recherche approfondie :

- La 1^{ère} permet d'apprécier la capacité des souches bactériennes testées à réagir et à s'adapter à un environnement constitué de biocides.

- La deuxième permet de caractériser la stabilité de l'adaptation : transitoire, (disparaissant après arrêt de l'exposition au biocide), ou stable/irréversible (se maintenant après l'arrêt de l'exposition au biocide).
- La 3^{ème} permet de déterminer le niveau de résistance (**ANSES, 2018**).

La capacité d'adaptation des bactéries est évaluée suite à un contact de la population bactérienne avec le biocide testé selon des conditions opératoires qui peuvent être variées (contacts uniques ou répétés, avec des concentrations faibles ou fortes), puis la recherche de la stabilité de cette résistance chez des bactéries (après exposition dans un milieu sans le biocide testé). Le cas échéant, les résistances croisées à d'autres biocides ou/et à des antibiotiques sont aussi évaluées. La recherche des mécanismes (gènes de résistance, mutation, ...) peut aussi compléter ces études (**ANSES, 2018**).

Le niveau de résistance de bactéries à un biocide ou un antibiotique est généralement évalué via l'évolution de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), la cinétique de destruction et la cinétique de croissance. D'autres méthodes existent aussi, permettant d'affiner l'analyse du niveau de résistance observée (cytométrie de flux, détection de gènes de résistance) (**ANSES, 2018**).

Pour les cas particuliers des biofilms, il existe peu de méthodes standards pour évaluer la sensibilité de cellules bactériennes au sein de biofilms aux biocides désinfectants. Les méthodes les plus communément employées sont les suivantes : la détermination de la concentration minimale d'éradication du biofilm (CMEB) et le rapport des concentrations (R_c) ou des temps (R_t) requis pour obtenir la même réduction dans la population planctonique ou de biofilm, ou en comparant les réductions obtenues après exposition à la même concentration sur la même période de temps (**ANSES, 2018**).

Partie expérimentale

I. Objectif

Notre travail a pour objectif de contribuer à évaluer le degré d'efficacité des biocides utilisés en industrie agroalimentaire sur deux espèces bactériennes :

- Staphylococcus : responsable de TIAC
- Entérobactérie : flore indicatrice d'hygiène

Le choix des biocides utilisés s'est basé sur les produits les plus utilisés en industrie agroalimentaires et ceux considérés comme efficaces par cette dernière

Nous avons étudié : les Amines, les désinfectants à base d'ammonium quaternaire, ceux à base de chlore et de l'eau de javel.

II. Durée de l'études :

Notre étude expérimentale a été réalisée d'une seule période qui a duré un mois (MAI, 2022)

III. Lieu de l'étude :

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire d'HIDAOA à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'ALGER (**figure 1**)



Figure 1 : Laboratoire d'HIDAOA de l'école nationale supérieure vétérinaire (photo personnelle)

IV. Matériels :

IV.1. Isolats bactériens étudiés :

Les isolats de staphylocoques et des entérobactéries (tableau 3) utilisés dans cette étude ont été isolés à partir des échantillons de lait.

Tableau 1 : Espèces bactériennes étudiée

Espèces	Nombre d'isolat	Codification
<i>Staphylococcus</i> spp	11 isolats	St 1 , St2 , St3, St4, St5 , St6, St7 , St8 , St 9 , St 10, St11
Entérobactéries	15 isolats	Eb1, Eb2, Eb3 , Eb4, Eb5, Eb7 , Eb8 ,Eb9, Eb10, Eb11 , Eb12, Eb13, Eb14, Eb15.

IV.2. Biocides utilisés

Nous avons testé la sensibilité des bactéries à 11 biocides (tableau 4)

Les concentrations utilisées ont été élaborées en fonction des :

- Recommandations des fournisseurs
- Concentrations utilisées par les industriels

Nous avons également utilisé un témoin négatif (eau) et un témoin positif (disque de méthicilline).

Tableau 2: Biocides utilisés

BIOCIDE	ABREVIATION	POURCENTAGE
Amine	AMINE	2%
Détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire	DDAL AQ	2%
Détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire	DDAC AQ	1%
Détergent désinfectant alcalin moussant a haut pouvoir nettoyant	DDALM AQ	1%
Détergent désinfectant acide moussant à base d'ammonium quaternaire	DDACM AQ	2%
Détergent alcalin à base de chlore actif	DAL CA	1%
Détergent désinfectant alcalin à base de chlore	DDAL C	2%
Détergent désinfectant alcalin moussant à base d'hypochlorite de sodium	DDALM HS	3%
Acide peracétique	APA	0.5%
Eau de javel	EJ1	2%
Eau de javel dilué	EJ2	2%

IV.3. Matériels de laboratoire et Milieux de culture

- Étuve microbiologique
- Bec bunsen
- Balance électronique
- Autoclave
- Densitomètre
- Boite de pétri
- Tube à essai
- Eau physiologique stérile
- Pipettes pasteur
- Ecouillons
- Tubes de conservation
- Anse de platine
- Micropipettes
- Disque en papier (6mm de diamètre)
- Agitateur magnétique
- Flacon en verre
- Pincettes
- Gélose nutritive (GN)
- Gélose Mueller Hinton (MH)

V. Méthodes

V.1. Repiquage et revivification des isolats

Chaque isolat de *Staphylococcus* et des *Eenterobacterie* qui étaient conservés au froid a fait l'objet d'une revivification sur GN. Chaque boîte estensemencée par un isolats bien identifié puis incubée pendant 24 heures à 37°C.

V.2. Préparation des suspensions bactériennes

Après repiquage et incubation des isolats pendant 24 heures à 37°C, pour chaque boîte de pétri

quelques colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et introduites dans un tube à hémolyse qui contient 5 ml d'eau physiologique. L'inoculum est ajusté à 0.5 MCF à l'aide d'un densimètre ; soit en ajoutant de la culture à la suspension soit de l'eau physiologique stérile.

V.3.Préparation des disques des biocides à tester

Pour appliquer la méthode de diffusion par disque (méthode de Kirby-Bauer) il faut tout d'abord préparer les solutions de biocides à tester ainsi que les spots en papier.

V.3.1. Préparation des solutions de biocides

- Dans chaque tube, verser 10 ml d'eau physiologique.
 - Ajouter un volume précis (V1, V2, V3... V7) de chaque biocide.
 - Les volumes ajoutés sont calculés comme suit :
- ✓ AMINE à 2 % (2 ml d'AMINE dans 100ml d'eau physiologique). Dans le premier tube nous avons 10 ml d'eau physiologique, donc on rajoute V1= 0,2ml pour obtenir une concentration de 2%
- ✓ MDs à 2 % (2 ml du MDs 100 ml de l'eau physiologique) . Dans le deuxième tube nous avons 10 ml d'eau physiologique, donc on rajoute V1= 0,2ml pour obtenir une concentration de 2%
- ✓ V2 = 0.2 ml et ainsi de suite pour les biocides restants.
- ✓ V3 = 0.1 ml de detergacid
- ✓ V4 =0.1 ml de NDME co
- ✓ V5 = 0.1 ml de QUacid
- ✓ V6 = 0.1 ml de 6010
- ✓ V7 = 0.2 ml de FC310
- ✓ V8 = 0.3 ml de MCL
- ✓ V9 = 0.05 ml de Perakim
- ✓ V10 = 0.2 ml de EJ
- ✓ V11 = 0.2 ml de EJD

V.3.2. Préparation des spots

Les disques préparés sont imprégnés des solutions de biocides à tester en respectant les

concentrations préconisées et les volumes calculés

V.4. Test de sensibilité aux biocides

Nous avons testé la sensibilité de deux espèces bactériennes vis-à-vis des différents biocides listés dans le tableau (2) en mettant en application la méthode de Kirby-Bauer basée sur la diffusion des disques imprégnés de biocides à tester sur la gélose Mueller Hintonensemencée de bactéries à étudier ; après l'incubation, il est possible d'observer les résultats qui s'expriment sous forme de zone d'inhibition autour du disque où la bactérie qui n'a pas pu pousser

Mode opératoire

L'ensemencement des boîtes de MH est réalisé en appliquant la méthode de Kirby-Bauer : Un écouvillon stérile est introduit dans le tube contenant la suspension bactérienne, puis essoré en l'épongeant légèrement afin de d'éliminer le surplus au maximum. La totalité de la surface de la boîte de pétri estensemencée en réalisant des stries serrées de haut en bas de gauche à droite et en pivotant l'écouvillon sur lui-même.

L'opération est ainsi répétée trois fois en tournant la boîte à 60° deux fois.

Les disques imprégnés de biocides sont déposés à la surface de la gélose (7 disques par boîte) en les appliquant délicatement à l'aide d'une pince stérile, en respectant l'ordre comme sur la figure 2

Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé. Les boîtes sont immédiatement incubées pendant 16h à 37°C.

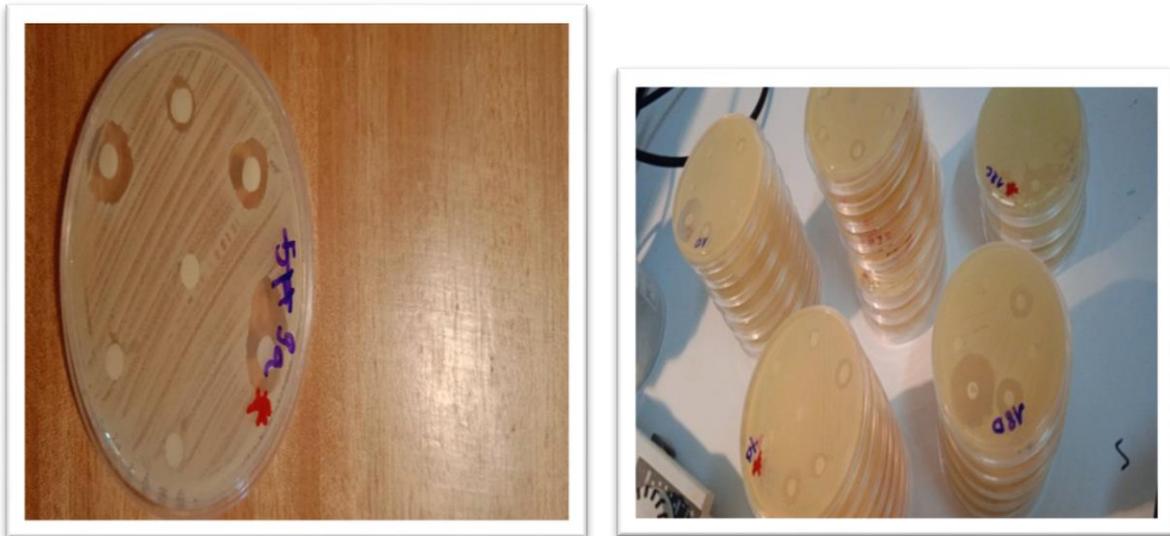


Figure 2 : Disposition des 7 disques sur la gélose (MH) (photo personnelle)

V.5.Lecture

L'inhibition de croissance bactérienne conduit à la formation d'une zone claire (zone d'inhibition) autour des disques de biocides.

Après 16 heures d'incubation, les rayons sont mesurés à partir du centre du disque jusqu'au bord externe de la zone d'inhibition (en millimètres) à l'aide d'un pied à coulisse ; puis comparés aux valeurs critiques et l'action inhibitrice est catégorisée selon la méthode de Wandja et *al* (2020) en :

1. Non inhibitrice si le rayon (R) d'inhibition est $0 \leq R \leq 8,5$ mm (bactérie résistante).
2. Moyennement inhibitrice si le rayon (R) d'inhibition est $8,5 < R \leq 12,5$ mm (bactérie moyennement résistante).
3. Forte inhibitrice si le rayon (R) d'inhibition est $12,5 < R \leq 17,5$ mm (bactérie sensible).

VI. Résultats

VI.1. Test de sensibilité des deux bactéries aux biocides

Les résultats du test de sensibilité des deux bactéries aux biocides sont représentés dans le tableau 5. Les diamètres d'inhibition sont représentés dans la figure 3.

Tableau 3 : Résultats des tests de sensibilité aux biocides (Diametres d'inhibiton)

Biocides Isolat	Amine	DD AL AQ	DD AC AQ	DDA CM AQ	DDA LM AQ	DAL CA	DD AL C	DDA LM HS	APA	EJ1	EJ2	MET
ST1	17	16	16	15	10	8	9	8	9	13	10	3
ST2	13	9	15	14	15	7	7	7	13	13	10	2.4
ST3	18	17	16	15	15	7	8	7	8	8	7	3
ST4	13	10	17	14	13	8	9	7	10	10	9	2.3
ST5	18	13	18	16	16	7	8	7	11	11	8	3
ST6	11	11	16	0	0	8	9	7	10	12	8	2.3
ST7	15	17	14	13	0	7	7	7	7	7	8	2.7
ST8	12	12	18	14	13	7	7	10	7	7	7	2.2
ST9	10	12	15	16	14	7	7	7	8	13	7	2.4
ST10	16	11	16	15	14	7	7	7	9	10	10	2.4
ST11	19	17	14	15	15	7	8	8	11	8	9	2.7
EB1	10	10	14	11	9	7	7	7	8	9	12	0.6
EB2	13	12	13	12	9	7	7	7	10	11	11	2.3
EB3	8	8	8	9	8	7	7	7	9	11	9	1.6
EB4	7	8	9	9	8	9	7	8	10	10	10	2
EB5	11	12	14	10	11	7	8	7	10	10	8	0.7
EB5	6	10	13	12	9	8	9	9	9	12	7	0.9
EB7	12	13	8	11	8	8	8	7	10	10	10	2.5
EB8	9	9	9	13	10	9	7	7	10	11	11	2.6
EB9	9	9	11	13	9	7	7	7	12	12	7	1.4
EB10	7	9	16	16	11	7	9	7	8	8	8	0.6
EB11	9	13	12	14	12	8	9	7	9	9	7	2.4
EB12	14	12	18	14	13	7	7	7	10	10	8	2.2
EB13	12	11	11	13	9	7	7	7	8	8	8	2.6
EB14	16	11	14	11	11	7	7	7	12	12	11	0.8
EB15	18	12	14	11	11	8	9	8	10	10	10	3

ST : *staphylococcus* ; **EB** : *Entrobacters* ; **DDAL AQ** : Détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire ; **DDAC AQ** : Détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire **DDACM AQ** : Détergent désinfectant alcalin moussant a haut pouvoir nettoyant ; **DDALM AQ** : Détergent désinfectant acide moussant à base d'ammonium quaternaire ; **DAL CA** : Détergent alcalin à base de chlore actif ; **DDALC** : Détergent désinfectant alcalin à base de chlore ; **DDALM HS** : Détergent désinfectant alcalin moussant à base d'hypochlorite de sodium ; **APA** : acide peracétique ; **EJ1** : eau javel ; **EJ2** : eau javel dilué ; **MET** :méthicilline.

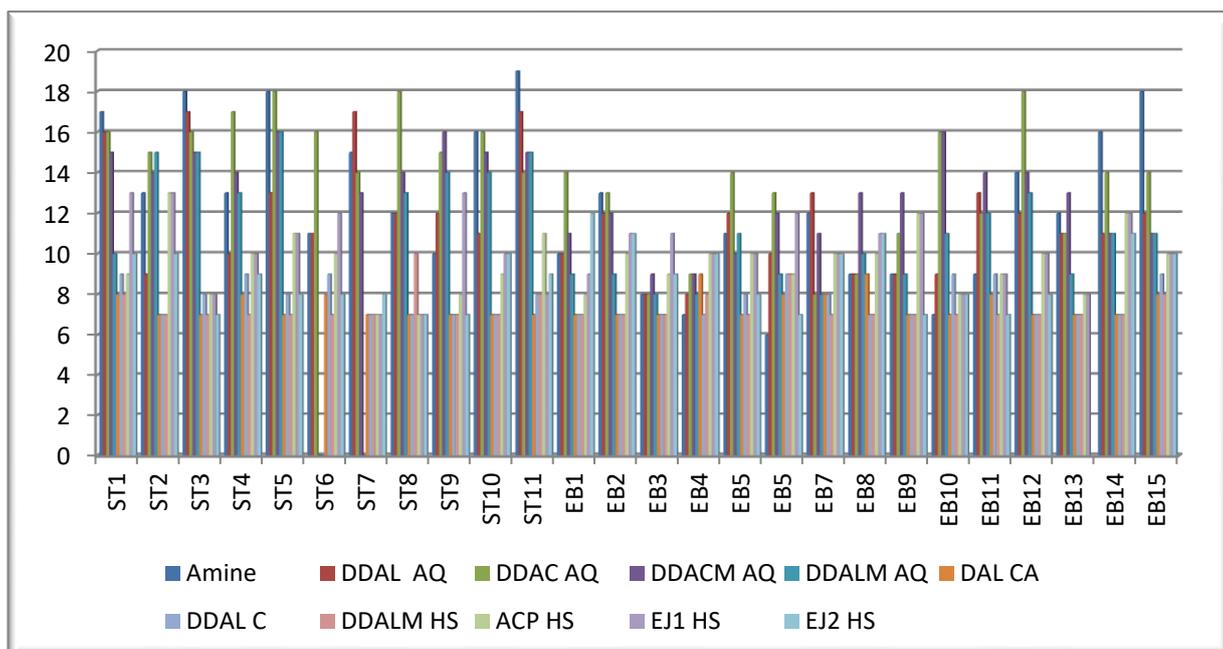


Figure 3: diametres d'inhibition des biocides utilisés

Les résultats globaux obtenus montrent que les diamètre d'inhibition sont réduits, ils varient entre (8-18 mm) et que les staphylocoques sont plus sensibles aux amines que les entérobactéries.

VI.2. Sensibilité des staphylocoques aux biocides

Les résultats des tests de sensibilité des isolats de Staphylocoque aux biocides sont représentés dans l' tableau N°6 et la figure (4).

Tableau 4 : Résultats des tests de sensibilités des isolats de staphylococcus aux biocides (rayons d'inhibitions)

Isolat	Biocides										
	AMINE	DD AL AQ	DD AC AQ	DD ACM AQ	DD ALM AQ	DAL CA	DD AL C	DD ALM HS	APA	EJ1	EJ2
ST1	8.5	8	8	7.5	5	4	4.5	4	4.5	6.5	5
ST2	6.5	4.5	7.5	7	7.5	3.5	3.5	3.5	7.5	6.5	5
ST3	9	8.5	8	7.5	7.5	3.5	4	3.5	4	4	3.5
ST4	6.5	5	8.5	7	6.5	4	4.5	3.5	5	5	4.5
ST5	9	6.5	9	8	8	3.5	4	3.5	5.5	5.5	4
ST6	5.5	5.5	8	0	0	4	4.5	3.5	5	6	4
ST7	7.5	8.5	7	6.5	0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4
ST8	6	6	8	7	6.5	3.5	3.5	5.5	3.5	3.5	3.5
ST9	5	6	7.5	8	7	3.5	3.5	3.5	4	6.5	3.5

ST10	8	.5	8	7.5	7	3.5	3.5	3.5	4.5	5	5
ST11	9.5	8.5	7	7.5	7.5	3.5	4	4	5.5	4	4.5

ST : *staphylococcus* ; **DDAL AQ** : Détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire ; **DDACAQ** : Détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire **DDACM AQ** : Détergent désinfectant alcalin moussant a haut pouvoir nettoyant ; **DDALM AQ** : Détergent désinfectant acide moussant à base d'ammonium quaternaire ; **DAL CA** : Détergent alcalin à base de chlore actif ; **DDALC** : Détergent désinfectant alcalin à base de chlore ; **DDALM HS** : Détergent désinfectant alcalin moussant à base d'hypochlorite de sodium ; **APA** : acide péraçitique ; **EJ1** : eau javel(1%) ; **EJ2** : eau javel dilué (2%)

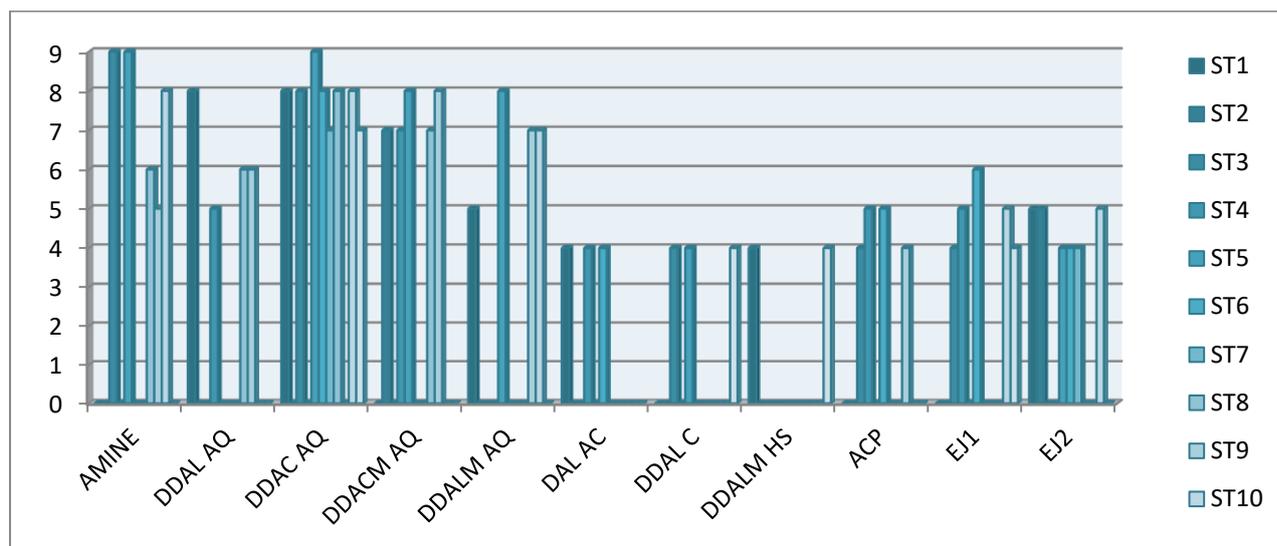


Figure 4 : Résultats des tests de sensibilité de staphylocoques aux biocides(rayonsd'inhibitions)

Tableau 5 : Profil d'inhibition des isolats de staphylocoques .

Biocides Isolats	AMINE	DDA L AQ	DDAC AQ	DDACM AQ	DDALM AQ	DAL CA	DDAL C	DDAL M HS	APA	EJ1	EJ2
ST1	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST3	MI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST4	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST5	MI	NI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST6	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST7	NI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST8	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST10	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ST11	MI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

ST : *staphylococcus* ; **DDAL AQ** : Détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire ; **DDAC AQ** : Détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire **DDACM AQ** : Détergent désinfectant alcalin moussant a haut pouvoir nettoyant ; **DDALM AQ** : Détergent désinfectant acide moussant à base d'ammonium quaternaire ; **DAL CA** : Détergent alcalin à base de chlore actif ; **DDALC** : Détergent désinfectant alcalin à base de chlore ; **DDALM HS** : Détergent désinfectant alcalin moussant à base d'hypochlorite de sodium ; **APA** : acide péracétique ; **EJ1** : eau javel(1%) ; **EJ2** : eau javel dilué (2%) ; **NI** :Non-inhibiteur ; **MI** : Moyennement inhibiteur ; **FI** : Fortement inhibiteur.

a) **Profils d'inhibitions :**

Les profils d'inhibitions des isolats de Staphylocoques sont représentés dans le tableau 7

b. En fonction de leur sensibilité à un ou plusieurs biocides, les isolats de staphylocoques ont été classés et les pourcentages ont été calculés. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 8 et la figure 5.

Tableau 6 : Sensibilité des isolats de staphylococcus et leur pourcentages

Sensibilité	Pas de sensibilité	Sensibilité à un seul désinfectant	Sensibilité à deux désinfectants
Nombre d'isolats	5	4	2
Intervalle des rayons de la zone d'inhibition	Entre 0-7mm	Entre 8-9mm	Entre 8-9mm
Pourcentage (%)	45.5%	36.4%	18.2%

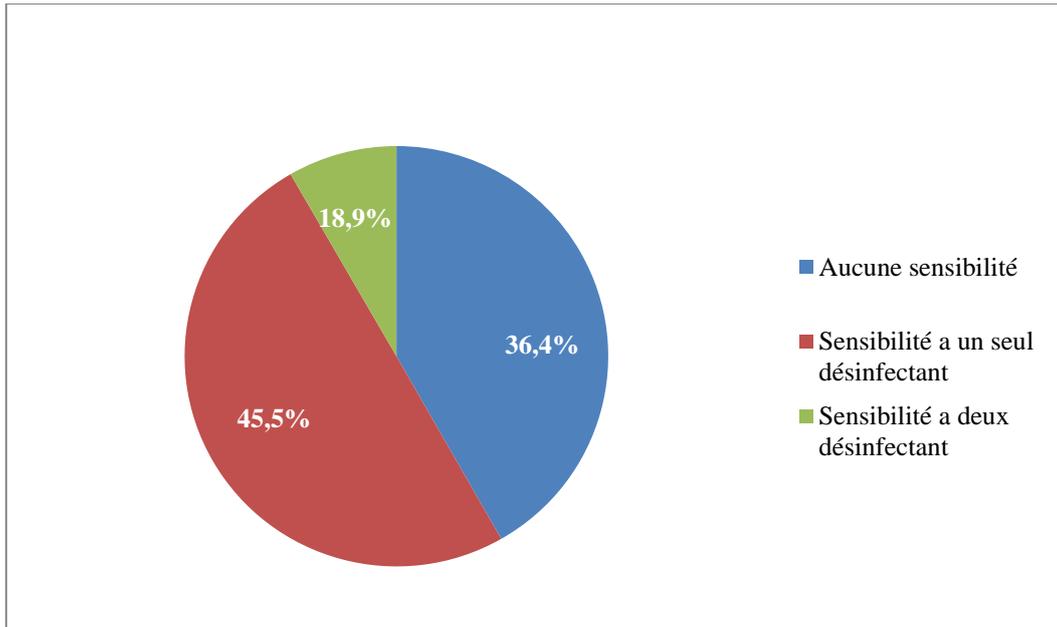


Figure 5 : Classification et pourcentage des isolats de staphylocoques selon leur sensibilité aux biocides (rayons d'inhibitions)

VI.3. Sensibilité des entérobactéries aux biocides

Les résultats des tests de sensibilité des isolats des entérobactéries aux biocides sont représentés dans le tableau (9) et la figure (6).

Tableau 7 : Résultats de test de sensibilité des entérobactéries aux biocides (rayons d'inhibitions)

Isolat	Biocides										
	MINE	DAL AQ	DAC AQ	DACM AQ	DALM AQ	DAL CA	DAL C	DALM HS	PA	1	2
EB1	5	5	7	5.5	4.5	3.5	3.5	3.5	4	4.5	6
EB2	6.5	6	6.5	6	4.5	3.5	3.5	3.5	5	5.5	5.5
EB3	4	4	4	4.5	4	3.5	3.5	3.5	4.5	5.5	4.5
EB4	3.5	4	4.5	4.5	4	4.5	3.5	4	5	5	5
EB5	5.5	6	7	5	5.5	3.5	4	3.5	5	5	4
EB5	3	5	6.5	6	4.5	4	4.5	4.5	4.5	6	3.5
EB7	6	6.5	4	5.5	4	4	4	3.5	5	5	5

EB8	4.5	4.5	4.5	6.5	5	4.5	3.5	3.5	5	5.5	5.5
EB9	4.5	4.5	5.5	6.5	4.5	3.5	3.5	3.5	6	6	3.5
EB10	3.5	4.5	8	8	5.5	3.5	4.5	3.5	4	4	4
EB11	4.5	6.5	6	7	6	4	4.5	3.5	4.5	4.5	3.5
EB12	7	6	9	7	6.5	3.5	3.5	3.5	5	5	4
EB13	6	5.5	5.5	6.5	4.5	3.5	3.5	3.5	4	4	4
EB14	8	5.5	7	5.5	5.5	3.5	3.5	3.5	6	6	5.5
EB15	9	6	7	5.5	5.5	4	4.5	4	5	5	5

EB : Entérobactéries; **DDAL AQ** : Détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire ; **DDAC AQ** : Détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire **DDACM AQ** : Détergent désinfectant alcalin moussant a haut pouvoir nettoyant ; **DDALM AQ** : Détergent désinfectant acide moussant à base d'ammonium quaternaire ; **DAL CA** : Détergent alcalin à base de chlore actif ; **DDALC** : Détergent désinfectant alcalin à base de chlore ; **DDALM HS** : Détergent désinfectant alcalin moussant à base d'hypochlorite de sodium ; **APA** : acide péraétique ; **EJ1** : eau javel(1%) ; **EJ2** : eau javel dilué (2%)

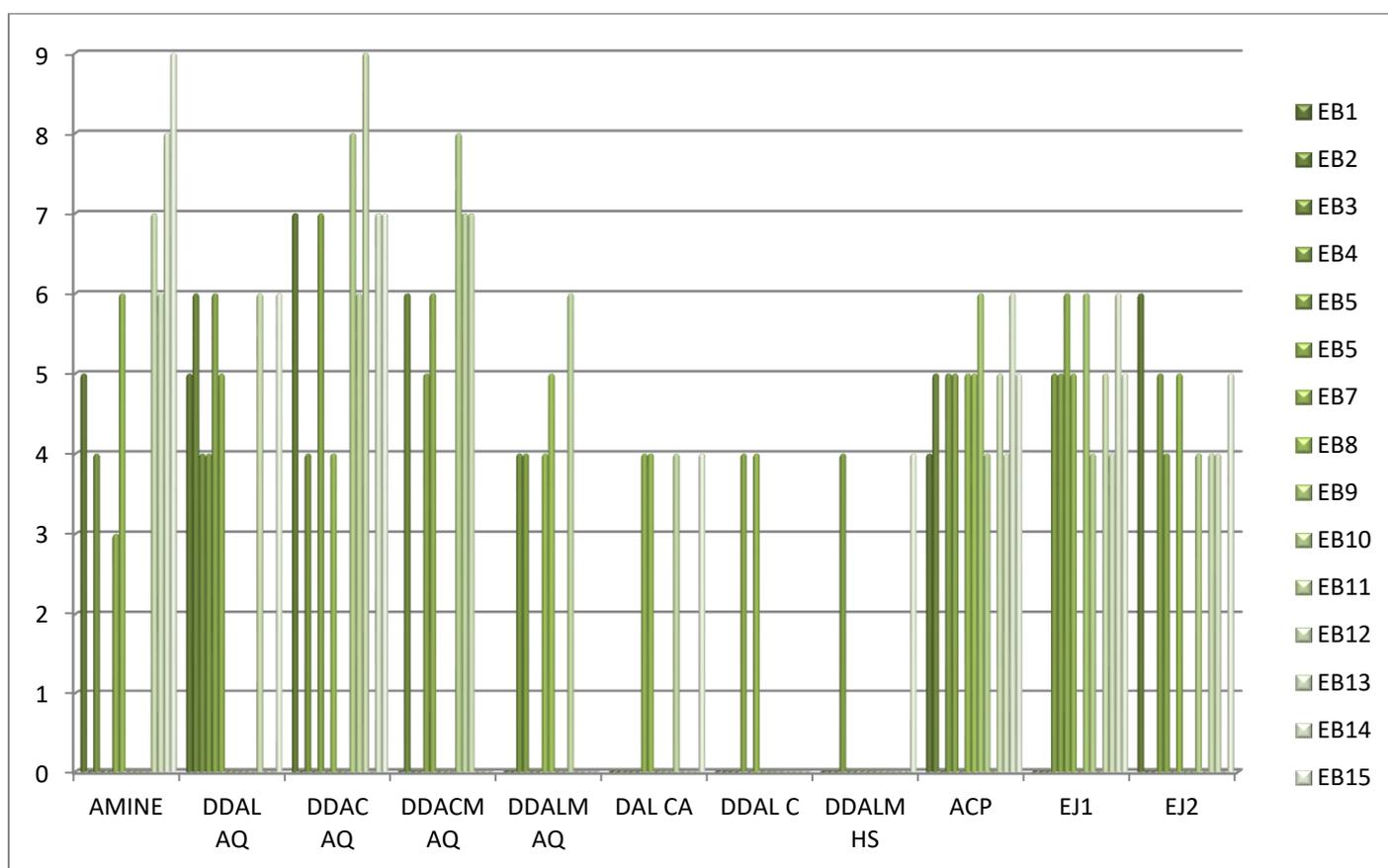


Figure 6 : Résultats des tests de sensibilité des isolats des entérobactéries aux biocides (rayons d'inhibitions)

a) Profils d'inhibitions :

Les profils d'inhibitions des isolats des entérobactéries sont représentés dans le tableau 10

Tableau 8: Profil d'inhibiton des isolats d'enterobacters aux biocides

Biocides Isolat	AMINE	DDAL AQ	DDAC AQ	DACM AQ	DALM AQ	DAL CA	DDAL C	DDALM HS	APA	EJ1	EJ2
EB1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB4	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB5	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB5	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB8	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB10	NI	NI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB11	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB12	NI	NI	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB13	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB14	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
EB15	MI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

EB : Entérobactéries; **DDAL AQ :** Détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire ; **DDAC AQ :** Détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire **DDACM AQ :** Détergent désinfectant alcalin moussant a haut pouvoir nettoyant ; **DDALM AQ :** Détergent désinfectant acide moussant à base d'ammonium quaternaire ; **DAL CA :** Détergent alcalin à base de chlore actif ; **DDALC :** Détergent désinfectant alcalin à base de chlore ; **DDALM HS :** Détergent désinfectant alcalin moussant à base d'hypochlorite de sodium ; **APA :** acide péraétique ; **EJ1 :** eau javel(1%) ; **EJ2 :** eau javel dilué (2%) **NI :**Non-inhibiteur ; **MI :** Moyennement inhibiteur ; **FI :** Fortement inhibiteu

b. En fonction de leur sensibilité à un ou plusieurs biocides, les isolats des entérobactéries ont été classés et les pourcentages ont été calculés. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 11 et la figure 6.

Tableau 9: Sensibilité des isolats des entérobactéries et leur pourcentage

Sensibilité	Pas de sensibilité	Sensibilité à un seul désinfectant	Sensibilité à deux désinfectants
Isolat	11	4	0
Intervalle des rayons de la zone d'inhibition	Entre 0-7mm	Entre 8-9mm	0
Pourcentage (%)	73.3%	26.7%	0%

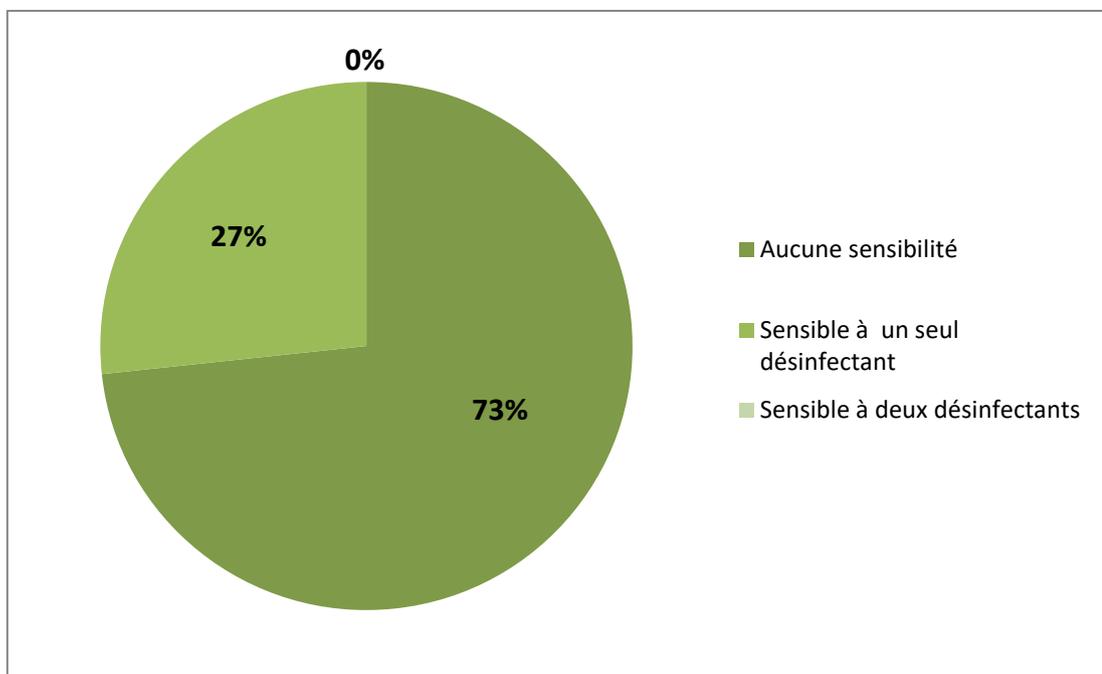


Figure 7 : Classification et pourcentage des isolats d'entérobactéries selon leur sensibilité aux biocides (rayons d'inhibitions)

VI.3. Résultats de l'inhibition de la croissance bactérienne par biocide

VI.3.1. Résultats de l'AMINE

L'effet inhibiteur du biocide à base d'amine sur les deux genres bactériens a été étudié. Les résultats obtenus sont représentés dans la tableau 12 et 13 et la figure 8

Tableau 10 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'AMINE sur les staphylocoques

AMINE	<i>Staphylococcus</i>		
	N	Isolats	%
Inhibition forte	0	/	0
Inhibition intermédiaire	4	St1,St3,St5,St11	36.4%
Pas d'inhibition	7	2,St4,St6,St7,St8,St9,St10	63.6%

Tableau 11: Résultats de l'effet inhibiteur de l'AMINE sur les entérobactéries

AMINE	Entérobactéries		
	N	Isolats	%
Inhibition forte	0	/	0
Inhibition intermédiaire	2	Eb14,Eb15	13,3%
Pas d'inhibition	13	Eb1, Eb2, EB3, Eb4,Eb5 Eb6, 7,Eb8,Eb9,Eb10,Eb11,Eb12,Eb13	86,7%

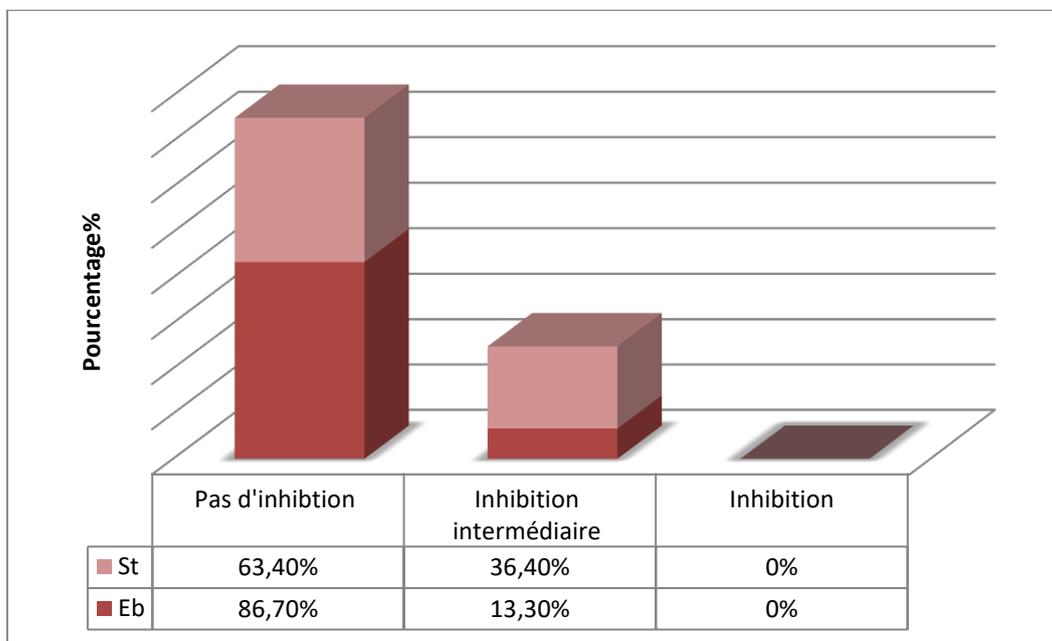


Figure 8 : Résultats de l'effet inhibiteur de l' AMINE sur les bacteries étudiées

VI.3.2. Résultats de DDAL AQ

L'effet inhibiteur du biocide DDAL AQ sur les deux genres bactériens a été étudié. Les résultats obtenus sont représentés dans la tableau 14 et 15 et la figure 9

Tableau 12 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'DDAL AQ sur les staphylocoques

DDAL AQ	<i>Staphylococcus spp</i>		
	N	Isolats	%
Inhibition Forte	0	/	0
Inhibition intermédiaire	3	St3,St7,St11	27,3%
Pas d'inhibition	8	1,St2,St4,St5,St6,St8,St9,St10	72,7%

Tableau 13 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'DDAL AQ sur les Entérobactéries

DDAL AQ	<i>Entérobactéries</i>		
	N	Isolats	%
Inhibition forte	0	/	0
Inhibition intermédiaire	0	/	0
Pas d'inhibition	15	Eb1,.....,Eb15	100%

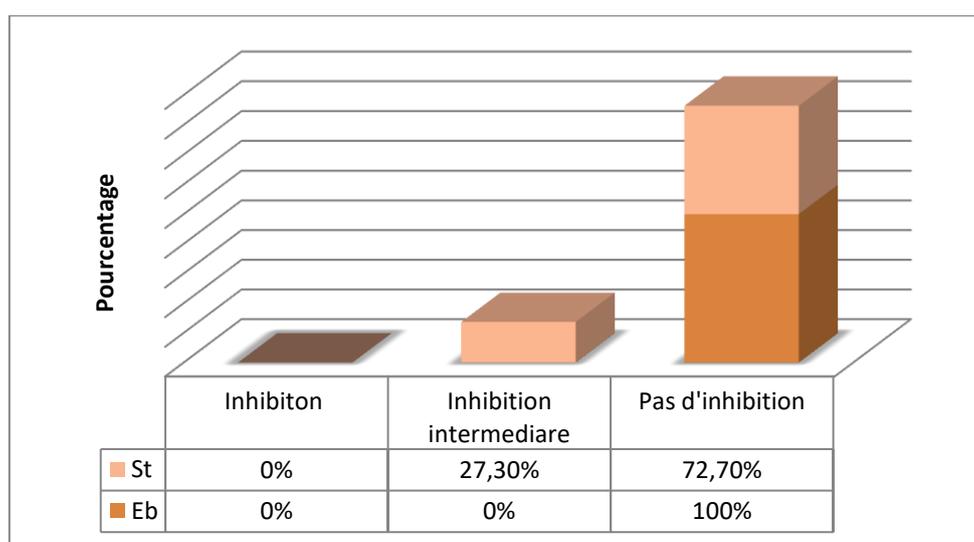


Figure 9 : Résultats de l'effet inhibiteur de l'DDAL AQ sur les bacteries étudiées

VI.3.3. Résultats de DDAC AQ

L'effet inhibiteur du biocide DDAC AQ sur les deux genres bactériens a été étudié. Les résultats obtenus sont représentés dans la tableau 16 et 17 et la figure 10

Tableau 14: Résultats de l'effet inhibiteur de DDAC AQ sur les staphylocoques

DDAC AQ	<i>Staphylococcus spp</i>		
	N	Isolats	%
Inhibition forte	0	/	0%
Inhibition intermédiaire	1	St5	9.1%
Pas d'inhibition	10	1,St2,St3,St4,St6,St7,St8,St9,St10,St11	90.9%

Tableau 15: Résultats de l'effet inhibiteur de DDAC AQ sur les Entérobactéries

DDAC AQ	<i>Entérobactéries</i>		
	N	Isolats	%
Inhibition forte	0	/	0%
Inhibition intermédiaire	2	Eb10, Eb12	13.3%
Pas d'inhibition	13		86.7%

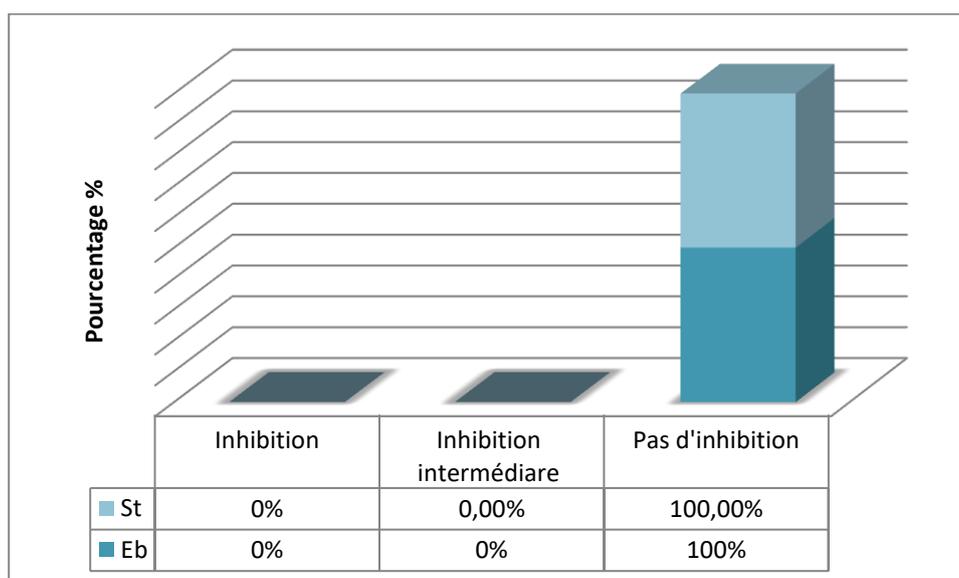


Figure 10: Résultats de l'effet inhibiteur d'DDAC AQ sur les bacteries étudiées .

VI.3.4. Résultats de autres biocides :

DDACM AQ, DDALM AQ , DAL CA , DDAL C , DDALM HS , APA, EJ1/EJ2 n'ont monté aucun effet inhibiteur sur les deux genres bactériens étudiés.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans les tableaux 18, 19 et la figure et la figure 11.

Tableau 16: Résultats de l'effet inhibiteur du détergent moussant , chlorés , acide péracétique et l'eau de javel

DDM AQ DC APA EJ1/EJ2	Staphylocoques		
	N	Isolats	%
Inhibition	0	/	0%
Inhibition intermédiaire	0	/	0%
Pas d'inhibition	11	1,St2,St3,.....,St12,St11	100%

Tableau 17 : Résultats de l'effet inhibiteur du détergent moussant , chlorés , acide péracétique et l'eau de javel

DDM AQ DC APA EJ1/EJ2	Entérobactéries		
	N	Isolats	%
Inhibition	0	/	0%
Inhibition intermédiaire	0	/	0%
Pas d'inhibition	15	1,Eb2,Eb3,.....,Eb14,Eb15	100%

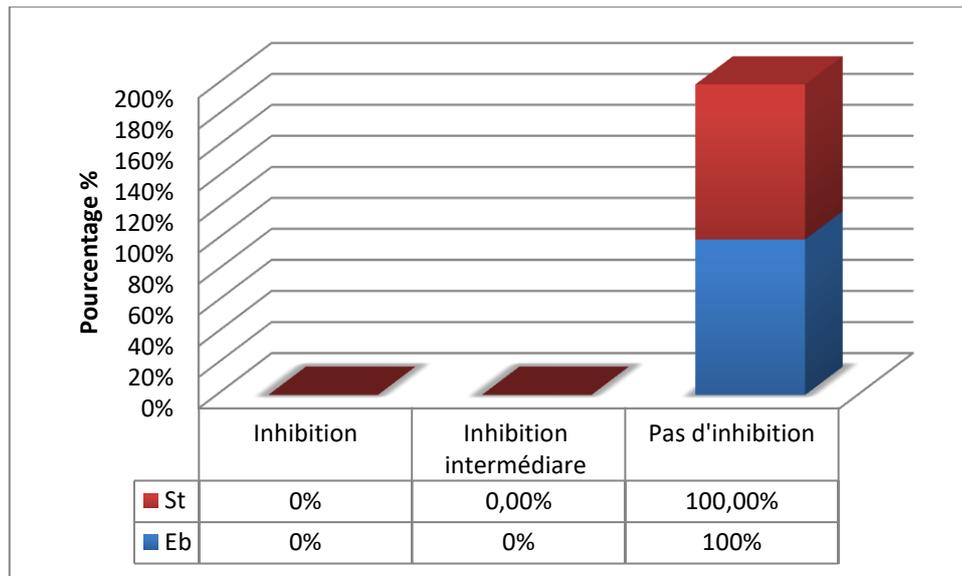


Figure 11: Résultats de l'effet inhibiteur de détergent moussant , chlorés ,acide péracétique et l'eau de javel

VII. Discussion

Résultats des tests de sensibilité aux biocides et profils d'inhibition :

Les 26 isolats de Staphylocoques et entérobactéries ont été soumis à l'étude de leur sensibilité vis-à-vis de sept biocides selon la technique de diffusion sur gélose.

Les résultats obtenus nous montrent que tous les isolats bactériens sont résistants aux biocides : DDACM AQ, DDAL AQ, DAL C, APA, DDALM HS et HJ. Cependant certains isolats ont montré une sensibilité pour d'autres biocides tels que l'AMINE et le DDAC AQ.

Nous avons également observé que 27% des staphylocoques sont sensibles aux DDAL AQ contre 0% chez les entérobactéries. Alors que pour le DDAC AQ, les résultats sont similaires.

Les diamètres d'inhibition diffèrent d'un isolat à un autre et d'une espèce à une autre, mais les intervalles des diamètres d'inhibitions pour l'ensemble des biocides sont similaires (entre 6 et 18mm).

Dans notre étude, la majorité des biocides n'ont eu aucune efficacité sur l'ensemble des isolats. A l'exemple de l'eau de javel, qui pour cette raison est déconseillé à utiliser comme désinfectant en agroalimentaire. Cependant, l'AMINE et le DDAL AQ sont apparues comme étant les désinfectants les plus efficaces sur nos isolats testés.

Effet inhibiteur des biocides :

Les biocides étudiés ont montré des degrés d'activité antimicrobienne variables en fonction de la bactérie testée.

Les désinfectants détergent à base de composés d'ammonium quaternaire (QACs) sont largement utilisés en milieu agro-alimentaire aussi bien dans les lignes de transformation manuelles que sur les surfaces non en contact avec les aliments car ce sont de bons pénétrants, non corrosifs, aussi en raison de leur activité antimicrobienne à large spectre, de leurs propriétés tensioactives et parce qu'ils sont moins toxiques. Cependant, l'utilisation intensive des désinfectants à base de QACs (par exemple chlorure de benzalkonium) peut imposer une pression sélective et conduire à l'émergence et à la propagation de microorganismes résistants (**Liu et al., 2009**). C'est qui en accord avec notre étude et nos condition expérimentales le DDAL AQ a exercé un effet inhibiteur sur les isolats (*Staphylococcus* et entérobactéries)

L'APA fait partie de la famille des oxydants, ses propriétés désinfectantes sont connues depuis un siècle. Son utilisation s'est développée dans les années 1950-1960 dans le secteur agroalimentaire et médical, en particulier grâce à la commercialisation du peroxyde d'hydrogène à 98% nécessaire à sa production.

Rappelons que l'APA n'existe pas à l'état pur. Il résulte de la réaction chimique entre l'acide acétique (vinaigre) et le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). L'équilibre de cette réaction est instable et nécessite l'adjonction de produits stabilisants et tamponnants, auxquels s'ajoutent des anticorrosifs. Son efficacité est meilleure à 20°-25° qu'à 5°. Il est inflammable et explose à 110°. Comme oxydant, il agit en détruisant les protéines structurales et enzymatiques des cellules microbiennes. (Byrne, et al., 1990). L'acide péracétique est considéré comme le biocide le plus efficace à être utilisé (Byrne, et al., 1990). Cependant, l'APA utilisé lors de notre étude n'a présenté aucun effet inhibiteur sur tous les isolats étudiés. L'eau de javel est un produit chimique redoutable qui résulte d'un mélange d'hypochlorite de sodium et de chlorure de sodium. C'est un désinfectant qui est capable de tuer efficacement la plus grande majorité des microorganismes : bactéries, virus et champignons, mais se dégrade rapidement (Massicotte, 2009). Cet agent antimicrobien pénètre facilement à travers les parois et les membranes de cellules microbiennes. De ce fait c'est un produit désinfectant qui est destiné à désinfecter les sols, les sanitaires et toutes les surfaces susceptibles d'être

fortement contaminés. Mais d'après les résultats de notre travail, les trois biocides DDALM HS, DDAL C, et Eau de javel qui contient le même principe actif « le chlore » n'ont pas inhibé nos isolats. La résistance des espèces bactériennes testées à ce principe actif pourrait être à l'origine de ces résultats.

Conclusion :

L'objectif de cette expérience est d'évaluer l'efficacité des biocides sur des bactéries d'origine alimentaires. Les résultats ont permis de distinguer les différents effets des biocides (AMINE, DDAL AQ , DDAC AQ , DDACM AQ, DDALM AQ, DDALC , DDALM HS ,APA , EJ) et les testé sur les bactéries étudiées (*Staphylocoques* , entérobactéries .).

les biocides étudiés ont montré des variations dans l'activité antimicrobienne en fonction de la bactérie testée. Les taux de l'efficacité de l'AMINE et DDMAQ sur les bactéries gram positive (staphylocoques) étaient plus importants que ceux obtenus sur les bactéries gram négative (entérobactéries).

Les résultats de notre étude ont révélé que la majorité des biocides sont relativement inefficace contre nos bactéries testées. Il faut savoir que les bactéries subissent régulièrement des modifications de leur patrimoine génétique pour s'adapter à un nouvel environnement cela lui permet de survivre en présence d'un agent antimicrobien et cette modification donne naissance à la résistance. Des travaux de recherche sont encore nécessaires pour mieux comprendre le phénomène de résistance.

Bibliographie

(UE) Règlement de délégué Règlement Délégué (UE) 2017/698 de la Commission du 3 février 2017 modifiant le règlement délégué (UE) no 1062/2014 relatif au programme de travail pour l'examen systématique de toutes les substances actives existantes contenues dans des produits biocides [Revue]. - 2017.

ANSES Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de alimentation de l'environnement et du travail = Résistance aux biocides antimicrobiens . - 7 Novembre 2018.

Baldry.m The bactericidal, fungicidal and sporocidal properties of hydroflex peroxide and peracetic acid / Journal of applied Bacteriology [Livre]. - 1983.

Byrne et Roesner Membrane regeneration program to restore performance of severely fouled RO membranes [Livre]. - 1990.

Commission européenne Officiel Journal Of The European Union Règlement (UE) n° 528/2012 du parlement Européene et du Conseil [Revue] // la mise en distribution sur le marché et l'utilisation des produit biocides . - 2012. - pp. 1-123.

Doll J , Reyonald , trexler The use of peracetic acid to obtain germ free in vertebrale eggs for gnotobiotte studies [Livre]. - 1963.

Harakeh M.s Inactivation of enterovirus , rotavirus and bacteriophage by peracetic acid in a municipal sewage effluent [Livre]. - 1984.

Massicotte Désinfectant et désinfection en hygiène et salubrité , principes fondamentaux [Livre]. - 2009.