

République Algérienne Démocratique et Populaire
Democratic and Popular Republic of Algeria
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ministry of Higher Education and Scientific Research
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
École Nationale Supérieure Vétérinaire. Rabie Bouchama
Higher National Veterinary School. Rabie Bouchama
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

N° d'ordre : 030

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du **diplôme de Master** en Sciences Vétérinaire

THÈME

**Etude de la sensibilité de *Listeria* spp. isolés dans un
abattoir avicole aux biocides**

Présenté par :

Melle: KELANEMER Nour El Houda

Soutenu publiquement, le 8 juillet 24 devant le jury :

Mr GOUCEM R.	MAA(ENSV)	Président
Mme BOUAYAD L.	Professeure (ENSV)	Promotrice
Mme BOUHAMMED R.	MCA (ENSV)	Examinatrice

Année universitaire 2023-2024

Déclaration sur l'honneur

Je soussignée **Mlle KELANEMER Nour el houda**, 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 droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

Remerciements

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude et mon respect sincère envers ma promotrice, **Madame Bouayad Leila**, pour son encadrement bienveillant et son soutien constant tout au long de la préparation de mon mémoire.

Je tiens également à adresser mes remerciements chaleureux à **Monsieur Goucem R**, qui a aimablement accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je suis particulièrement reconnaissant envers **Madame Bouhamed Radia** pour avoir pris le temps d'examiner mon travail avec attention et expertise.

Enfin, j'exprime mes remerciements sincères à **Madame Louisa Boudjellal**, l'ingénieure du laboratoire d'HIDAOA, pour sa gentillesse et sa disponibilité remarquables.

Dédicace

Du fond de mon cœur, je dédie ce travail :

*À mes très chers parents, **Moussa et Bahia**, pour tous leurs sacrifices, leur amour inestimable, leur tendresse, leur soutien inébranlable dans les moments difficiles, et leurs encouragements constants tout au long de mes études. Je vous remercie infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi. Cela ne sera jamais assez. Je vous aime profondément et j'espère que vous êtes fiers de moi. Merci beaucoup, maman et papa.*

*À mes frères, en particulier **Djamal**, à toute ma famille, et à tous mes amis.*

À tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

À tous ceux qui m'aiment...

Résumé :

La contamination des aliments par des bactéries pathogènes engendre des infections d'origine alimentaire, constituant une menace significative pour la santé humaine et animale. Pour réduire cette contamination, l'industrie agroalimentaire utilise des désinfectants, appelés biocides.

Notre étude se concentre sur la sensibilité des souches de *Listeria* spp. aux biocides (Quatacid) sur 20 isolats prélevés dans un abattoir avicole, avec des concentrations variant de 0,25 % à 2 %. Nous avons employé la méthode de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour détecter les isolats résistants ou sensibles aux biocides et déterminer la CMI des isolats sensibles. La majorité des isolats présentent une CMI de 1 %, certains une CMI de 1,25 %, tandis que d'autres ont des valeurs inférieures à 1 %.

En général, les biocides inhibent efficacement *Listeria*, mais il est crucial de les utiliser correctement.

Mot clés : *Listeria*, biocides, CMI, Sensible

Abstract:

Contamination of food by pathogenic bacteria leads to foodborne infections, posing a significant threat to human and animal health. To reduce this contamination, the food industry uses disinfectants known as biocides.

Our study focuses on the sensitivity of *Listeria* spp. strains to biocides (Quatacid) on 20 isolates collected from a poultry slaughterhouse, with concentrations ranging from 0.25% to 2%. We employed the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method to detect resistant or sensitive isolates and determine the MIC of sensitive isolates. The majority of isolates have an MIC of 1%, some have an MIC of 1.25%, while others have values lower than 1%.

In general, biocides effectively inhibit *Listeria*, but it is crucial to use them correctly.

Keywords: *Listeria*, biocides, MIC, sensitive

ملخص

يؤدي تلوث الأغذية بالبكتيريا المسببة للأمراض إلى الإصابة بالعدوى المنقولة بالغذاء، مما يشكل تهديدا كبيرا لصحة الإنسان والحيوان. وللمحد من هذا التلوث، تستخدم صناعة الأغذية المطهرات المعروفة بالمبيدات الحيوية. تركز دراستنا على حساسية *Listeria* spp. تم عزل سلالات المبيدات الحيوية (Quatacid) على 20 عزلة جمعت من مسلخ الدواجن بتركيز تتراوح بين 0.25% إلى 2%. استخدمنا طريقة التركيز المثبط الأدنى (MIC) للكشف عن العزلات المقاومة أو الحساسة وتحديد MIC للعزلات الحساسة. غالبية العزلات لديها MIC بنسبة 1%، وبعضها لديه MIC بنسبة 1.25%، بينما البعض الآخر لديه قيم أقل من 1%. بشكل عام، تعمل المبيدات الحيوية على تثبيط الليستيريا بشكل فعال، ولكن من الضروري استخدامها بشكل صحيح

الكلمات المفتاحية: الليستيريا، المبيدات الحيوية، الحساسة، MIC

Liste des abréviations

AW	Activité de l'eau.
ISO	international organization for standardization.
OMS	organisation mondiale de la santé.
Ph	potentiel hydrogène.
sp. Spp	Espèce. Espèces.
VP	Voges-proskauer.
RM	Rouge de méthyle
ONPG	ONPG Ortho-Nitro-Phenyl- β –Galactosidase
CMI	concentration minimale inhibitrice
ENSV	Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire
HIDAOA	Hygiène et Industrie des Denrées alimentaire d'Origine Animale
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
MTE	Ministère de la transition écologique
CIPR	Commission Internationale pour la Protection

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Caractéristiques biochimiques de genre de <i>Listeria</i> (Larpen. 2004).....	4
Tableau N°2 : Croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> sur Trypticase Soy Broth.....	5
(Kaissmoun, 2009).....	5
Tableau N°3 : différents sérotypes des espèces de <i>Listeria</i> (Larpen, 2004).....	6
Tableau N°4 : Isolats de <i>Listeria</i> spp. étudiés	15
Tableau N°5 : Différentes concentrations du biocide utilisé	17
Tableau N°6 : concentration minimale inhibitrice par l'activité de biocide	20

Liste des figures

Figure N°1: Microscopie électronique de <i>L. monocytogenes</i> (Anonyme, 2024).....	4
Figure N°2: Principales structures bactériennes impliquées dans la résistance aux antibiotiques. En rouge les principales modifications à l'origine des résistances (Anonyme, 2024).	12
Figure N°3 : Préparation des concentrations du biocide.....	18
FigureN°4 : Microplaques remplies par les différentes concentrations du biocide	19
Figure N°5 : Concentrations minimales obtenue pour chaque isolat.....	21
Figure N°6: Pourcentage des isolats ayant présenté la même CMI.....	21

Table de matières

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: *Listeria*

I.1. Historique et généralités :	3
I.2. Taxonomie :	3
I. 3. Caractères morphologiques :	3
I.4. Caractères biochimiques :	4
I.5. Caractères culturaux :	4
I.6. Caractères physiologiques :	5
I.6.1. Température et croissance :	5
I.6.2. pH et croissance :	5
I.6.3. Sel et croissance :	6
I.6.4. Aw et croissance :	6
I.7. Caractères antigéniques :	6
I.7.1. Sérotypie :	6
I.7.2. Lysotypie :	7

Chapitre II : Sensibilité et résistance aux biocides

II.1. Définition d'un biocide :	8
II.2. Classification et mode d'action des agents antimicrobiens	8
II.2.1. Produits létaux.....	9
II.2.1.1. Produits à action létale non spécifique	9
II.2.1.2. Produits à action létale spécifique	10
II.2.2. Produits non létaux.....	10
II. 3. Résistance aux biocides :	10
II.3.1. Origine de la résistance aux biocides :	10
II.3.2. Mécanisme de résistance aux biocide :	11

PARTIE EXPERIMENTALE

I.Objectifs :	14
II. Matériels	14

II.1. Isolats bactériens étudiés :.....	14
II.2. Biocide testé.....	15
II.3. Matériel de laboratoire	16
II.4. Milieux et réactifs microbiologiques:	16
III. Méthodes.....	17
III.1. Revivification des isolats	17
III.2. Préparation des différentes concentrations du biocide (figure N°3).....	17
III.3. Préparation des suspensions bactériennes :.....	18
III.4. Tests sur microplaques :.....	18
III.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien	18
III.4.2. Remplissage des microplaques	19
III.5. Lecture	20
III. Résultats et discussion.	20
IV.1. Résultats des CMI obtenues pour chaque isolat :	20
V. Conclusion :	23
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	24

INTRODUCTION

Le phénomène de résistance des *Listeria* aux biocides est une préoccupation croissante dans le domaine de la sécurité alimentaire et de la santé publique. Les biocides, tels que les désinfectants et les agents de nettoyage, sont largement utilisés pour éliminer les *Listeria* et d'autres pathogènes des surfaces alimentaires et des environnements industriels. Cependant, des études récentes ont montré que certaines souches de *Listeria monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria* peuvent développer une résistance aux biocides, ce qui compromet leur efficacité (Martinez-Suares *et al.*, 2016).

Cette résistance peut résulter de mécanismes divers, tels que la modification des membranes cellulaires pour prévenir l'entrée des biocides, l'activation de systèmes de détoxification pour neutraliser les biocides, ou encore des mutations génétiques conduisant à une moindre sensibilité aux agents antimicrobiens. Ces adaptations peuvent être favorisées par une exposition continue aux biocides, notamment dans les environnements où ces produits sont largement utilisés (Varela *et al.*, 2013).

La résistance des *Listeria* aux biocides représente un défi majeur pour la sécurité alimentaire, nécessitant une vigilance constante. Il est crucial de surveiller et de comprendre l'émergence de ces phénomènes afin d'améliorer les stratégies de contrôle des contaminations.

Dans cette perspective, nous avons entrepris cette étude pour évaluer l'efficacité d'un biocide sur des *Listeria* isolées dans un abattoir. Cette recherche se divise en une revue de littérature approfondie et une section expérimentale détaillant les méthodes utilisées, les résultats obtenus, ainsi que leur discussion approfondie.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: *Listeria*

I.1. Historique et généralités

Au début du XXe siècle, la découverte de la *Listeria* est attribuée à des cas de listériose chez les humains et les animaux. En 1918, **Dumont et Cotoni** ont identifié une bactérie dans le liquide céphalorachidien d'un soldat souffrant de méningite (**Sautra et al., 1998**). Lors d'une épidémie de listériose en 1926, une équipe de chercheurs de l'Université de Cambridge a isolé un petit bâtonnet Gram-positif à partir de tissus nécrosés de cobayes de laboratoire (**Murray et al., 1926**).

Un an plus tard, en Afrique du Sud, Pirie a découvert la même bactérie dans les foies de différentes espèces de gerbilles africaines et l'a nommée *Listerella hepatolytica* (**Gray et al., 1966**). En 1940, Pirie a proposé le nom de *Listeria monocytogenes*, qui a été retenu et inscrit dans les « Approved Lists of Bacterial Names ». Ce document, publié dans l'International Journal of Systematic Bacteriology », recense tous les organismes procaryotes identifiés jusqu'au 1er janvier 1980 (**Skerman et al., 1980**).

I.2. Taxonomie

Dans le **Bergey's Manual** de 1986, les *Listeria* sont caractérisées comme des bâtonnets Gram positifs, réguliers et non sporulant (**Larpen, 2004**). Le genre *Listeria* appartient à la sous-branche *Clostridium*, qui englobe des bactéries en faible proportion et comprend également les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Brochothrix*.

Le genre *Listeria* se composait jusqu'en 1998 de six espèces réparties en deux groupes génétiques distincts : le premier groupe inclut *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. ivanovii*, tandis que le second groupe est représenté par *L. grayi* (**Sutra, 1998**). Depuis, d'autres espèces ont été découvertes, portant le nombre d'espèces connues de *Listeria* à 26 ; la dernière espèce identifiée étant *Listeria farberii* (**Carlin et al., 2021**).

I.3. Caractères morphologiques

Les *Listeria* sont de petits bacilles, mesurant entre 0,4 et 0,5 µm de diamètre et de 0,5 à 2,0 µm de long, avec des extrémités arrondies (figure N°1). Ce sont des bactéries à Gram positif qui, en microscopie optique, présentent différentes formes : bactéries isolées, associées en V ou en parallèle. Elles ne possèdent ni capsule ni spores. À 20-25°C, elles sont mobiles grâce à 5 à 6 flagelles péritriches, mais deviennent peu mobiles ou immobiles à 37°C (**Federighi, 2005**



Figure N°1: Microscopie électronique de *L. monocytogenes* (Berche, 2022).

I.4. Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques des Listeria sont rapportés dans le tableau N°1 (Larpent, 2004)

Tableau N°1 : Caractéristiques biochimiques de genre de *Listeria* (Larpent. 2004).

Réaction positives	Réactions négatives
Catalase	Oxydase
Type de respiration : aéro-anaérobie	Urease
Glucose , fructose , mannose ,maltose,cellobiose, arabitol, tréhalose	Indole
Mobilité 25 C°	Gaz en Glucose
Type de respiration : aéro-anaérobie	ONPG
Esculine	Gélatinasse
Voges-proskauer(VP)	Xylose, manitol,Ribose
Rouge de méthyle(RM)	

I.5. Caractères cultureux

Listeria a la capacité de croître en présence d’oxygène ou en son absence. En laboratoire, sur gélose nutritive, elle développe des colonies translucides, arrondies, lisses, légèrement convexes, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, en 24 à 48 heures à 37°C, présentant des reflets bleutés

en lumière oblique. Sur gélose au sang de mouton ou de cheval, *Listeria monocytogenes* forme des colonies β-hémolytiques (AFSSA, 2000; Sutra, 1998).

I.6. Caractères physiologiques

I.6.1. Température et croissance

Cette bactérie montre une température optimale de croissance entre 30 et 37°C, comme indiqué dans la section sur la microbiologie prévisionnelle. En expérimentation, sa croissance a été observée dans une plage de température allant de -2 à +45°C (Augustin, 1999).

I.6.2. pH et croissance

Selon le Manuel de Bergey, *Listeria monocytogenes* peut croître dans une plage de pH allant de 5,6 à 9,6, avec un pH optimal autour de 7 et une préférence pour des conditions légèrement alcalines. Des études ont montré que *Listeria monocytogenes* peut initier sa croissance à des pH inférieurs à 5, bien que sa tolérance à ces conditions acides soit moindre qu'à des pH plus élevés. Malgré cela, *Listeria* est capable de survivre jusqu'à un pH de 3,26 (Larpent, 2004).

La capacité de croissance de *Listeria monocytogenes* est étroitement liée à la température, comme indiqué dans le tableau N°2.

Tableau N°2 : Croissance de *Listeria monocytogenes* sur Trypticase Soy Broth (Kaissmoun, 2009)

T°C d'incubation	pH minimal de croissance
20	4,39-4,62
30	4,39-4,63
10	4,62-5,05
7	4,62- 5,05
4	5,23-5,45

T° = température, C= degré Celsius

I.6.3. Sel et croissance

Dans les solutions contenant plus de 10% à 11% de NaCl, *Listeria monocytogenes* ne se développe pas (Afssa, 2000). Cependant, certaines souches ont la capacité de résister à des niveaux de salinité accrus, comme celles observées dans les saumures de fromagerie avec une concentration de 13 à 14% de NaCl (Farber, 1992).

I.6.4. Aw et croissance

La valeur optimale pour l'Aw est de 0,97, mais la croissance est possible à partir de 0,943. En revanche, si l'Aw est inférieur à 0,92, la croissance ne se produit pas. Cependant, le germe reste viable pendant plusieurs jours sans se multiplier à des valeurs d'Aw plus faibles. En d'autres termes, la croissance bactérienne est optimale à un niveau d'Aw de 0,97, mais elle peut encore se produire à un niveau légèrement inférieur de 0,943. Si le niveau d'Aw est inférieur à 0,92, la croissance bactérienne ne se produit pas, mais le germe reste viable pendant plusieurs jours sans se multiplier (Farber, 1992).

I.7. Caractères antigéniques

I.7.1. Sérotypie

Dans le genre *Listeria*, les sérovars sont définis en fonction de deux types d'antigènes :

- Les antigènes somatiques O thermostables, désignés de I à XV.
- Les antigènes flagellaires H thermostables, désignés d'A à Z.

Il existe 16 variétés de sérotypes de *Listeria* (Tableau N°3), chacun étant défini par la présence de diverses protéines antigéniques O et d'une ou plusieurs protéines antigéniques H. La composition antigénique de ces sérovars est répertoriée dans le tableau (Federighi, 2005).

Tableau N°3 : différents sérotypes des espèces de *Listeria* (Larpen, 2004).

Espèces	Sérovars
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4 ^e , 7
<i>L. innocua</i>	3, 6a, 6b, 4ab
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4c, 4d, 6b
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b

I.7.2. Lysotypie

La Lysotypie, basée sur la sensibilité des bactéries aux bactériophages, vise à définir le lysotype, c'est-à-dire les phages ayant une activité lytique contre une souche donnée. Cette méthode, plus précise que la sérotypie, permet de classer les souches d'un même sérotype, principalement pour la surveillance des listérioses. Cependant, elle peut être limitée en termes de capacité de typage, car toutes les souches ne sont pas lysotypables. Son utilisation est restreinte aux Centres Nationaux de Référence en raison de l'expertise requise et de la rareté des phages disponibles (**Audurier et al., 1977 ; Rocourt et al., 1985**).

Chapitre II : Sensibilité et résistance aux biocides

II.1. Définition d'un biocide

Les biocides englobent un large éventail de produits d'hygiène générale susceptibles d'avoir des effets sur l'homme, l'animal ou l'environnement. Ils sont utilisés dans plusieurs domaines, tels que la médecine, l'industrie agroalimentaire, et divers secteurs du commerce (**CIPR, 2010**). Selon la directive européenne (n° **528/2012**), les produits biocides se définissent ainsi : « toutes les substances et préparations (mélanges) constituées d'une ou plusieurs substances actives, contenant ou générant ces substances, qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à prévenir leur action ou à les combattre de toute autre manière, par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique ».

Il existe généralement quatre groupes de biocides, classés selon leur catégorie d'action, et environ 22 types de produits au total, classés en fonction de leur cible : les désinfectants (utilisés pour la désinfection des mains, des surfaces en contact avec les denrées alimentaires, de l'eau, etc.), les produits de protection (comme la protection du bois et du cuir), les produits de lutte contre les nuisibles (insecticides, rodenticides, etc.), et d'autres produits biocides (comme les peintures anti-salissures) (**MTE, 2020**). En raison de la grande variété et de la toxicité des produits biocides, ils doivent être utilisés avec précaution sous un encadrement réglementaire strict, tout en respectant les conditions de conservation et d'utilisation.

II.2. Classification et mode d'action des agents antimicrobiens

Chaque produit contient un principe actif qui lui permet d'assurer sa fonction. Le terme "principes actifs antimicrobiens" désigne toutes les substances destinées à détruire les microorganismes ou à empêcher leur croissance. Selon le mode d'action des agents antimicrobiens, leur nom se termine généralement par deux suffixes : "cide" si l'agent a un effet létal (bactéricide, fongicide, algicide et virucide) et "statique" si l'effet est seulement inhibiteur (bactériostatique et fongistatique) (**Oulmi, 2017**).

La classification des agents antimicrobiens varie selon plusieurs critères : la nature physique ou chimique des principes actifs, leur mode d'action sur les différentes structures ciblées, et leur potentiel létal. Ainsi, la létalité de ces produits permet de les classer en deux groupes : les produits létaux et les produits non létaux (**Allion, 2004**).

II.2.1. Produits létaux

Les produits létaux sont des agents physiques (comme les hautes températures et les ultrasons) ou chimiques (comme les désinfectants) dont le rôle principal est d'éliminer et de détruire les microorganismes. Ce groupe se divise en deux catégories selon leur réaction chimique : les produits à action létale spécifique et les produits à action létale non spécifique (**Oulmi, 2017**).

II.2.1.1. Produits à action létale non spécifique

Leur action n'est pas spécifique, mais rapide, brutale et temporaire. Ils sont chimiquement très réactifs (**Allion, 2004**) et se classent comme suit :

- A. Oxydants :** Ce sont des substances souvent utilisées comme biocides, dont la létalité est due à l'oxydation des systèmes enzymatiques (libération d'oxygène), altérant les groupements thiol libres des acides aminés (S-H) (**Oulmi, 2017**). Le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique sont les plus couramment utilisés.
- B. Halogènes et leurs dérivés :** Ces substances sont utilisées comme désinfectants dans plusieurs domaines (industrie alimentaire et laitière, hôpitaux et usage domestique), comprenant les composés chlorés qui sont très utilisés pour la désinfection de l'eau potable (**Allion, 2004**) et l'iode qui est utilisé comme désinfectant pour la peau.
- C. Acides et les bases :** les acides sont utilisés comme désinfectants pour l'hygiène humaine et vétérinaire (acide citrique, acide lactique et acide glycolique) ou comme conservateurs. Leur efficacité repose sur la dissociation des acides et la libération des protons (ions H⁺) dans le milieu intérieur de la cellule arrêtant ainsi la croissance cellulaire.
Concernant les bases, leur efficacité repose sur la concentration en ions hydroxydes (OH⁻), qui entraîne une augmentation du pH, affectant l'activité enzymatique métabolique et la structure cellulaire de certains organites (dénaturation des protéines) (**Allion, 2004 ; ANSES, 2019**).
- D. Alcools :** tels que l'éthanol et l'isopropanol, sont fréquemment utilisés comme désinfectants. Ils agissent comme bactéricides, fongicides, et parfois comme virucides pour les virus contenant des lipides, mais ne sont pas sporicides (**Allion, 2004**). Leur mode d'action repose sur la dénaturation des protéines et la dissolution des lipides membranaires, entraînant une lyse cellulaire (**ANSES, 2019**).

II.2.1.2. Produits à action létale spécifique

Ces produits ciblent spécifiquement certains microorganismes, agissant de manière sélective sur des structures ou des processus biologiques essentiels. Ils sont conçus pour maximiser leur efficacité contre les cibles visées tout en minimisant les effets sur d'autres organismes. Cette spécificité permet une action précise et efficace dans le contrôle des microorganismes indésirables.

Ce groupe comprend notamment les ammoniums quaternaires, les biguanides et les dérivés phénoliques (Massicotte, 2009).

II.2.2. Produits non létaux

Les produits non létaux, agissant seulement comme inhibiteurs de croissance, comprennent principalement les métaux (comme les dérivés mercuriels, du cuivre, du zinc, de l'argent...) et les colorants (Allion, 2004). Ces produits sont utilisés comme compléments alimentaires, conservateurs ou dans d'autres applications (INERIS, 2013).

II. 3. Résistance aux biocides

Le terme "résistance aux antimicrobiens" est relatif et comporte plusieurs définitions basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques). La résistance se réfère à l'insensibilité relative d'un micro-organisme à un traitement spécifique dans des conditions données. Pour les agents antibactériens, elle est habituellement évaluée par la concentration minimale requise pour provoquer un effet déterminé, tel que l'inhibition de la croissance, sur une population de cellules.

Une souche est considérée comme résistante lorsqu'elle peut survivre à une concentration de biocide ou de produit biocide notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches. Cette définition est souvent liée à la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration bactéricide minimale (CMB) requises pour observer un effet visible sur la population bactérienne (Gilbert et McBain, 2003).

II.3.1. Origine de la résistance aux biocides

Il existe deux types de résistance des bactéries aux biocides : intrinsèque et acquise (Anses, 2016).

A) Résistance intrinsèque

On parle de résistance naturelle (innée ou insensibilité) lorsque celle-ci est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien, ce qui peut servir de critère d'identification. Cette forme de résistance est permanente et d'origine chromosomique. Elle est conditionnée par des facteurs tels que les particularités structurales de la paroi cellulaire, qui empêchent les substances antibactériennes d'accéder à leur cible, ou encore par l'absence de cette cible, par exemple.

La résistance naturelle est stable et transmise à la descendance par transmission verticale, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à une autre par transmission horizontale (**Tortora et al., 2011**).

B) Résistance acquise (extrinsèque)

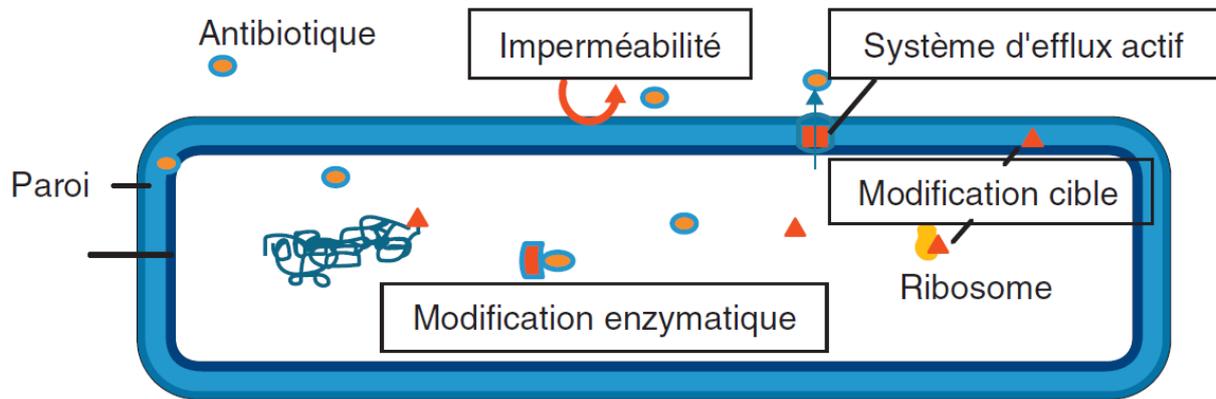
Cette forme de résistance survient lorsque quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à une substance antibactérienne (biocide), deviennent résistantes. Elle peut être acquise par mutation (responsable des résistances endogènes) ou par la transmission d'éléments génétiques mobiles (responsable des résistances exogènes), tels que les plasmides, les transposons, les intégrons (par conjugaison), les gènes portés par des bactériophages (par transduction), ou encore des gènes présents sur des fragments d'ADN libre (par transformation). Le transfert des gènes de résistance peut s'effectuer à l'intérieur d'une même espèce bactérienne mais aussi entre différentes espèces bactériennes (**Maillard, 2018**).

II.3.2. Mécanisme de résistance aux biocide

La résistance aux biocides est relativement rare et semble être due à la diversité des cibles cellulaires ainsi qu'un manque général d'enzymes de détoxification connus. Elle découle généralement de modifications cellulaires affectant l'accumulation des biocides, telles que des altérations de l'enveloppe cellulaire limitant l'absorption ou la mise en place de mécanismes d'efflux (figure N°2). Cependant, bien que peu fréquentes, des mutations des sites cibles peuvent également entraîner une résistance aux biocides (**Pool, 2002**).

De plus, la présence de déterminants de résistance aux biocides, souvent associés à ceux des antibiotiques, pourrait conduire à une co-sélection lors des pratiques de désinfection tout au long de la chaîne alimentaire, favorisant ainsi la sélection de pathogènes alimentaires résistants de manière croisée. (**Conficoni et al., 2016**). En outre, il convient de considérer les situations particulières telles que les biofilms et l'effet protecteur exercé par les protozoaires (**Anses,**

2016). En effet, les bactéries qui forment un biofilm peuvent développer une résistance aux agents antimicrobiens de 10 à 1000 fois plus élevée. Cette capacité accrue à résister aux traitements antimicrobiens peut être attribuée à plusieurs facteurs, certains auteurs préférant parler de tolérance plutôt que de résistance (Tremblay *et al.*, 2014).



En rouge les principales modifications à l'origine des résistances.

Figure N°2: Principales structures bactériennes impliquées dans la résistance aux antibiotiques. (Anonyme, 2024).

**PARTIE
EXPREMENTALE**

I.Objectifs :

L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité des isolats de *Listeria* spp. Provenant de carcasses et de surfaces dans un abattoir avicole vis-à-vis des biocides couramment utilisés en industrie agroalimentaire par la méthode de CMI sur microplaque. Le genre *Listeria* est connu pour être un contaminant fréquemment retrouvé dans les abattoirs avicoles (**Bouayad et al., 2015**), ce qui constitue une préoccupation majeure pour les industriels souhaitant produire des produits sains. À cette fin, les industriels mettent en place des plans de nettoyage et de désinfection de leurs installations et équipements, et le choix d'un désinfectant efficace est plus que crucial.

Pour cette étude, nous avons choisi un produit couramment utilisé dans l'industrie agroalimentaire, réputé pour son efficacité. Il s'agit d'un désinfectant à base d'ammonium quaternaire, le QUATACID, qui inhibe la croissance de la plupart des bactéries.

Notre étude a été menée au laboratoire HIDAOA de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger durant le mois de Mars 2023,

II. Matériels

II.1. Isolats bactériens étudiés

Les isolats de *Listeria* spp. Testés dans cette étude ont été aimablement fournis par le laboratoire de recherche HASAQ. Les isolats utilisés dans notre étude sont répertoriés dans le tableau N°4.

Tableau N°4 : Isolats de *Listeria* spp. étudiés

	Identifiant
Isolat 01	53
Isolat 02	Li63
Isolat 03	91
Isolat04	Li24
Isolat 05	34
Isolat 06	Li126
Isolat07	108
Isolat08	43
Isolat09	51
Isolat10	119
Isolat 11	Li22
Isolat12	86
Isolat 13	125
Isolat14	163
Isolat 15	Li40
Isolat 16	98
Isolat 17	Li47
Isolat 18	Li49
Isolat 19	48
Isolat 20	Li129

II.2. Biocide testé

Le QUATACID est un biocide concentré à 5 %, utilisé principalement dans les industries agroalimentaires pour ses propriétés détergentes et désinfectantes. Il contient de l'ammonium quaternaire qui est un surfactant cationique et de l'acide phosphorique, ce qui lui permet d'agir efficacement comme inhibiteur de croissance sur de nombreuses bactéries.

Les biocides à base de QAC sont particulièrement populaires en raison de leur large spectre d'activité antimicrobienne, leur facilité d'utilisation et leur compatibilité avec d'autres additifs.

Le produit QUATACID est fabriqué en Algérie et distribué par la Sarl KIMYA

La sensibilité des bactéries a été évaluée en utilisant différentes concentrations, choisies selon :

- Les recommandations des fournisseurs.
- Les spectres d'activité du produit.
- Les concentrations utilisées par les industriels.

II.3. Matériel de laboratoire

- Etuve 37C°
- Autoclave
- Micropipette
- Boites de pétri
- Flacons stériles
- Pipettes Pasteur
- Agitateur magnétique
- Anses stériles
- Balance de précision
- Densitometer (Accuchek)
- Tubes à essai en verre
- Tubes en verre
- Microplaques

II.4. Milieux et réactifs microbiologiques:

- QUATACID
- TSB : Le bouillon Trypticase soja
- Gélose nutritive
- Eau physiologique stérile
- Bouillon BHIB

III. Méthodes

III.1. Revivification des isolats

Chaque isolat choisi pour cette étude a été revivifié en le cultivant sur des boîtes de gélose nutritive. Chaque boîte a étéensemencée avec un aliquote d'une culture bactérienne conservée à -20°C, correspondant à un isolat de *Listeria* spp. L'ensemencement a été réalisé selon la méthode d'ensemencement par épuisement sur gélose. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures.

III.2. Préparation des différentes concentrations du biocide (figure N°3).

Le biocide sélectionné pour être testé est concentré à 5%, et le fabricant recommande de l'utiliser dans des solutions à 2%. Le choix des concentrations utilisées a été motivé par le besoin de confirmer l'efficacité de la concentration indiquée sur les isolats de *Listeria* obtenus à partir d'un abattoir avicole.

Des concentrations inférieures à celle recommandée ont été choisies pour évaluer la sensibilité des isolats à des concentrations réduites, ce qui pourrait permettre de minimiser les coûts de désinfection. Les concentrations supérieures à 2% ont été sélectionnées pour déterminer à quelles concentrations le biocide demeurerait efficace, dans le cas où il ne le serait pas à 2% comme recommandé par le fabricant.

Les concentrations utilisées sont répertoriées dans le tableau N°5

Tableau N°5 : Différentes concentrations du biocide utilisé

Produits	Concentrations								
	0.25%	0.5%	0.75%	1%	1.25%	1.5%	1%	1.75	2%



Figure N°3 : Préparation des concentrations du biocide (**Photo personnel**).

III.3. Préparation des suspensions bactériennes

À partir d'une culture pure de 24 heures sur gélose nutritive un inoculum est préparé. Quelques colonies sont raclées à aide d'une pipette et introduites dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est homogénéisée et sa turbidité est ajustée à 0.5 McFarland.

III.4. Tests sur microplaques

III.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Pour chaque suspension bactérienne de 0,5 McFarland préalablement préparée, nous préparons un inoculum combinant un volume de bouillon BHIB avec ladite suspension bactérienne préparée.

Pour chaque inoculum, il faut s'assurer que chaque 10 ml de bouillon BHIB contiennent précisément 50 μ l de la suspension bactérienne, conformément à la méthode décrite par **Shug (2020)**.

La procédure se déroule de la manière suivante :

1. À l'aide d'une seringue, prélevez 60 ml de bouillon BHIB.

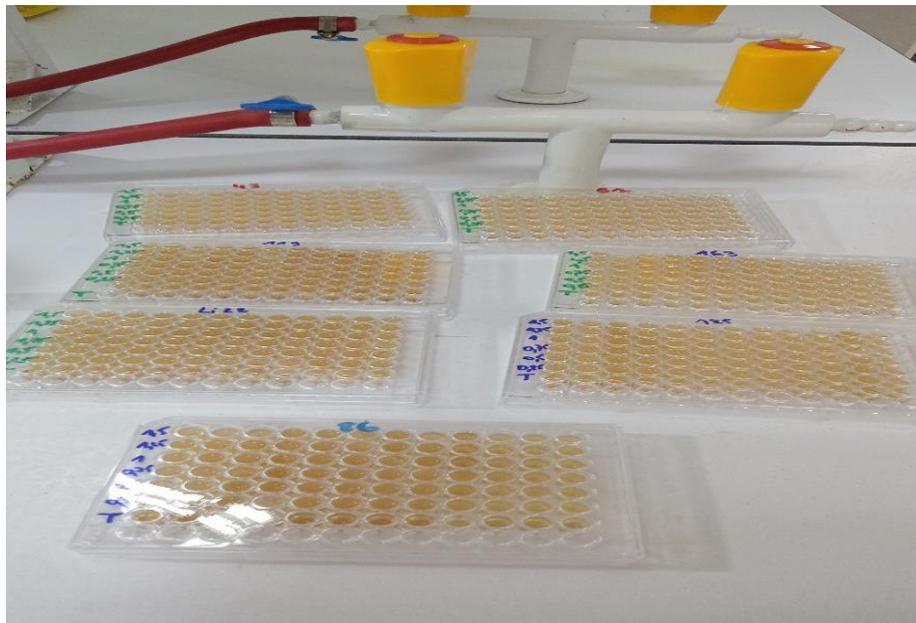
2. Transvasez le volume de BHIB obtenu dans un flacon stérile.
3. Ensuite, ajoutez 300 µl de la suspension bactérienne à ce flacon. Conserver les flacons à une température de 2-8°C jusqu'à leur utilisation.

III.4.2. Remplissage des microplaques

Une microplaque est utilisée pour tester les différentes concentrations préparées du biocide sur *Listeria*. Différentes concentrations sont utilisées pour évaluer leur potentiel antimicrobien.

Pour chaque puits de la microplaque, 100 µl de l'inoculum bactérien préparé avec le BHIB et 100 µl de solution de biocide à tester. Chaque ligne correspond à une concentration de biocide précise.

Les 2 dernières lignes de la microplaque sont réservées aux contrôles positifs (solution bactérienne seule) et négatifs (BHIB). Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour permettre la croissance bactérienne et l'observation de l'activité antimicrobienne du biocide.



FigureN°4 : Microplaques remplies par les différentes concentrations du biocide (Photo personnel).

III.5. Lecture

La lecture est réalisée à l'œil nu, les microplaques sont visualisées sous une lumière blanche, et le premier puits ne présentant pas de troubles (coloration transparente) est considéré comme correspondant à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III. Résultats et discussion.

IV.1. Résultats des CMI obtenues pour chaque isolat :

La lecture des microplaques a permis d'observer les valeurs de CMI rapportées dans le tableau N°6 et figure N°05.

Tableau N°6 : concentration minimale inhibitrice par l'activité de biocide

Isolats	CMI(mg/l)
53	1%
Li63	1%
91	1%
Li24	1%
34	1%
Li126	1%
108	1%
43	0.75%
51	0.25%
119	1.25%
Li22	1%
86	1%
125	1%
163	1%
Li40	1%
98	1.25%
Li47	0.5%
Li49	1%
48	1%
Li129	0.5%

CMI(mg/L) : La concentration minimale inhibitrice observée pour chaque isolat avec biocide.

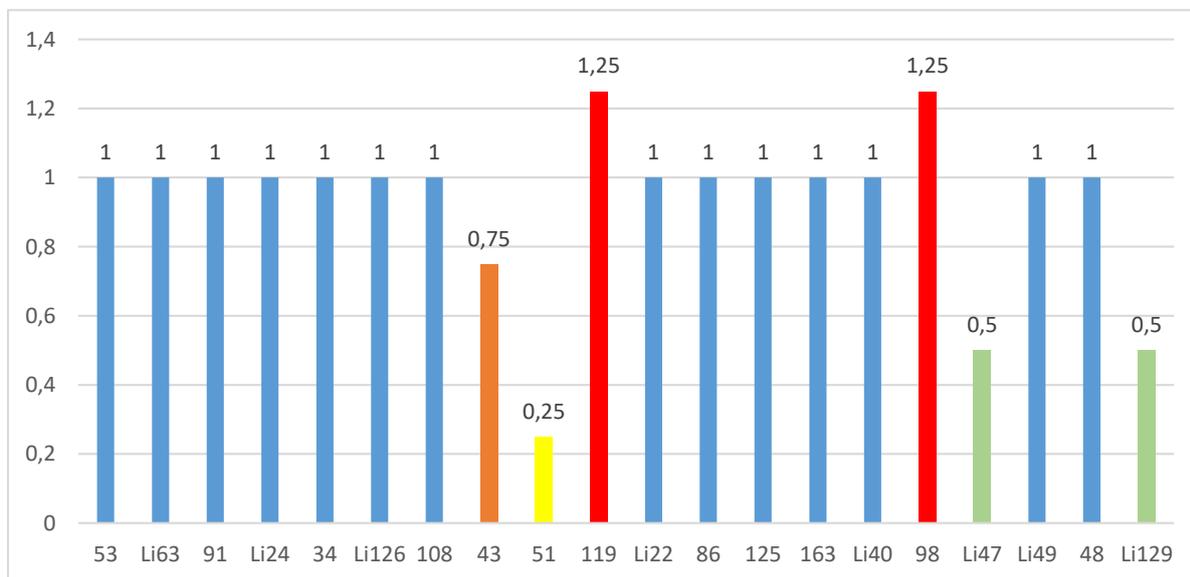


Figure N°5 : Concentrations minimales obtenue pour chaque isolat

Nous avons rassemblé les isolats qui ont montré la même CMI et avons obtenus les résultats représentés dans la figure N°4.

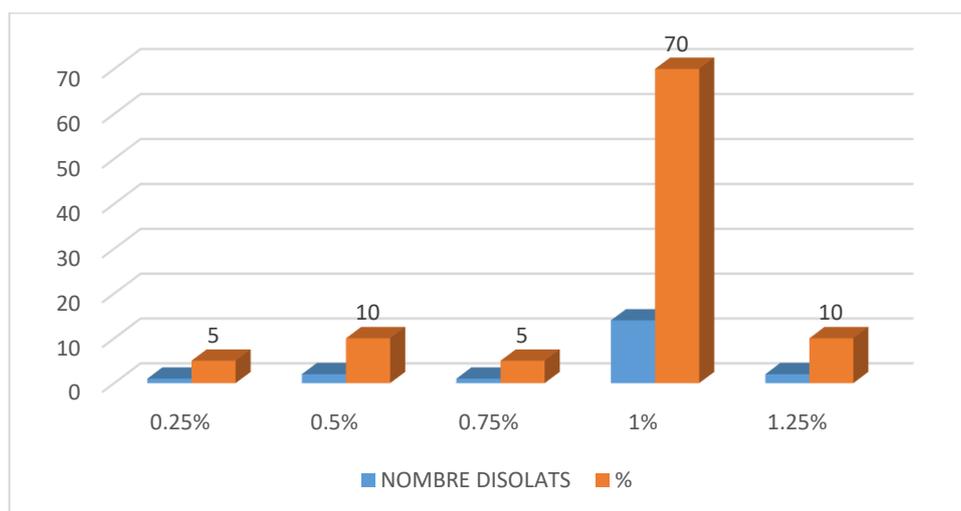


Figure N°6: Pourcentage des isolats ayant présenté la même CMI

Les résultats de la lecture des microplaques ont révélé des valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour les 20 isolats testés, toutes inférieures à la concentration de 2% recommandée par le fabricant. Ces résultats attestent de l'efficacité du produit biocide « Quatacide », qui est composé de composés d'ammonium quaternaire (CAQ), et démontrent que la concentration recommandée est suffisante pour éliminer efficacement les bactéries.

Nos résultats ont également montré que tous les isolats de *Listeria* testés étaient sensibles au biocide utilisé. Cependant, une disparité a été observée quant aux concentrations nécessaires pour inhiber ces isolats : 70% d'entre eux nécessitaient une concentration de 1% pour être inhibés, tandis que 5% pouvaient l'être à une concentration aussi faible que 0,25%.

Ces résultats confirment la sensibilité des *Listeria* aux biocides, une caractéristique déjà soulignée par l'AFSSA (2000), qui les qualifie de sensibles aux composés d'ammonium quaternaire (QAC) à température ambiante, avec des concentrations efficaces de 0,01% à 0,02% (100 à 200 ppm) et des CMI inférieures à 2 g/ml.

De nombreuses études ont examiné la sensibilité de *L. monocytogenes* à divers désinfectants, en particulier aux ammoniums quaternaires, largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire en raison de leur stabilité et de leur efficacité bactéricide même à faible concentration (Rodriguez-Lopez *et al.*, 2018).

Toutefois, une étude récente a révélé que 48% des isolats de *Listeria* testés étaient résistants aux ammoniums quaternaires. Il convient de noter que cette étude a utilisé la méthode des disques, tandis que la méthode de CMI sur microplaque est généralement considérée comme plus fiable pour confirmer la sensibilité ou la résistance des isolats.

Les désinfectants détergents à base de composés d'ammonium quaternaire (QAC) sont largement utilisés dans les milieux hospitalier et agroalimentaire, tant sur les lignes de transformation manuelles que sur les surfaces non en contact avec les aliments. Cela s'explique par leur capacité à pénétrer efficacement, leur non-corrosivité, leur faible toxicité, ainsi que leur activité antimicrobienne à large spectre et leurs propriétés tensioactives. Toutefois, l'utilisation intensive de ces désinfectants, tels que le chlorure de benzalkonium, peut exercer une pression sélective et favoriser l'émergence et la propagation de microorganismes résistants (Liu *et al.*, 2009).

V. Conclusion :

Les résultats de notre étude démontrent l'efficacité du biocide « Quatacide », à base de composés d'ammonium quaternaire (CAQ), contre les isolats de *Listeria*.

Toutes les valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) enregistrées pour les 20 isolats testés étaient inférieures à la concentration de 2% recommandée par le fabricant, confirmant ainsi la capacité du produit à éliminer efficacement les bactéries à la concentration prescrite.

Nos résultats révèlent également une sensibilité des isolats de *Listeria* testés au biocide, bien qu'il existe une variation dans les concentrations nécessaires pour inhiber ces isolats. Notamment, 70% des isolats étaient inhibés à une concentration de 1%, tandis que 5% étaient sensibles à une concentration de seulement 0,25%. Ces observations concordent avec les conclusions de l'AFSSA (2000), qui avait déjà classé *Listeria* comme sensible aux QACs à des concentrations de 0,01% à 0,02% (100 à 200 ppm) et à des CMIs inférieures à 2 g/ml.

La littérature existante corrobore ces résultats, soulignant la sensibilité de *L. monocytogenes* aux ammoniums quaternaires, largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire en raison de leur stabilité et de leur efficacité à faible concentration.

En conclusion, bien que le biocide « Quatacide » soit largement efficace contre *Listeria monocytogenes* à la concentration recommandée, une surveillance continue et une utilisation prudente des QACs sont essentielles pour prévenir le développement de résistances. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour explorer des stratégies d'utilisation afin de maintenir l'efficacité des désinfectants dans les milieux hospitaliers et agroalimentaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) **Afssa, 2000.** Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Rapport de la commission d'étude des risques liée à *Listeria monocytogenes*. 11,14, 34, 35.
- 2) **Agence française de sécurité sanitaire des aliments. (2000, 28 juillet).** Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. Consulté le 15 juin 2021 sur : <https://www.anses.fr/fr/content/la-commission-d%E2%80%99%C3%A9tude-des-risques-li%C3%A9s-%C3%A0-listeria-monocytogenes-0>
- 3) **Allion, A. (2004).** Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. [Thèse de doctorat, École nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires]. Archives-ouvertes.
- 4) **Anonyme, 2024.** <https://ecotoxicologie.fr/desinfectants>, consulté le 27/06/2024
- 5) **Anses, 2016.** Évaluation de la résistance des biocides antimicrobiens. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2016SA0252Ra.pdf> consulté le 28 /06/2024.
- 6) **ANSES.2019.** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. (novembre 2019). Évaluation de la résistance de biocides antimicrobiens. Avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective (éd. scientifique). www.anses.fr
- 7) **Audurier, A., Rocourt, J. and Courtieu, A.L. (1977).** Isolement et caractérisation De bactériophages de *Listeria monocytogenes*. Annales de Microbiologie. (Institut Pasteur), **128(2), 185-198.**
- 8) **Augustin, J. C. (1999).** Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria Monocytogenes* dans les aliments. These de Doctorat, Lyon: Université Lyon I. France.
- 9) **Berche.P.(2022).** **Bactériologie Médicale,** <http://www.microbes-edu.org/etudiant/listeriam.html> consulté le 27/06/2024.
- 10) **Catharine R. Carlin¹, Jingqiu Liao^{1,2†}, Daniel L. Weller^{1 ‡}, Xiaodong Guo¹, Renato Orsi¹ and Martin Wiedmann¹,(2021).** *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria farberii* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria*

- rustica sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 71:004795, doi: 10.1099/ijsem.0.004795
- 11) **CIPR. 2010.** Commission Internationale pour la Protection du Rhin Rapport d'évaluation
 - 12) **D. Conficoni, C. Losasso, E. Cortini, A. Di Cesare, V. Cibin, V. Giaccone, G. Corno et A. Ricci. 2016.** Résistance aux biocides de *listeria monocytogenes* collectée dans les environnements de transformation de la viande. *Microbiol avant* (7) : 1627.
 - 13) **ÈGLEMENT (UE) N o 528/2012 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL** du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.
 - 14) **Farber J.M., Coates F., Daley E. (1992).** Minimum water activity requirements for the growth Of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 103- 105.
 - 15) **Federighi .M. (2005).** BACTÉRIOLOGIE ALIMENTAIRE. ECONOMICA, 2^{ème} éd. Héricart. Paris. France, 98-104p
 - 16) **Gray M. L., Killinger A. H. (1966).** *L.monocytogenes* and *Listeria* infections. *Bactériol . Rev.* 30(2),309-382.
 - 17) **K. Poole.2002.** Mécanismes de résistance bactérienne aux biocides et aux antibiotiques. *Symp Ser Soc Appl. Microbiol* (31) : 55S-64S.
 - 18) **Kaissmoun. 2009;** *Listeria monocytogenes* et les produits alimentaires.
 - 19) **Larpent J.P. (2004).** *Listeria*. Tec et Doc, 3^{ème} éd., Lavoisier. Paris. France, 01-11p.
 - 20) **Liu, Q., Liu, M., Wu, Q., Li, C., Zhou, T., & Ni, Y. (2009).** Sensitivities to biocides and distribution of biocide resistance genes in quaternary ammonium compound tolerant *Staphylococcus aureus* isolated in a teaching hospital. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 41(6-7), 403-409. 10.1080/00365540902856545
 - 21) **Maillard, J.-Y. (2018).** Resistance of bacteria to biocides. *Microbial Spectrum*, 6(2), ARBA-0006-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0006-2017>
 - 22) **Martínez-Suárez JV, Ortiz S and López-Alonso V (2016)** Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments.

- 23) **Massicotte, R. (2009)**. Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité : principes fondamentaux. Éd., La Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec.
- 24) **MTE. 2020** . MINISTERE DE LA TRANSITION ECOLOGIQUE / LES PRODUITS BIOCIDES <https://www.ecologie.gouv.fr/politiques-publiques/produits-biocides>
- 25) **Murray, E.G.D., Webb, R.A. and Swann, M.B.R. (1926)**. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J.Pathol. Bacteriol.* 29: 407-439
- 26) **Oulmi, L. (2017)**. Agents antimicrobiens et résistance aux antibiotiques. Université des Frères Mentouri. Consulté le 05 mai 2021 sur : <http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/microbio/2017/>
- 27) **Rocourt, J., Audurier, A., Courtieu, A.L., Durst, J., Ortel, A., Schrettenbrunner, A. And Taylor, A.G. (1985)**. A multi-centre study on the phage typing of *Listeria Monocytogenes*. *Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Ser. A*, 259, 489-497
- 28) **Rodriguez-Lopez, P., Rodriguez-Herrera, J. J., Vazquez-Sanchez, D., & Lopez Cabo, C. (2018, 05 juin)**. Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: Incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7(6),
- 29) **Sautra L., Federighi M. et Jouve J. (1998)**. Manuel de Bactériologie alimentaire. Ed Polytechnica, Pp: 133-162.
- 30) Serotyping and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from
- 31) **Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. (1980)**. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30: 229-420.
- 32) **Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2011)**. Introduction à la Microbiologie (2e éd.). Pearson.
- 33) **Varela MF, Stephen J, Lekshmi M, Ojha M, Wenzel N, Sanford LM, Hernandez AJ, Parvathi A, Kumar SH. (2021)**. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics (Basel)*. 17;10(5):593. doi: 10.3390/antibiotics10050593. PMID: 34067579; PMCID: PMC8157006.
- 34) **Y. D.N. Tremblay, S. Hathroubi, et M. Jacques.2014**. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* 78(2): 110–116.