

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE
THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
EN SCIENCES VETERINAIRES

Présentée par : LEZZOUM ATEK SARA

THEME

Etude de la capacité de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Escherichia coli* à former des biofilms et leur sensibilité aux biocides

Soutenu le : 04/12/2019

Devant la commission de jury

Pr. AIT OUDHIA Khatima	Professeur	Président	ENSV
Pr HAMDI Taha- Mossadek	Professeur	Directeur de thèse	ENSV
Dr BOUAYAD Leila	M.C.A	Co-directrice de thèse	ENSV
Pr EL-GROUD Rachid	Professeur	Examineur	U. Constantine
Dr DIB Amira	M.C.A	Examineur	U. Constantine
Dr HOUICHER Abderrahmane	M.C.A	Examineur	U. Laghouat

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir donné le courage, la volonté et le savoir-faire pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier profondément et sincèrement mon promoteur Pr HAMDI T-M (ENSV), pour sa disponibilité, ses précieux conseils, ses encouragements et sa confiance en moi.

J'exprime ma profonde gratitude au président du jury, Pr AIT OUDHIA K (ENSV) ainsi qu'aux membres du jury Pr EL-GROUD R (U. Constantine), Dr DIB A (U. Constantine) et Dr HOUICHER A (U. Laghouat) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie ma Co- Directrice de thèse : Dr BOUAYAD L (ENSV) pour la qualité de son encadrement, ses orientations, sa générosité et son esprit de partage. Un Grand merci.

Mes remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, en particulier : les laboratoires bioMérieux pour toute l'aide et l'assistance technique, Pr BENMAHDI et Dr YAHIAOUI du laboratoire SPA, Louiza du laboratoire d'HIDAOA, mon amie Kaci Nesrine, mes étudiantes Soumia et Fatma Zouhra et toute l'équipe du laboratoire de recherche de la faculté SNV de l'université de Bouira.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

A mes parents qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes études, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir aidé dans les moments les plus difficiles, de m'avoir donné la force de continuer et de ne jamais baisser les bras. Que Dieu vous garde pour moi et vous procure santé et longue vie.

A ma belle-mère, merci pour tes encouragements et ton soutien. Thanemirth atass atass, aquim yehrez rabi.

A la mémoire de mon beau père. Je suis persuadée que vous auriez été fière de moi, fière de nous. Continu à veiller sur nous. Nous vous aimons.

A mon âme sœur, mon complice, ma moitié, mon cher époux AMINE. J'ai essayé longuement de trouver les mots qu'il faut pour t'exprimer ma gratitude mais en vain. En vrai, je sais que je n'ai pas besoin de te dire merci ! Car je sais que tu es et tu resteras toujours là à m'épauler, m'inspirer et me soutenir dans tout ce que j'entreprends dans ma vie et surtout tu es la seule personne capable de me supporter pour toute une vie.

A mes petits anges, ma raison de vivre, mes enfants : Mélina, Anaïs et Racim.

A tous les membres de ma famille et ma belle-famille en particulier ma petite sœur Dallel, ma belle-sœur Ibtissem et les petits Célia et Wassim.

A Tata Zahia et sa fille Noura qui se reconnaîtrons.

A Mon amie Sara et tous mes amis de l'école Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Résumés

Résumés

Résumé

La présente étude a été menée pour évaluer d'une part, la capacité de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Escherichia coli* à former des biofilms sur un support en polystyrène et un support en plastique sous différentes conditions, et d'étudier la sensibilité des biofilms formés à certains biocides d'autre part.

Différentes suspensions ont été préparées avec des espèces bactériennes seules et en association à différentes charges bactériennes. Les suspensions préparées ont été cultivées pendant 6 jours, sur des microplaques en polystyrène et des cuves en plastique dans des conditions d'aérobiose et de microaérophilie. L'évaluation du pouvoir d'adhésion et de la formation des biofilms a été déterminée par coloration au cristal violet suivie par la mesure de la densité optique ou de l'absorbance (selon le support utilisé) à un intervalle régulier pendant la période d'incubation, avec et sans renouvellement du milieu de culture. La sensibilité des biofilms formés à 4 biocides à base d'ammoniums quaternaires, amine et hypochlorite de sodium a été étudiée en calculant les pourcentages de réduction relatifs à chaque biocide.

Toutes les bactéries testées ont présenté des pouvoirs d'adhésion et de formation de biofilms plus ou moins importants en fonction de la variation des paramètres étudiés. Leur développement est plus important en renouvelant le milieu de culture et en augmentant la charge initiale de bactéries. Pour les souches sérotypées, la capacité à adhérer et à former des biofilms différaient d'un séro groupe à un autre. La sensibilité des biofilms aux biocides variait en fonction des paramètres testés.

La capacité à former des biofilms est un facteur clé de la persistance des bactéries testées dans l'environnement. Notre étude a montré que *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *E. coli* peuvent adhérer au polystyrène et au plastique et former des biofilms dans différentes conditions. Leurs sensibilités aux biocides variaient en fonction de plusieurs paramètres. Des travaux de recherches sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes de la formation de biofilms et leur influence sur leur développement et leur sensibilité aux biocides.

Mots clés : Biofilm, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, polystyrène, plastique, sensibilité aux biocides.

Abstract

The present study was conducted to evaluate the ability of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* to form biofilms on a polystyrene support and plastic support under different conditions, as well as biofilm susceptibility to biocides.

Different suspensions were prepared with single bacterial species and with different combination at different microbial concentration. The prepared solutions were incubated for 6 days on polystyrene microplates and plastic tanks under aerobic and microaerophilic conditions. Assessment of adhesion and biofilm formation was determined by crystal violet staining followed by measurement of optical density or absorbance at a regular interval during the incubation period, with and without renewal of the culture medium. The sensitivity of biofilms formed to 4 biocides compound by: quaternary ammonium, amine and sodium hypochlorite was studied by calculating the reduction percentages for each biocide.

All the bacteria tested showed adhesion and biofilm formation more or less important depending on the variation of the studied parameters. Their development is more important by renewing the culture medium and increasing the initial load of bacteria. For serotyped strains, the ability to adhere and form biofilms differed from one serogroup to another.

The ability to form biofilms is a key factor in the persistence of bacteria tested in the environment. Our study showed that *L.monocytogenes*, *L.innocua* and *E. coli* can adhere to polystyrene and plastic and form biofilms under different conditions. Their sensitivity to biocides varied according to several parameters. More researches are needed to understand the mechanisms of biofilm formation and their influence on their development and susceptibility to biocides.

Keywords: Biofilm, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, polystyrene, plastic, variation of parameters, sensitivity to biocides

ملخص:

أجريت هاته الدراسة لتقييم قدرة *Escherichia coli* , *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* لتشكيل أغشية حيوية على سطح بلاستيكي و سطح من البوليسترين تحت ظروف مختلفة ، ودراسة حساسية الأغشية المكونة للمواد المزيللة للبكتيريا.

تم اعداد عدة محاليل مكونة من كل نوع من البكتيريا و كذلك محاليل مكونة من خليط من البكتيريا المراد دراستها . تم وضعها على الأسطح لمدة ستة أيام في ظروف هوائية عادية و ظروف ميكرو هوائية. تقييم قوة تكوين الأغشية تم عن طريق التلوين بالكريستال البنفسجي متبوع بقياس الكثافة البصرية أو الإمتصاص (حسب طبيعة السطح) في فترات منتظمة خلال مدة الدراسة، مع و بدون تجديد الوسط. حساسية الأغشية للمواد المزيللة للبكتيريا تم تقييمها باستعمال أربع مواد مكونة من الألمنيوم الرباعي، الأمين و هيبوكلوريت الصوديوم عن طريق حساب نسبة تخفيض الغشاء لكل مادة مستعملة.

جميع البكتيريا المختبرة كانت قادرة على تكوين الأغشية الحيوية بكميات متباينة على حسب الظروف التي أجريت فيها الدراسة.

كان النمو أفضل في الوسط المجدد و بالكميات العليا من البكتيريا. بالنسبة لسلاسل المعروفة الشكل. كان تكوينها للأغشية مختلف من سلالة إلى أخرى. بالنسبة للحساسية للمواد المزيللة للبكتيريا، النتائج كانت تختلف باختلاف الظروف المدروسة.

القدرة على تكوين الأغشية هي عامل رئيسي في استمرار البكتيريا في العيش في البيئة. أظهرت دراستنا أن *E.coli* , *L.innocua* , *L.monocytogenes* قادرة على تشكيل الأغشية الحيوية على البلاستيك و البوليسترين تحت الظروف المختلفة. حساسيتها للمواد المزيللة للبكتيريا تختلف وفقا لعدة معالم. هناك حاجة إلى مزيد من البحوث لفهم آليات تشكيل الأغشية الحيوية و تأثيرها على حساسية البكتيريا للمواد المزيللة لها.

كلمات المفتاح : أغشية حيوية ، *Escherichia coli* , *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*

سطح من البلاستيك ، سطح من البوليسترين، الحساسية للمواد المزيللة للبكتيريا.

Liste des abréviations

ABS : absorbance.

ABSs : absorbance des suspensions bactériennes.

ABSnc : absorbance du témoin (contrôle négatif).

AFNOR : association française de normalisation.

ALOA : agar pour *Listeria* selon Ottaviani et Agosti.

AMQ : ammonium quaternaire.

CS : citrate de Simmons.

DA : désinfectant à base d'amine.

DDAC : détergent désinfectant acide à base d'ammonium quaternaire.

DDAL : détergent désinfectant alcalin à base d'ammonium quaternaire.

DO : densité optique.

DO₁ : densité optique mesurée avant l'ajout du biocide à tester.

DO₂ : densité optique mesurée après l'ajout du biocide à tester.

DOnc : densité optique du témoin (contrôle négatif).

ESC : esculine.

E. coli : *Escherichia coli*.

EHEC : *Escherichia coli* Entero Hémorragiques.

EIEC : *Escherichia Coli* EntéroInvasives.

EPEC : *Escherichia coli* Entéro-Pathogènes.

EPS : exo polysaccharides.

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxinogènes.

F : forte.

GLU : glucose

ISO : organisation internationale de normalisation.

L. m : *Listeria monocytogenes*.

L.m/IIa : *Listeria monocytogenes* appartenant au séro groupe IIa.

L.m/IIb : *Listeria monocytogenes* appartenant au séro groupe IIb.

L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*.

L. innocua : *Listeria innocua*.

L. i : *Listeria innocua*.

LPS : lipopolysaccharides.

LAC : lactose.

Liste des abréviations

LDC : lysine décarboxylase.

M : moyenne.

NaClO : hypochlorite de sodium (Eau de javel).

ODC : ornithine décarboxylase.

PGA : Poly- β -1,6-N-Acétyle-Glucosamine.

QS : quorum sensing.

STEC: *E. coli* productrices de shigatoxines « Shiga-toxin producing *E. coli* ».

TSA: tryptone soya agar.

TSB: tryptone soya broth.

TDA : tryptophane désaminase.

URE : uréase.

VP : voges Proskauer.

Liste des figures

Figure N° 1 : Schéma représentant les étapes du développement du biofilm.	6
Figure N° 2 : Voies de contamination par <i>Escherichia coli</i>	16
Figure N° 3: Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les microorganismes	36
Figure N° 4 : Diagramme d'isolement, d'identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. innocua</i>	53
Figure N° 5: Diagramme d'isolement, d'identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i>	54
Figure N° 6 : Test de sensibilité aux biocides des biofilms formés sur le polystyrène.....	59
Figure N° 7: Aspect des colonies de <i>L. monocytogenes</i> et de <i>L. innocua</i> et sur milieu ALOA	61
Figure N° 8: Aspect des colonies d' <i>E. coli</i> sur milieu chromID™.....	61
Figure N° 9: Aspect des colonies sur gélose TSA.	62
Figure N° 10 : Tube de TSB après 24h d'incubation (apparition de trouble).	62
Figure N° 11 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de <i>L. innocua</i> (Suspension à 1McFarland).....	63
Figure N° 12 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> (Suspension à 1McFarland).....	65
Figure N° 13 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i>	66
Figure N° 14: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de <i>L. innocua</i> (suspension à 4McFarland).	67
Figure N° 15: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L.monocytogenes</i> (suspension à 4 McFarland)	69
Figure N° 16: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E.coli</i> (suspension à 4 McFarland)	70
Figure N° 17: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de l'association de bactéries de l'espèce <i>L. monocytogenes</i> (Suspension à 1McFarland).	72
Figure N° 18: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> + <i>E. coli</i> (suspension à 1McFarland).	73
Figure N° 19: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E.coli</i> + <i>L. innocua</i> (suspension à 1McFarland).	74
Figure N° 20: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i> + <i>L. monocytogenes</i> (suspension à 1McFarland).....	76

Liste des figures

Figure N° 21: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i> (suspension à 1McFarland).	77
Figure N° 22: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i> (suspension à 4McFarland)	78
Figure N° 23: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i> (suspension à 4McFarland)	80
Figure N° 24: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L.innocua</i> (suspension à 1McFarland).	81
Figure N° 25: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L.monocytogenes</i> (suspension à 1McFarland).	83
Figure N° 26: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>E.coli</i> (suspension à 1McFarland).	84
Figure N° 27: Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilm à <i>L.monocytogenes</i> , <i>L.innocua</i> et <i>E.coli</i> (suspensions à 4McFarland).	85
Figure N° 28 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L.monocytogenes</i> (suspensions à 1McFarland).	86
Figure N° 29: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>E.coli</i> + <i>L.monocytogenes</i> (suspensions à 1McFarland).	87
Figure N° 30 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>E.coli</i> + <i>L.innocua</i> (suspensions à 1McFarland).	88
Figure N° 31 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>E.coli</i> + <i>L.monocytogenes</i> + <i>L.innocua</i> (suspensions à 1McFarland)	89
Figure N° 32 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>L.monocytogenes</i> + <i>L.innocua</i> (suspensions à 1McFarland)	90
Figure N° 33: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi espèces (suspensions à 4McFarland).	91
Figure N° 34: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm des souches sérotypées de <i>L. monocytogenes</i> (suspensions à 1 McFarland).	93
Figure N° 35 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi souches et multi espèces (suspensions à 1 et 4 McFarland).	95
Figure N° 36: Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilms après renouvellement du milieu de culture	96
Figure N° 37: Effet de la durée d'incubation sur la formation des biofilms.	97

Liste des figures

Figure N° 38: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 023 après ajout des différents biocides.	99
Figure N° 39 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 026 après ajout des différents biocides.....	100
Figure N° 40: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 038 après ajout des différents biocides.....	102
Figure N° 41 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 043 après ajout des différents biocides.....	104
Figure N° 42 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 055 après ajout des différents biocides.....	105
Figure N° 43: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 036 après ajout des différents biocides.....	107
Figure N° 44: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par <i>L.innocua</i> après ajout des différents biocides.....	108
Figure N° 45: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par <i>E.coli</i> après ajout des différents biocides.	110
Figure N° 46 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association L.m/IIa après ajout des différents biocides.	111
Figure N° 47 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association L.m/IIa + L.i après ajout des différents biocides.....	113
Figure N° 48 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association L.m/IIb + L.i après ajout des différents biocides.	114
Figure N° 49: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIa après ajout des différents biocides.....	116
Figure N° 50 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIb après ajout des différents biocides.	117
Figure N° 51 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIa + L.i après ajout des différents biocides.....	118
Figure N° 52 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIb + L.i après ajout des différents biocides.....	120
Figure N° 53: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.i après ajout des différents biocides.	121

Liste des tableaux

Tableau N° 1 : Caractères biochimiques d' <i>E.coli</i>	13
Tableau N° 2: Caractères biochimiques différenciant quelques espèces du genre <i>Listeria</i>	20
Tableau N° 3: Testes biochimiques réalisés en utilisant une galerie API <i>Listeria</i>	21
Tableau N° 4 : Sérovars de quelques espèces du genre <i>Listeria</i>	22
Tableau N° 5 : Caractéristiques de la listériose	24
Tableau N° 6: Capacité de production de l'unité d'abattage.	47
Tableau N°7: Répartition des prélèvements selon la nature de la surface échantillonnée.	48
Tableau N° 8 : Estimation de la formation des biofilms	55
Tableau N° 9: Suspensions bactériennes préparées aux deux densités : 1 et 4 McFarland.	57
Tableau N° 10 : Nature et concentration des biocides testés par puits	59
Tableau N° 11 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de <i>L. innocua</i> (suspension à 1McFarland).	63
Tableau N° 12: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> (Suspension à 1McF)	64
Tableau N° 13 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i> (suspension à 1 McFarland)	65
Tableau N° 14: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de <i>L. innocua</i> (suspension à 4McFarland).	67
Tableau N° 15 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> (suspension à 4 McFarland).	68
Tableau N° 16: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E.coli</i>	70
Tableau N° 17: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de l'association de bactéries de l'espèce <i>L. monocytogenes</i> (Suspension à 1McFarland).	71
Tableau N° 18 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> + <i>E. coli</i> (suspension à 1McFarland).	73
Tableau N° 19: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E.coli</i> + <i>L. innocua</i> (suspension à 1McFarland).	74
Tableau N° 20 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i> + <i>L. monocytogenes</i> (suspension à 1McFarland).	75
Tableau N° 21: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i> (suspension à 1McFarland).	76
Tableau N° 22: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i> (suspension à 4McFarland).	78

Liste des tableaux

Tableau N° 23: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i> (suspension à 4McFarland)	79
Tableau N° 24: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L.innocua</i> (suspension à 1McFarland).	81
Tableau N° 25 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L.monocytogenes</i> (suspension à 1McFarland).	82
Tableau N° 26 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>E.coli</i> (suspension à 1McFarland).	83
Tableau N° 27 : Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilm à <i>L.monocytogenes</i> , <i>L.innocua</i> et <i>E.coli</i> (suspensions à 4McFarland).	85
Tableau N° 28: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L.monocytogenes</i> (suspensions à 1McFarland).....	86
Tableau N° 29: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>E.coli</i> + <i>L.monocytogenes</i> (suspensions à 1McFarland).	87
Tableau N° 30 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>E.coli</i> + <i>L.innocua</i> (suspension à 1McFarland)	88
Tableau N° 31: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i> (suspensions à 1McFarland).	89
Tableau N° 32 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i> (suspensions à 1McFarland).	90
Tableau N° 33 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi espèces (suspensions à 4McFarland).	91
Tableau N° 34 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm des souches sérogroupées de <i>L. monocytogenes</i> (suspensions à 1 McFarland).	92
Tableau N° 35: Estimation de la force d'adhésion et de formation des biofilms des souches sérogroupées de <i>L. monocytogenes</i> (suspensions à 1 Mcfarland).	92
Tableau N° 36 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi souches et multi espèces (suspensions à 1 et 4 McFarland)	94
Tableau N° 37 : Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilms après renouvellement du milieu de culture.	96
Tableau N° 38: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 023 après ajout des différents biocides.....	98

Liste des tableaux

Tableau N° 39 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 026 après ajout des différents biocides.....	100
Tableau N° 40: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 038 après ajout des différents biocides.....	102
Tableau N° 41 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 043 après ajout des différents biocides.....	103
Tableau N° 42: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 055 après ajout des différents biocides.....	105
Tableau N° 43: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 036 après ajout des différents biocides.....	106
Tableau N° 44: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par <i>L.innocua</i> après ajout des différents biocides.....	108
Tableau N° 45: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par <i>E.coli</i> après ajout des différents biocides.....	109
Tableau N° 46 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association L.m/IIa après ajout des différents biocides.	111
Tableau N° 47 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association L.m/IIa + L.i après ajout des différents biocides.....	112
Tableau N° 48 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association L.m/IIb + L.i après ajout des différents biocides.	114
Tableau N° 49 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIa après ajout des différents biocides.....	115
Tableau N° 50: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIb après ajout des différents biocides.	117
Tableau N° 51 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIa + L.i après ajout des différents biocides.....	118
Tableau N° 52 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.m/IIb + L.i après ajout des différents biocides.....	119
Tableau N° 53 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association <i>E.coli</i> + L.i après ajout des différents biocides.	121

Table des matières

Introduction	1
Partie bibliographique	
I. Biofilms.....	3
I.1.Généralités	3
I.2. Etapes de formation de biofilm	4
I.2.1. Formation du film de conditionnement	4
I.2.2. Adhérence réversible	4
I.2.3. Adhérence irréversible	4
I.2.4. Développement et maturation du biofilm.....	4
I.2.5. Détachement du biofilm	5
I.3. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	6
I.3.1. Propriétés physicochimiques de la surface bactérienne	6
I.3.2. Propriétés de la surface bactérienne liées aux entités moléculaires	6
I.3.3. Facteurs liés au milieu environnant.....	7
I.3.4. Facteurs liés à la surface abiotique	9
II. Méthodes d'étude <i>in vitro</i> des biofilms.....	9
II.1. Observation aux microscopes	9
II.2. Comptage direct.....	10
II.3. Mesure de la biomasse.....	10
II.3.1. Crystal Violet	10
II.3.2. Syto9	10
II.4. Mesure de la viabilité cellulaire	11
II.5. Mesure de la matrice	11
III. <i>Escherichia coli</i> et la formation des biofilms.....	12
III.1. Historique	12
III.2. Définition	12
III.3. Caractères bactériologiques.....	12
III.4. Habitat, pouvoir pathogène et stratégie de l'infection	13
III.5. Mode de transmission.....	15
III.6. Déterminants de la formation de biofilm chez <i>E. coli</i>	16
IV. Le genre <i>Listeria</i> et la formation des biofilms:	18
IV.1. Historique	18
IV.2. Taxonomie, caractéristiques morphologiques et biochimiques	18
IV.3. Caractères culturels.....	21

Liste des abréviations

IV.4. Caractéristiques antigéniques.....	22
IV.5. Facteurs de virulence et physiopathologie	22
IV.6. Habitat et pouvoir pathogène	23
IV.6.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	23
IV.6.2. <i>Listeria innocua</i>	24
IV.7. Formation de biofilm chez <i>Listeria</i>	25
IV.7.1. Déterminants de la formation de biofilm chez <i>L. monocytogenes</i>	25
V. Contamination des surfaces par les bactéries	27
V.1. Intérêt des opérations de nettoyage et désinfection :.....	27
V.2. Nettoyage et désinfection en industrie agroalimentaire	28
V.2.1. Nettoyage.....	28
V.2.2. Agents de nettoyage	30
V.2. 2.1. Agents de nettoyage alcalins	30
V.2.2.2. Agents de nettoyage acides.....	31
V.2. 2.3. Détergents enzymatiques :.....	32
V.2.3. Désinfection.....	32
V.2.3.1. Définition.....	32
V.2.3.2 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants	32
V. 2.3.3. Types de désinfectants et mécanismes d'action généraux.....	33
V.3. Protocoles de nettoyage et désinfection	41
VI. Résistances bactériennes aux désinfectants	42
VI.1. Propriétés intrinsèques des bactéries conférant une sensibilité réduite aux biocides	43
VI.2. Résistance acquise aux désinfectants associée aux modifications génotypiques.....	45
Partie expérimentale	
I. Matériels et méthodes	47
I.1. Matériels	47
I.1.1. Echantillonnage des surfaces	47
I.1.2. Isolats et souches bactériennes testés :.....	48
I.1.3. Matériel de laboratoire	49
I.2. Méthodes.....	50
I.2.1. Echantillonnage	50
I.2.2. Isolement et identification	51
I.2.3. Revivification des souches de <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. innocua</i>	55
I.2.4. Méthodes de réalisation des tests d'adhésion et de formation de biofilms	55
I.2.5. Sensibilité aux biocides	58

Table des matières

I.2.6. Analyse statistique.....	60
II. Résultats.....	61
II.1. Isolement de <i>Listeria</i>	61
II.2. Isolement d' <i>E. coli</i>	61
II.3. Repiquage sur TSA et enrichissement sur TSB.....	62
II.4. Résultats des tests d'adhésion et formation de biofilms sur le support en plastique.....	62
II.4.1. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 1 McFarland	62
II.4.1.1. Biofilm à <i>L. innocua</i>	62
II.4.1.2. Biofilm à <i>L. monocytogenes</i>	64
II.4.1.3. Biofilm à <i>E. coli</i> :.....	65
II.4.2. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 4 McFarland	66
II.4.2.1. Biofilm à <i>L. innocua</i>	66
II.4.2.2. Biofilm à <i>L. monocytogenes</i>	68
II.4.2.3. Biofilm à <i>E. coli</i>	69
II.4.3. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi espèces à concentration de 1 McFarland	71
II.4.3.1. Associations des bactéries de l'espèce <i>L. monocytogenes</i>	76
II.4.3.2. Association <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i>	72
II.4.3.3. Association <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i>	73
II.4.3.4. Associations <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	75
II.4.3.5. Association <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	76
II.4.4. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi espèces à concentration de 4 McFarland	77
II.4.4.1. Association <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i>	77
II.4.4.2. Association <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i>	79
II.5. Résultats des tests d'adhésion et formation de biofilms sur le support en polystyrène ...	80
II.5.1. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 1 McFarland	80
II.5.1.1. Biofilms à <i>L. innocua</i>	80
II.5.1.2. Biofilm à <i>L. monocytogenes</i>	81
II.5.1.3. Biofilms à <i>E.coli</i>	83
II.5.2. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 4 McFarland	84

Table des matières

II.5.3. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi-espèce à concentration de 1 McFarland	86
II.5.3.1. Association de bactéries de l'espèce <i>L. monocytogenes</i>	86
II.5.3.2. Association <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i>	87
II.5.3.3. Association <i>E. coli</i> + <i>L. innocua</i>	88
II.5.3.4. Association <i>E. coli</i> + <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	89
II.5.3.5. Association <i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i> :.....	90
II.5.4. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi espèces à concentration de 4 McFarland	91
II.6. Effet du sérotype sur la capacité de <i>L. monocytogenes</i> à former des biofilms.....	92
II.7. Effet du renouvellement du milieu de culture	95
II.8. Effet de la durée d'incubation.....	97
II.9. Sensibilité des bactéries formant les biofilms aux biocides	97
II.9.1. Tests réalisés sur les biofilms mono espèce	97
II.9.1.1. Biofilms à <i>L. monocytogenes</i>	97
II.9.1.2. Biofilms à <i>L. innocua</i>	107
II.9.1.3. Biofilms à <i>E.coli</i>	108
II.9.2. Tests réalisés sur les biofilms multi espèce	110
III. Discussion	122
Conclusion	143
Perspectives et recommandations.....	145

Introduction

Introduction

Les biofilms sont présents sur terre depuis des milliards d'années. Toute surface solide en contact avec un fluide contenant des bactéries est susceptible d'être un support de biofilm. Certains estiment qu'ils représentent le mode de vie de plus de 99% des bactéries terrestres **(Dupont, 1997)**. Les biofilms colonisent des surfaces très variées, ils sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé publique et de l'industrie, leurs impacts négatifs les plus connus sont les maladies nosocomiales, les contaminations de produits alimentaires, la biodétérioration des matériaux, en particulier la biocorrosion et l'encrassement biologique des équipements industriels **(Parot, 2007)**.

Un biofilm est défini comme étant une communauté de microorganismes adhérant à une surface et entourée d'une matrice complexe d'exopolysaccharides (EPS) formée de substances synthétisées par ces microorganismes **(Bougle, 2003 ; Clutterbuck et al., 2007)**. Sa composition peut être variable (hydrates de carbone, protéines et autres substances telles que des lipides ou de l'ADN) **(Rodriguez, 2007)**. Les EPS fournissent une protection à la population microbienne composant le biofilm en concentrant les nutriments, séquestrant les métaux et les toxines et empêchant la dessiccation et l'accès aux biocides **(Chmielwski et Frank, 2003)**.

Dans une industrie agroalimentaire, les surfaces constituent un support pouvant recevoir et héberger à la fois des salissures et des micro-organismes. Arrivés à proximité des surfaces réceptrices, par sédimentation ou par contact, les micro-organismes peuvent adhérer par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques. Interactions qui dépendent des propriétés de la surface, des micro-organismes et de la nature du revêtement. La plupart de ces germes sont pathogènes et peuvent causer diverses maladies une fois relargués en contaminant les aliments **(Bonsaglia, 2014)**. Parmi ces pathogènes nous citerons : *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus*. La rugosité et la topographie de la surface jouent également un rôle important sur le nombre de bactéries adhérentes **(Barbosa, 2017 ; Belco et al., 2017 ; Jeon et al., 2018)**.

Dans des conditions favorables de température, d'hygrométrie, de concentration en oxygène et de disponibilité des nutriments, les cellules microbiennes ayant adhéré sur une surface peuvent se multiplier et former un biofilm. Les surfaces peuvent favoriser la persistance de flores microbiennes indésirables, en particulier de flores résistantes à l'action des biocides. Elles peuvent également se comporter comme émetteurs de micro-organismes **(Cappitelli et al, 2014)**.

Introduction

Parmi ces bactéries, nous nous sommes intéressés particulièrement à trois espèces bactériennes : *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua*. *Escherichia coli* et *L. monocytogenes* sont connues pour être des bactéries à l'origine de toxi-infections alimentaires parfois collectives graves, notamment chez les personnes dites « à risque » (femmes enceintes, Immunodéprimés, enfants et personnes âgées).

Notre choix s'est porté sur ces espèces car bien que *Escherichia coli* soit considérée comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces, elle fait partie des coliformes dits thermotolérants, dont la présence dans les aliments indique une contamination fécale et une éventuelle contamination par des bactéries pathogènes (**Le Minor et al., 1954**).

L. monocytogenes est une espèce du genre *Listeria*, considérée comme pathogène chez l'homme et les animaux. Elle montre une grande ressemblance avec *Listeria innocua* dont l'étude est très importante, car elle peut nous renseigner sur quelques caractères de *Listeria monocytogenes* sans qu'elle ait les caractères de pathogénicité de cette dernière, rendant ainsi les manipulations au laboratoire sans risques (**Anses, 2011**).

Les objectifs de ce travail sont répartis en trois parties :

- 1- l'isolement et à l'identification d'isolats d'*E. coli*, *L. monocytogenes* et *L. innocua* à partir de prélèvements réalisés sur les surfaces d'un abattoir de viande rouge Et à la récupération et à la revivification de souches de *L. monocytogenes* (*L.m*) et *L. innocua* (*L.i*) isolées lors d'une étude précédente (**Bouayad et al., 2015**).
- 2- L'étude de la capacité des bactéries sélectionnées à former des biofilms sur des supports en polystyrène et des supports en plastique sous différentes conditions
- 3- L'étude de la sensibilité des bactéries formant les biofilms à 4 biocides sélectionnés.

Ce document comprend :

- ✚ Une étude bibliographique, qui résume :
 - comment se forme le biofilm ;
 - un rappel des principales caractéristiques microbiologiques de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Escherichia coli* ainsi que leur pouvoir pathogène et leur capacité à former des biofilms.
 - une partie consacrée à l'usage des biocides dans l'industrie agroalimentaire.
- ✚ Une étude expérimentale où sont développés les objectifs de l'étude, le matériel et les méthodes utilisés, les résultats obtenus, la conclusion, les recommandations et les perspectives.

Partie bibliographique

Partie bibliographique

I. Biofilms

I.1. Généralités

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'Antone Van Leeuwenhoek qui, au XVII^e siècle et grâce à un microscope de son invention, mis en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. D'autres observations ont été réalisées 250 ans après par d'autres chercheurs : En **1933**, **Arthur Henrici** plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement (**Henrici, 1933**). **Heukalakian et Heller (1940)** observent « l'effet de bouteille » : la fourniture d'un substrat solide auquel des microorganismes marins peuvent s'attacher augmente leur croissance et activité métabolique (**Heukelekian, 1940**). En **1943**, **Claude Zobell** montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (**Zobell, 1943**). En **1969**, **Jones et al.** travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux confirment non seulement la présence d'agrégats mono ou polymicrobiens, mais aussi l'existence d'une matrice polyosidique (**Jones et al., 1969**). **Characklis** démontre en **1973** que des dépôts microbiens au sein de conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent tenaces et résistants aux désinfectants (**Characklis, 1973**). Enfin, en **1978**, les travaux de **Costerton et al.** mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixée sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines (**Costerton et al., 1978**). Ils proposent pour la première fois le terme « biofilm ». Ce dernier peut donc être défini comme étant une communauté structurée de différents microorganismes aérobies ou anaérobies qui se caractérisent par des cellules fixées les unes aux autres, l'ensemble ainsi formé étant lui-même fixé à une surface non toxique (bois, verre, plastique, métal sauf cuivre, etc.), dans toutes les positions d'orientation de la surface. Ces microorganismes sont réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils secrètent. La structuration et l'organisation des biofilms est régulée par un système de communication intercellulaire complexe fondé sur une détection de la densité cellulaire (notion du Quorum Sensing) (**Ronald et al., 1999 ; Boutaleb, 2007 ; Behlau et Gilmore, 2008 ; Alnnasouri et al., 2011 ; Jain et al., 2011**). Toute surface solide en contact avec un fluide contenant des bactéries est susceptible d'être le support d'un biofilm. Certains estiment qu'il représente le mode de vie de plus 99% des bactéries terrestres (**DuPont, 1997**).

Partie bibliographique

I.2. Etapes de formation de biofilm

Différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (**Pace *et al.*, 2005**). Les différentes phases de formation du biofilm sont décrites ci-dessous.

I.2.1. Formation du film de conditionnement

Toute surface immergée dans un milieu liquide se modifie spontanément grâce à des molécules qui existent dans son environnement et qui couvrent la surface par un film de matières organiques, non organiques ou des composés biologiques de l'environnement. La source du film de conditionnement ainsi que et la nature de la surface déterminent la structure du film de conditionnement qui modifie les propriétés physicochimiques de la surface influençant ainsi l'adhésion bactérienne (**Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002**).

I.2.2. Adhérence réversible

Les bactéries sous leur forme libre s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active, cela est favorisé par la présence de liquides ou d'un taux élevé d'humidité. Une fois que les microorganismes sont installés, le processus d'adhésion microbienne aux surfaces est initié. Il est conditionné par un certain nombre de facteurs liés à la nature de la surface, la nature de la bactérie et les conditions environnementales (pH, température etc.). L'attachement se fait de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques, il est considéré comme faible, le lien surface-cellule pouvant facilement être brisé par une faible force. L'adsorption est réalisée par le biais de liaisons chimiques non covalentes de type Van der Waals, électrostatiques et hydrophobes (**Marshall *et al.*, 1971 ; Costerton *et al.*, 1981 ; Rittman, 1989 ; Beloin *et al.*, 2008 ; Høiby *et al.*, 2011**).

I.2.3. Adhérence irréversible

Grace à la production d'exopolysaccharides par les bactéries ainsi que la présence des structures d'adhérence, la fixation à la surface solide devient irréversible. Un lien surface-cellule permanent est ainsi établi et ne peut être brisé qu'en appliquant une action mécanique ou chimique. Dans cette étape, les interactions cellule-support sont de type ioniques, hydrogènes, covalentes et hydrophobes (**Zobell, 1943 ; Kumar et Anand, 1998 ; Beloin *et al.*, 2008 ; Høiby, 2011 ; Yannick *et al.*, 2014**).

I.2.4. Développement et maturation du biofilm

C'est l'étape la plus importante de la formation du biofilm. Les bactéries se multiplient et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'associent entre elles et forment des

Partie bibliographique

microcolonies qui sont englobées dans une matrice exopolysaccharidique. Le nombre de cellules microbiennes augmente et donc la distance entre deux cellules diminue. Cela provoque la sécrétion d'exopolymères qui contribuent à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'un côté et de l'ensemble à la surface d'un autre côté. L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes, ainsi que l'élimination des déchets. La dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et la libération des nutriments sont assurées par les enzymes secrétées et les toxines produites (**Blenkinsopp *et al.*, 1991 ; Tenke *et al.*, 2006 ; Folkesson *et al.*, 2008 ; Jacobsen *et al.*, 2008**).

I.2.5. Détachement du biofilm

Suite à la multiplication des bactéries, le biofilm devient de plus en plus épais. Les bactéries commencent à se détacher du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant. Ce détachement peut être considéré comme un phénomène passif, dépendant des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, il peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes par le biais du système de communication intercellulaire qui induit l'augmentation de la concentration des inducteurs favorisant la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire, permettant ainsi aux bactéries de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Elles peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement.

Les petits agrégats du biofilm commencent à se détacher de la surface superficielle, s'étaler pour remplir les espaces vides, migrer et se déplacer sous l'influence du courant, en conséquence le biofilm s'agrandit. Ces agrégats ainsi que les microorganismes libres peuvent s'éloigner de la surface en étant entraînés par le courant liquide. Ils retombent sur la surface un peu plus loin et recommencent de nouvelles colonies et par conséquent un nouveau biofilm (Figure N° 01) (**Sauer *et al.*, 2002 ; Stoodley *et al.*, 2002 ; Kaplan, 2010 ; Joshi *et al.*, 2010**).

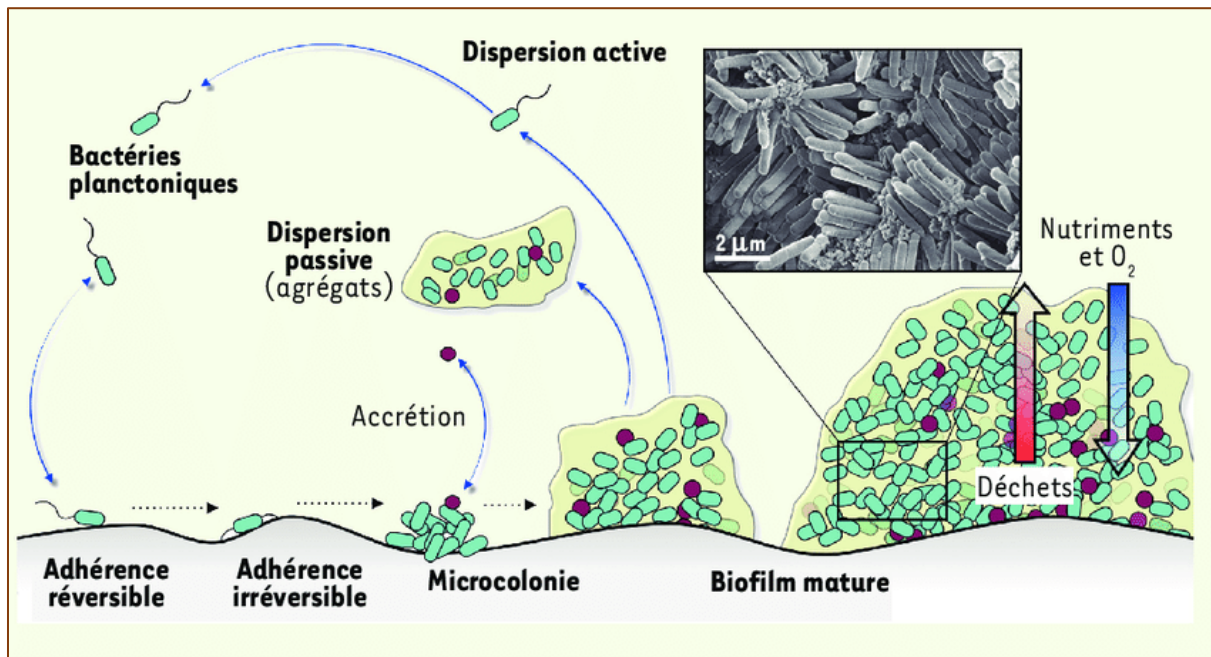


Figure N° 01: Schéma représentant les étapes du développement du biofilm
(Tremblay *et al.*, 2014).

I.3.Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

De nombreux facteurs peuvent influencer la capacité d'une bactérie à adhérer sur une surface :

I.3.1. Propriétés physicochimiques de la surface bactérienne

Elles ont une influence majeure sur le processus d'adhésion et formation du biofilm. Elles peuvent être résumées comme suit :

- Mouvement brownien ou énergie libre brownienne permettant à la bactérie un déplacement aléatoire dans un liquide.
- Interactions de Van der Waals à effet attractif quand la bactérie est à une distance de 20 à 50 nm de la surface. Ces interactions peuvent être influencées par les forces de répulsion électrostatiques.
- Interactions électrostatiques : leurs effets dépendent en partie de la force ionique qui peut être faible induisant une répulsion, forte induisant un attachement ou intermédiaire induisant une adsorption. Elles interviennent lorsque la distance entre la bactérie et la surface est inférieure à 20 nm.

- Interactions acide-base de Lewis : tenant compte de l'effet hydrophobe, elles sont soit répulsives ou attractives et interviennent quand la distance entre la bactérie et la surface est de l'ordre du nanomètre (**Girardin *et al.*, 1999 ; Morisaki *et al.*, 1999 ; Gottenbos *et al.*, 2002 ; Allion, 2004**).

I.3.2. Propriétés de la surface bactérienne liées aux entités moléculaires

a) Entités protéiques

Elles sont représentées par :

- Les appendis tels que les flagelles, les pilis ou les *fimbriae*. Ils facilitent le contact avec le support en permettant de franchir la zone de répulsion électrostatique favorisant ainsi l'adhésion et l'auto agrégation des bactéries.
- les protéines sécrétées et les protéines fortement associées à la paroi bactérienne de manière covalente ou non covalente telles que les protéines de la couche S, qui en plus de leur fonction de protection peuvent être considérées comme un facteur d'adhésion (**Sjollem *et al.*, 1990 ; Vatanyoo *et al.*, 2000 ; Reguera *et al.*, 2007**).

b) Acides teïchoïques et lipoteïchoïques des bactéries Gram positif

En plus de leur rôle antigénique, ces acides jouent un rôle majeur dans l'adhésion grâce à leur hydrophobie et leurs caractères polyanioniques, capables de modifier les propriétés physicochimiques de la surface bactérienne (**Archibald *et al.*, 1993 ; Sleytr et Beveridge, 1999 ; Nousiainen et setälä, 1998 ; Donlan, 2002**) .

c) LPS des bactéries Gram négatif

L'antigène O exposé à la surface de la bactérie confère à la cellule des propriétés hydrophiles qui intervient en augmentant ou en diminuant l'adhésion en fonction de sa présence ou absence (mutants) et aussi en fonction de la nature de la surface (hydrophile ou hydrophobe) (**Schär-Zammaretti et Ubbink, 2003 ; Barak *et al.*, 2007**).

d) Capsule (polysaccharides attachés) et les EPS

L'organisation de la capsule peut influencer l'adhésion bactérienne, et donc la formation de biofilm contrairement aux LPS qui n'interviennent pas dans les phénomènes d'adhésion mais qui jouent un rôle très important dans la formation des biofilms par le biais de la formation de la matrice extracellulaire des biofilms (lors de l'adhésion irréversible) (**Xu, 2010 ; Wang *et al.*, 2015**).

I.3.3. Facteurs liés au milieu environnant

La capacité d'une bactérie à former un biofilm est étroitement liée à la nature du milieu dans lequel elle se trouve. Le pH , la température, la concentration en oxygène, l'osmolarité du

Partie bibliographique

milieu, la disponibilité de nutriments et les processus liés à l'hydrodynamique des fluides sont les principaux paramètres qui peuvent influencer la formation des biofilms.

a. pH

La plupart des bactéries ont une charge globale négative à des pH neutres. Cette charge peut être modifiée en fonction du pH du milieu environnant ce qui induit une modification dans la capacité d'adhésion aux surfaces, soit en augmentant les forces répulsives (pH élevé) ou en les diminuant (**Hamadi et al., 2004 ; Gaboriaud et al., 2006 ; Boutaleb, 2007**).

b. Température

Les paramètres physicochimiques, les propriétés des surfaces bactériennes ainsi que plusieurs activités métaboliques et enzymatiques peuvent être modifiés sous l'effet de la température. A titre d'exemple, les variations de température peuvent augmenter la capacité d'adhésion de la bactérie par l'augmentation de l'hydrophobicité de sa surface ou la diminuer par l'atteinte de la mobilité cellulaire et la production de flagelles (**Cappello et Guglielmino, 2006 ; Dumas, 2007**).

c. Concentration en oxygène

Celle-ci peut intervenir dans l'ampleur de la formation du biofilm en agissant soit en faveur du développement bactérien ou l'inverse (**Auger, 2012**).

d. Concentration en fer et osmolarité

La présence d'ions spécifiques impacte la formation des biofilms. Les interactions électrostatiques sont influencées par la force ionique du fluide environnant. Une concentration élevée en électrolytes ou la présence de contre-ions polyvalents provoque une diminution des interactions électrostatiques et une baisse de la capacité d'adhésion de la bactérie (**Fletcher, 1988 ; Allion, 2004**).

e. Sources de carbone disponibles et concentration en nutriments

La formation et le développement du biofilm nécessite impérativement la présence de nutriments. Leur nature et leurs concentrations influencent la maturation du biofilm et le maintien de son équilibre (**Martinez, 2007 ; Spormann, 2008**).

f. Hydrodynamique du fluide

L'exposition aux turbulences de la surface dans un fluide est déterminée selon sa position. La zone de moindres turbulences facilite l'adhésion des bactéries, c'est la zone de fixation. Elle se caractérise par une faible soumission aux forces exercées par le fluide (**Bunt et Tucker, 1995 ; O'Toole et al., 2000 ; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008**).

Partie bibliographique

I.3.4. Facteurs liés à la surface abiotique

Tout matériau (incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol, les milieux aquatiques et/ou sur les équipements de l'industrie agroalimentaire) mis en contact avec un fluide contenant des bactéries peut constituer un support pour la formation d'un biofilm. Plusieurs caractères de ces matériaux influent sur le pouvoir d'adhésion des bactéries (**De Chalvet et De Rochemonteix, 2009 ; Gominet *et al.*, 2017**).

a. Rugosité de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus sa colonisation par les bactéries est importante car les forces répulsives sont faibles et la superficie est plus importante (**Characklis, 1990 ; Donlan, 2002**).

b. Propriétés physico-chimiques de la surface

Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

c. Présence de films protéiques sur la surface ou de résidus

La présence préalable sur une surface de substance protéique telle que les urines, le sang, l'albumine etc., ou de résidus tels que ceux des produits de nettoyage, influence le comportement bio adhésif des bactéries en modifiant les paramètres physicochimiques de la surface (**Katsikogianni *et al.*, 2004 ; Alnnasouri *et al.*, 2011**).

II. Méthodes d'étude *in vitro* des biofilms

Plusieurs méthodes ont été développées pour analyser les biofilms. Certaines sont destructibles, d'autres sont non destructibles. La mesure de la biomasse ainsi que la matrice sont réalisées. Des études de viabilité peuvent aussi être entreprises pour certains protocoles (étude de l'efficacité d'un antimicrobien par exemple) (**Steven *et al.*, 2000 ; Peeters *et al.*, 2008**).

II.1. Observation aux microscopes

Le microscope optique en mode fond noir a été utilisé par Lawrence *et al.* (1989), en combinaison avec de l'analyse d'image pour quantifier la cinétique de croissance, la mobilité et le comportement des micro-organismes sur les surfaces. D'autres types de microscopes plus performants et donnant plus d'informations peuvent être utilisés (exemple : Microscope confocal à balayage laser (MCBL), Microscopie à Force

Partie bibliographique

Atomique (MFA), Microscopie électronique à balayage (MEB) (**Chang *et al.*, 1986 ; Goddard *et al.*, 1993 ; Lewandowski et Beyenal, 2007**).

II.2. Comptage direct

Cette méthode est fondée sur la séparation des bactéries associées sur une surface, puis l'évaluation du nombre et du type de microorganismes présents. Plusieurs méthodes ont été proposées :

- 1- Sur une cellule de comptage sous un microscope avec ou sans coloration (**Rogers *et al.*, 1994**).
- 2- Utilisation de la cellule de Malassez (Hématimètre) : La suspension bactérienne est placée dans la cuvette puis recouverte d'une lamelle. Les microorganismes sont comptés au microscope avec ou sans coloration.
- 3- L'ensemencement d'un volume défini d'échantillon sur milieu de culture gélosé. Après incubation, le calcul de la quantité de microorganismes viables cultivables des bactéries présentes dans l'échantillon analysé est réalisé.

II.3. Mesure de la biomasse

De nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse, parmi lesquelles :

II.3.1. Crystal Violet

Le Crystal Violet (CV) est un colorant basique qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. La méthode de quantification de la formation de biofilm utilisant le CV a été décrite la première fois par Christensen *et al.*, en (1985), puis modifiée par plusieurs auteurs afin d'augmenter sa précision et l'adapter aux protocoles expérimentaux selon les objectifs recherchés. Les bactéries vivantes, les bactéries mortes et la matrice exopolysaccharidique sont donc colorées par le CV. La manipulation est réalisée conventionnellement sur des microplaques. Chaque puits est inoculé avec une suspension bactérienne. Après incubation de la microplaque, des étapes de lavage, coloration au CV, de nouvelles étapes de lavage et de redissolution du colorant sont réalisées. La densité optique, mesurée par spectrophotométrie dans un lecteur de microplaque, est proportionnelle à la quantité de biomasse dans le puits de la microplaque (**Stepanovic *et al.*, 2000 ;Extremina *et al.*, 2011**).

II.3.2. Syto9

Le Syto9 est un colorant vert fluorescent qui diffuse passivement à travers les membranes cellulaires et se lie à l'ADN des bactéries vivantes et des bactéries mortes, ainsi

Partie bibliographique

qu'à la matrice extracellulaire. Il permet une quantification de la biomasse du biofilm (Honraet *et al.*, 2005 ; Peeters *et al.*, 2008).

II.4. Mesure de la viabilité cellulaire

Des techniques de quantification basées sur l'activité métabolique des bactéries vivantes ont été développées telles que :

- **Mesure de l'ATP** en utilisant l'enzyme Firefly-luciférase. La quantité de lumière produite par cette réaction enzymatique peut être mesurée, et est liée directement à la quantité d'ATP et donc au nombre des cellules microbiennes (De blackburn, 1989).

- **Utilisation du sel de tétrazolium ou le XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)** qui peut être réduit par les bactéries

métaboliquement actives en formazan, un colorant orange soluble dans l'eau et quantifiable par spectrophotométrie (Samaranayake *et al.*, 2004; Honraet *et al.*, 2005 ; Peeters *et al.*, 2008).

- **Utilisation de la résazurine** qui peut être réduite par les bactéries métaboliquement actives en résorufine, un composé rose fluorescent mesurable par fluorimétrie est dont la quantité est directement proportionnelle au nombre de bactéries viables présentes dans le milieu. La résazurine est aussi utilisée dans les protocoles d'évaluation de l'efficacité d'agents antimicrobiens dans la lutte contre les biofilms (Pettit *et al.*, 2005 ; Peeters *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2011; Punithavathy *et al.*, 2012).

II.5. Mesure de la matrice

La matrice extracellulaire est un élément essentiel à la formation et au maintien d'un biofilm mature. Le 1,9-DiMethylMethylene Blue (DMMB) est utilisé pour la mesure de la matrice. En présence de polysaccharides sulfatés de la matrice du biofilm, il forme un complexe insoluble qui après décomplexation libère un colorant dont la quantité est mesurable par spectrophotométrie (Peeters *et al.*, 2008 ; Tote *et al.*, 2008).

Partie bibliographique

III. *Escherichia coli* et la formation des biofilms

III.1. Historique

En 1885, Theodor Escherich découvre un bacille qu'il dénomma *Bacterium coli* (*E. coli*) commun dans les selles de nourrissons (**Leminor et al., 1954**). Son nom actuel lui est ensuite donné en 1919 par Castellani et Chambers (**Buttiaux et al., 1956 ; Grimont, 1987**).

III.2. Définition

Selon le **Bergey's manual (2012)** *Escherichia coli* appartient au règne des *Bacteria*, embranchement des *Proteobacteria*, classe des *Gamma Proteobacteria*, ordre *Enterobacteriales*, famille des *Enterobacteriaceae*, genre d'*Escherichia* et espèce *Escherichia coli* (*E. coli*). Ce sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase. Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Seul *E. coli* est potentiellement pathogène pour l'homme. *E. coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique.

E.coli est un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de 10^8 par gramme de fèces (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme). A ce titre, *E.coli* est recherchée dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale et leur présence suggère la possibilité que d'autres bactéries ou virus d'origine digestive s'y trouvent (**Avril et al., 1987 ; Grimont, 1987 ; Le Minor et al., 1990 ; Avril et al., 2000 ; Carip, 2008 ; Stewart et al., 2015**).

III.3. Caractères bactériologiques

a. Caractères morphologiques et culturels

E. coli ou colibacille est une bactérie Gram négatif, asporulée, aéro-anaérobie facultative, cultivant facilement sur milieux ordinaires. Après 18-24h à 37°C sur milieux solides, les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche (**Avril et al., 2000**).

b. Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques d' *E. coli* sont résumés dans le tableau N° 01.

Partie bibliographique

Tableau N° 01 : Caractères biochimiques d'*E. coli* (Avril *et al.*, 2000 ; Fluadroit, 2004)

TEST	GLU	LAC	H2S	GAZ	CS	GEL	MAL	LDC	NIT	ODC	ADH	URE	TDA	VP	ESC
RESULTAT	+	+	-	+	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-

Légende : +: caractère positif -: caractère négatif +/- : caractère inconstant

c. Caractères antigéniques

La différenciation entre les souches commensales et les souches pathogènes peut être effectuée en réalisant l'identification des antigènes et le sérogroupage. En effet, certains sérotypes ne sont jamais, ou rarement, associés à des maladies tandis que d'autres le sont très fréquemment. L'antigène somatique O, définissant le sérotype est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne. L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène K de surface (ou antigène de capsule) n'est pas toujours présent mais s'il l'est, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O.

L'espèce *E. coli* peut être subdivisée en sérotypes par la combinaison des deux antigènes somatique O et flagellaire H (ex : O157:H7), ou sérogroupes si l'antigène somatique O seul a été déterminé (ex : O157) (**Beutin, 1999 ; Surellane, 1997**).

III.4. Habitat, pouvoir pathogène et stratégie de l'infection

Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes). L'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence chez les souches d'*E. coli* peuvent entraîner des modifications de leur comportement pouvant occasionner diverses infections telles des infections intestinales ou extra-intestinales. Ces facteurs de virulence permettent à *E. coli* de coloniser la surface de diverses muqueuses de l'hôte, de lutter contre ses mécanismes de défenses, envahir les cellules et stimuler les mécanismes inflammatoires. Ces facteurs de virulence sont généralement codés par des éléments génétiques mobiles facilitant ainsi le transfert de l'information génétique entre les souches. Ces dernières peuvent être regroupées en huit pathovars. Les six premiers regroupent les *E. coli* responsables d'infections intestinales. Elles se multiplient dans le tube digestif et sont éliminées dans les fèces contaminant ainsi le milieu extérieur (**Levine, 1988 ; Montet, 2009 ; Greatedorex *et al.*, 2000 ; Bergey's, 2001**).

Partie bibliographique

- **ETEC** (*E. coli* Entérotoxigènes) : qui peuvent provoquer des diarrhées aiguës, «cholera-like » suite à la sécrétion d'entérotoxine codée par un plasmide qui porte aussi des gènes responsables de la production de pili ou fimbriae (adhésines) qui permettent l'attachement des *E.coli* à la muqueuse intestinale. Les ETEC sont une des causes les plus fréquentes des diarrhées de l'enfant dans les pays en voie de développement et de diarrhées des voyageurs. Les ETEC appartiennent aux sérogroupes : O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 et O173 (**Nataro et al., 1998 ; Kaper et al., 2004 ; Stenutz et al., 2006**).

- **EHEC** (*E. coli* Entérohémorragiques) : font partie d'un groupe plus large d'*E. coli* producteur de Shiga-toxine (STEC) qui ne sont pas tous pathogènes pour l'homme (**Giaouris et al., 2015**). Elles se fixent sur la surface des cellules de la muqueuse, causent l'abrasion de la bordure en brosse des villosités intestinales et produisent des cytotoxines provoquant ainsi une diarrhée aiguë, aqueuse, puis hémorragique. Les cytotoxines ou vérotoxines sont produites sous le contrôle de bactériophages en situation chromosomique (intégrés). Elles hébergent aussi un plasmide codant pour une adhésine. Les EHEC se propagent sous forme épidémique à partir d'aliments contaminés (maladie du hamburger) et provoquent jusqu'à plusieurs centaines ou milliers de cas à la fois. Elles peuvent aussi être à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU), dans 5 à 10 % des cas. Le sérotype O157:H7 est le plus fréquent pour les souches EHEC chez l'homme, mais d'autres sérotypes comme les O26:H11, O26:H-, O111:H-, O103:H2, O145:H- sont de plus en plus fréquents (**Nataro et Kaper, 1998**).

- **EIEC** (*E. coli* entéroinvasives) : elles ont un pouvoir invasif sur de la muqueuse colique, certaines provoquent des diarrhées aiguës, « dysenterie-like », avec présence de mucus, sang et leucocytes dans les selles. Ces *E.coli* ont été isolés dans quelques cas sporadiques de diarrhée aiguë. Leur virulence est liée à la présence d'un plasmide très proche de celui connu chez *Shigell*. Elles appartiennent aux sérogroupes : O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164 et O167 (**Karper et al., 2004 ; Stenutz et al., 2006 ; Martinez-Medina, 2009**).

- **EPEC** (*E. coli* entéropathogènes) : certaines souches d'*E.coli* sont associées à des diarrhées et sont clairement entéropathogènes grâce à des propriétés d'adhésion particulières. Elles ne sont ni sécrétrices d'entérotoxine, ni entéroinvasives. Elles forment des pilis, codés par des plasmides, qui forment des « faisceaux » qui se fixent sur les villosités des entérocytes. Les villosités sont progressivement détruites (attachement-effacement). Les sérogroupes des souches EPEC les plus fréquemment associés à la diarrhée chez l'homme sont : O111, O128, O86, O55, O125, O127 et chez les bovins, le sérotype O26 (**Mainil, 2000**).

Partie bibliographique

- **EAEC** (*E. coli* entéroagrégatifs) : elles ont été associées à des cas de diarrhée chez des voyageurs, des enfants et des patients immunodéprimés ainsi que des cas d'infections urinaires. Les EAEC producteurs de shigatoxines (*Stx*) ont été associés au syndrome hémolytique et urémique et à la colite hémorragique (**Nataro et al., 1998**).

- **DAEC** (*E. coli* à adhérence diffuse) : elles ont été associées aux diarrhées infantiles. Les quelques souches étudiées étaient hautement hétérogènes en ce qui concerne le contenu plasmidique et le sérotype (**Gióon et al., 1991**).

Les deux pathovars restants regroupent les *E. coli* responsables d'infections extra intestinales (ExPEC). Il s'agit des UPEC (Urinary Pathogenic *E. coli*) et les NMEC (Neonatal Meningitis *E. coli*) responsables d'infections urinaires, méningites ou de septicémies (**Mokady et al., 2005**). Ces dernières ont acquis la capacité d'induire des infections en dehors de leur site principal de multiplication leur permettant ainsi de se propager dans tout l'organisme (**Johnson et Russo, 2005**). Cette classification n'est pas la seule, d'autres classifications existent. On parle notamment de groupes distincts tel que :

- Le groupe **APEC** (Avian Pathogenic *E. coli*) rassemblant les *E. coli* qui engendrent des maladies chez la volaille (**La Ragione, et Woodward, 2002 ; Dziva et Stevens, 2008**) ;

- Le groupe des **AIEC** (Adherent Invasive *E. coli*) qui est associé avec la maladie de Crohn (**Darfeuille-Michaud, 2002**) ;

- Le groupe des **STEAEC** (Shiga-toxin-producing enteroaggregative *E. coli*) dont la souche *E. coli* O104:H4 est responsable de l'épidémie de SHU en 2011 en Allemagne (**Mora et al., 2011**).

III.5. Mode de transmission

La transmission se fait principalement par voie indirecte alimentaire, par consommation d'aliments d'origine animale (produits carnés, principalement la viande de bœuf, aussi viande de volaille) (**Paton, 2001 ; Vernozy-Rozand et al., 2005**) ou d'origine végétale (fruits et légumes crus) (**Baranyi, et Roberts, 1995**) ainsi que la consommation d'eaux de boisson ou la consommation accidentelle des eaux de baignades contaminées par un environnement souillé par les matières fécales animales ou humaines (**Jackson et al., 1998 ; Kern-Benaibout, 2006**).

Le lait et les produits laitiers ont aussi été incriminés suite à une contamination environnementale des matières premières (**Bielaszewska et al., 1997 ; Allerberger, 2001**). La seconde voie de transmission est directe par contact interhumain par le biais de contamination oro-fécale (**Sugiyama et al., 2005**) ou par contact avec des ruminants infectés porteurs et excréteurs. Le contact direct avec des animaux de la ferme ou avec leurs déjections ainsi que les visites régulières à la ferme peuvent être à l'origine de cas isolés, sporadiques ou

Partie bibliographique

d'épidémies (O'Brien *et al.*, 2001). L'environnement se contamine principalement par la contamination des sols et des eaux superficielles à partir des déjections animales ou d'effluents contaminés (fumiers et lisiers) épandus pour fertiliser les terres agricoles ainsi que les eaux usées issues des abattoirs ou des stations d'épuration (Figure N° 02) (Marc, 2000 ; Grif *et al.*, 2005).

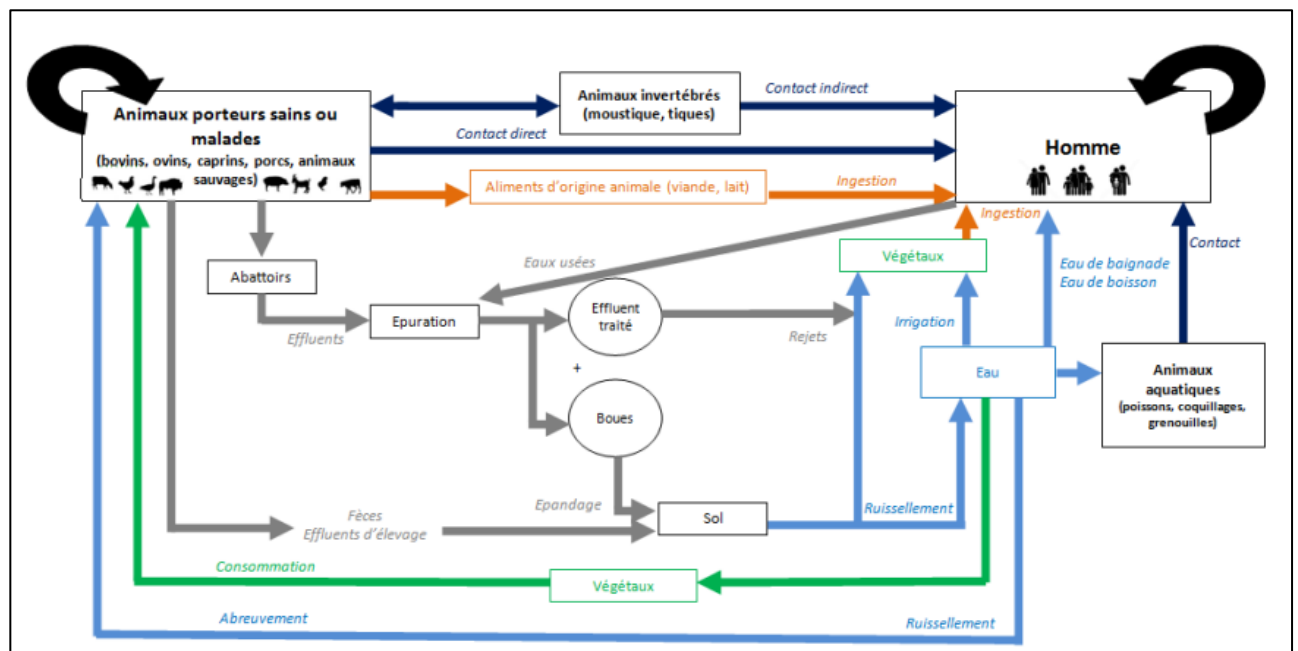


Figure N° 02 : Voies de contamination par *Escherichia coli* (AFSSA, 2003)

III.6. Déterminants de la formation de biofilm chez *E. coli*

E. coli est capable de coloniser de nombreuses niches écologiques, et dispose de tout un arsenal de structures d'adhérence de spécificités plus ou moins larges et plus ou moins démontrées. Plusieurs éléments structuraux d'*E. coli* interviennent dans la formation des biofilms. Leur régulation ainsi que leur expression sont étroitement liées aux conditions environnementales. On peut citer les flagelles et les fimbriae (ou pilis), l'antigène 43, le PGA (Poly- β -1,6-N-acétyl- glucosamine), la cellulose ou l'acide colanique etc. (Van Houdt *et Michiels*, 2005 ; Beloin *et al.*, 2008).

a. Flagelles

Ce sont des structures protéiques semi rigides ancrés dans la membrane interne. Leur rôle principal est d'assurer la mobilité de la bactérie dans un milieu liquide ou semi liquide. Ils interviennent aussi dans le phénomène d'adhésion sur les surfaces en luttant contre les forces électrostatiques répulsives facilitant ainsi l'attachement de la cellule et l'initiation de la

Partie bibliographique

formation des biofilms (**Pratt et Kolter, 1998**). Cependant, certaines souches non mobiles sont également capables de former des biofilms telles que les EAEC (**Sheikh *et al.*, 2001**) ou de souches surexprimant des adhésines de surfaces telles que les curli (type de fimbriae produits par *E.coli*) (**Prigent-Combaret *et al.*, 2000**).

b. Fimbriae (ou pili)

Ce sont des structures fibrillaires et rigides situées à la surface, plus fines que des flagelles. Il s'agit de la polymérisation d'une sous-unité polypeptidique (piline) assemblée à des polypeptides mineurs comme l'adhésine. Elles permettent aux bactéries de s'attacher les unes aux autres et sur la surface. Il existe quatre classes principales de fimbriae : les fimbriae de type 1, les fimbriae P, les curli et les pilis conjugatifs. Ils ont un rôle crucial dans les phénomènes d'adhésion pour la colonisation primaire des surfaces et le développement ultérieur du biofilm en augmentant les interactions entre les cellules (**PrigentCombaret *et al.*, 2000**).

c. Auto-transporteurs de type V

Les autotransporteurs représentent le système de sécrétion le plus simple et le plus utilisé chez les bactéries à Gram négatif grâce à un mécanisme appelé sécrétion de type V. Ce sont des protéines modulaires qui contiennent toute l'information pour leur sécrétion dans leur séquence. Les phénotypes associés à l'expression d'un autotransporteur peuvent être très variés et, souvent, les autotransporteurs sont des protéines multifonctionnelles. C'est le cas notamment des autotransporteurs AIDA-I, TibA et Ag43 d'*E. coli* qui promeuvent l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales, l'auto-agrégation des bactéries et la formation de biofilm. Ces trois autotransporteurs ont d'ailleurs été regroupés dans une même famille, appelée les autotransporteurs auto-associatifs (SAATs) (**Henderson *et al.*, 2004 ; Restieri *et al.*, 2007 ; Beloin *et al.*, 2008 ; Sakamoto, 2013 ; Côté, 2014**).

d. Polysaccharides de la matrice du biofilm

Les polysaccharides sont les constituants les plus importants de la matrice extracellulaire. Plusieurs types d'exopolysaccharides ont été retrouvés tel que l'alginate, cellulose, gellane, pullulane et xanthane. Le polysaccharide majeur de la matrice extracellulaire est le PGA : Poly- β -1,6-N-Acétyle-Glucosamine. Ce polymère est requis pour l'adhésion et joue le rôle d'un échafaudage qui maintient les bactéries entre elles et stabilise la structure du biofilm (**Vu *et al.*, 2009, Öner, 2013 ; Whitfield *et al.*, 2015**).

Partie bibliographique

e. Polysaccharides à la surface bactérienne

Le LPS est présent sur toutes les bactéries Gram négatif, il n'est pas seulement une molécule exprimée en surface de la bactérie, mais aussi un composant important de la membrane externe. Avec sa structure complexe et ses systèmes de biosynthèse, le LPS représente une importante source de variabilité antigénique pour la bactérie, due surtout à la variabilité de l'antigène O. Le rôle joué par le LPS dans le processus d'adhérence a été mis en évidence par plusieurs études, il intervient dans le processus de fixation sur la surface et la formation des biofilms (Szalo *et al.*, 2006 ; Beloin *et al.*, 2008).

IV. Genre *Listeria* et la formation des biofilms

IV.1. Historique

La listériose fut décrite la première fois en 1911 par le vétérinaire Suédois Hulphers chez des lapins atteints de méningites. En 1926, la bactérie a été isolée lors d'une épizootie chez des lapins et des cobayes qui présentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie. Ils lui donnèrent alors le nom de *Bacterium monocytogenes*.

Depuis, la bactérie a été isolée par plusieurs chercheurs tels que Pirie (1927) qui lui donne le nom de *Listerella hepatolytica*, Nyfeld (1929) qui l'appelle *Bacterium monocytogenes hominis*. Ce n'est qu'en 1940 que le nom de *Listeria* est attribué à cette bactérie pour honorer la mémoire du docteur Lord Joseph Lister. Sohler *et al.* (1948) avaient isolé une souche de *Listeria* possédant la propriété de réduire les nitrates et ce à la différence de *Listeria monocytogenes*, ils l'avaient nommé *Listeria denitrificans* mais cette dernière a été reclassée par la suite dans un nouveau genre nommé *Jonesia*. Reiss, Potel et Krebs (1951) décrivent la forme septicémique du nouveau-né, et les travaux de Seeliger ont montré que *Listeria monocytogenes* joue un rôle assez important aussi bien en pathologie humaine qu'en pathologie animale à partir de 1951. Depuis son isolement, de nombreuses épidémies de listériose ont été répertoriées chez divers animaux à travers le monde. Les premiers cas de listériose humaine sont décrits en 1960 et la première flambée épidémique associée à la consommation de nourriture contaminée est décrite en 1981 au Canada, suite à ça, *L. monocytogenes* a été l'objet d'une surveillance accrue avec, dans les années 1990, l'instauration de mesures de prévention dans la filière agroalimentaire (Pirie, 1940 ; Schlech *et al.*, 1983 ; Euzéby et Tindall, 2004).

IV.2. Taxonomie, caractéristiques morphologiques et biochimiques

Le genre *Listeria* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacilliales* et à la famille des *Listeriaceae*. *Listeria* a longtemps été considérée comme une bactérie corynéforme; il est actuellement admis que les bactéries de ce genre appartiennent à la

Partie bibliographique

branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* (Rocourt, 1999 ; Avril, 2000 ; Guillet *et al.*, 2010).

Ce genre comporte 18 espèces : *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, *Listeria booriae* et *Listeria costaricensis*

L. monocytogenes et *L. ivanovii* sont les seules considérées comme pathogènes. Ensemble avec *L. marthii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri*, ils forment le groupe « *Listeria sensu stricto* », l'un des deux clades distincts du genre *Listeria*. Le groupe « *Listeria sensu lato* » comprend les espèces *L. fleischmanni*, *L. weihenstephanensis*, *L. rocourtiae*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. newyorkensis*, *L. booriae* et *L. costaricensis* qui ont été isolés à partir de surfaces associées à la nourriture ou de l'environnement. Ce groupe représente le deuxième clade.

Les données génomiques et phénotypiques affirment que les six espèces du clade *Listeria sensu stricto* partagent les mêmes caractéristiques phénotypiques (par exemple, la capacité à se développer à basse température et la motilité flagellaire). Les 11 autres espèces du clade *Listeria sensu lato* représentent trois groupes monophylétiques distincts, qui peuvent justifier la reconnaissance en tant que genres séparés. Ils ont en commun les caractères suivants : ils ne sont pas considérés comme agents pathogènes, ne sont pas mobiles (sauf *Listeria grayi*), peuvent réduire les nitrates (sauf *Listeria floridensis*) et sont négatifs pour le test de Voges-Proskauer (sauf pour *L. grayi*). Contrairement à toutes les autres espèces de *Listeria*, les espèces du nouveau genre proposé *Mesolisteria* ne peut pas pousser en dessous de 7° C (Orsi et Wiedmann, 2016 ; Schardt *et al.*, 2017 ; Núñez-Montero *et al.*, 2018 ; Oren *et al.*, 2018).

Les *Listeria* se présentent sous la forme de petits bacilles droits, de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2,5 µm de longueur, aux extrémités arrondies, se présentant de manière isolée ou groupés en V ou en L ou en palissades ou, parfois, en courtes chaînes ou petits amas. Ce sont des bactéries à Gram positif, non acido-résistantes, non capsulées, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives et mobiles à 20- 25 °C (ciliature pérित्रiche) et faiblement mobiles à immobiles à 37°C (Le Minor et Veron, 1973 ; Seeliger et Jones, 1986). Certaines souches sont halophiles et supportent jusqu'à 20% de NaCl, leur croissance est possible à pH compris entre 6 et 9. Elles ont une préférence pour les faibles pressions en oxygène (tendance plutôt micro aérophile). Elles sont catalase positives mais oxydase négatives, elles sont capables de fermenter de nombreux glucides : glucose (sans production de gaz), fructose, mannose,

Partie bibliographique

amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose et arabitol et hydrolysent l'esculine. En revanche, elles ne produisent pas d'indole, et ne possèdent pas d'activité uréase et gélatinase (Doyle, 1988 ; Brooks *et al.*, 1989 ; Larpent, 2000 ; Zaika et Fanelli, 2003 ; Djenane *et al.*, 2006).

La différenciation des espèces du genre *Listeria* est principalement fondée sur les caractères mentionnés dans le tableau N°02.

Tableau N° 02: Caractères biochimiques différenciant quelques espèces du genre *Listeria* (Rocourt et Jacquet, 2000).

	Hémolyse	CAMP test <i>S. aureus</i> ^a	CAMP test <i>R. equi</i> ^b	D- Xylose ^c	L- rhamnose ^c	α méthyl- mannoside ^c	D- Ribose ^c	Mannitol ^c
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i>								
(subsp <i>ivanovii</i>)	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>								
(subsp <i>londoniensis</i>)	+	-	+	+	-	Variable	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	Variable	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	Variable	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	Non défini	-	+
<i>L. rocourtiae</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>L. weihenstephanensis</i>	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>L. marthii</i>	-	Non défini	Non défini	-	-	Non défini	Non défini	-

^a synergistic β -hemolysis with *Staphylococcus aureus*; ^b synergistic β -hemolysis with *Rhodococcus equi*; ^c production d'acides à partir de (+: positif; -: négatif)

Pour se développer *L. monocytogenes* a des exigences particulières. Elle requiert un milieu contenant les éléments suivants : Biotine, riboflavine, thiamine, acide thioctique, cystéine, glutamine, isoleucine, leucine et valine. L'arginine, l'histidine, la méthionine, l'alanine et le tryptophane constituent des facteurs de stimulation de la croissance. Le fer, l'hémine et les acides nucléiques : cytosine, guanine, adénine, thymine sont des stimulateurs facultatifs (Larpent, 2000). La caractérisation biochimique de *L. monocytogenes* fait appel aux méthodes classiques d'identification bactérienne: catalase+, oxydase-, β -hémolyse sur gélose au sang, D-xylose-, D-mannitol-, L-rhamnose+, Citrate-, α -méthyl-D-mannoside+. Cette bactérie est privée de nitrate réductase, elle fermente le glucose sans production de gaz, elle hydrolyse l'esculine, elle ne produit pas d'indole, ni de H₂S. Elle est uréase- et non protéolytique (gélatine-), phosphatase alcaline+. L'arabinose, le lactose, le mélézitose, le saccharose et la dextrine sont tardivement fermentés ou négatifs. Les sucres, xylose, raffinose, inositol, dulcitol, mannitol et adonitol ne sont pas fermentés (Rocourt et Jacquet, 2000).

Partie bibliographique

L'espèce *Listeria innocua* est capable de métaboliser le méthane, le soufre et l'azote, parmi beaucoup d'autres composés organiques et inorganique. Ces organismes effectuent également de nombreuses voies biosynthétiques, y compris la synthèse peptidoglycane. *Listeria innocua*, comme d'autres membres de leur genre, sont des bactéries anaérobies facultatives, ce qui signifie qu'elles peuvent métaboliser le glucose (et d'autres sucres simples) dans des conditions aérobies et anaérobies. Sous le métabolisme aérobie du glucose, *L. innocua* forme l'acide lactique et l'acide acétique. Cependant, dans des conditions anaérobies, le métabolisme du glucose ne produit que de l'acide lactique (**Brooks et al., 1989**) (Tableau N° 03).

Tableau N° 03 : Testes biochimiques réalisés en utilisant une galerie API *Listeria* (bioMérieux).

1. *Listeria innocua*

ATCC® 33090™

3. *Listeria monocytogenes*

ATCC® 19115™

2. *Listeria ivanovii*

ATCC® BAA-139™

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	[DIM]	ESC	αMAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
1.	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–
2.	+	+	–	+	+	–	V	–	+	–
3.	–	+	+	+	–	+	+	–	–	–

* Occasionnellement (–).

IV.3. Caractères cultureux

Sur gélose nutritive, après incubation de 24 heures à 37°C, les *Listeria* forment de petites colonies translucides, lisses de type « smooth », à bords réguliers, de 1mm de diamètre environ ; lesquelles observées par transillumination oblique selon la technique de Henry, présentent une coloration bleu-vert caractéristique et par transillumination directe, elles apparaissent gris bleutées (**Rocourt et al., 1994 ; Rocourt, 1998**). Sur des cultures plus âgées (de 3 à 7 jours) les colonies ont un diamètre plus important (de 3 à 5 mm de diamètre) avec un centre plus opaque, et parfois d'aspect rugueux.

Sur gélose au sang (5% de sang de cheval ou de mouton), après 24 heures d'incubation à 37°C, les espèces *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri* produisent des colonies entourées d'une zone étroite ou diffuse (selon l'espèce) d'hémolyse de type β. L'hémolyse est souvent le seul caractère permettant la différenciation entre *L. monocytogenes* et *L. innocua*. Cette propriété hémolytique est intimement liée à la pathogénicité des souches (**Rocourt et Jacquet, 1994 ; Rocourt et Cossart, 1998 ; Rocourt, 1998**).

IV.4. Caractéristiques antigéniques

Pour différencier les souches de *L. monocytogenes*, différentes méthodes peuvent être mises en œuvre. La plus ancienne est le sérotypage. Cette méthode est basée sur la détection de 15 antigènes somatiques O et 5 antigènes flagellaires H. L'utilisation de différents antisérums entraîne ou non l'agglutination des souches testées. Treize sérovars ont ainsi pu être définis chez *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7 (**Seeliger et Höhne 1979**). Au total, 17 sérovars ont été différenciés dans le genre *Listeria*. La sérotypie a un grand intérêt dans les tests de dépistage de la virulence, à titre d'exemple, parmi les 13 serovars de *L. monocytogenes*, les serovars 1/2 a, 1/2 b et 4 b sont responsables de 95 % des cas de listériose chez l'homme. Le sérotype 4b cause de loin la majorité des cas de listériose humaine. Le sérotype 1/2a est le plus isolé d'échantillons alimentaires (**Catteau, 1991; Raybourne, 2002 ; Rocourt, 2002; Larpent, 2004 ; Zhang et al., 2007**). Le tableau N° 04 résume les sérovars de quelques espèces du genre *Listeria*.

Tableau N°04 : Sérovars de quelques espèces du genre *Listeria* (Jones and Seeliger 1991).

Espèce	Sérovars
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 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 et 6
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b

IV.5. Facteurs de virulence et physiopathologie

Le tube digestif constitue la principale porte d'entrée des *Listeria*. Les bactéries pénètrent dans les cellules et passent dans le sang ; elles sont captées par les cellules phagocytaires du foie et de la rate où elles se multiplient et envahissent le parenchyme environnant jusqu'aux capillaires sanguins. Une deuxième décharge dans le sang conduit les bactéries jusqu'au système nerveux central provoquant encéphalite et méningite.

Les *Listeria* traversent la membrane intestinale et sont pour la plupart phagocytées par des macrophages. Cette entrée dans le macrophage est liée à la présence des internalines (une protéine de 80 kDa) codées par le gène InIA . Après interaction avec les récepteurs type E-

Partie bibliographique

cadhérine, la bactérie entre à l'intérieur de la cellule par un processus semblable à la phagocytose. Cette entrée est favorisée par l'action d'une protéine codée par le gène InIB. Les bactéries sont alors temporairement enfermées dans une vacuole phagocytaire avant de s'échapper dans le cytoplasme car le compartiment phagosomal est rapidement acidifié par des pompes à protons et dans cet environnement, les bactéries ne peuvent pas se multiplier et vont tenter par conséquent, d'échapper au phagosome (fusion phagolysosomale). Cet échappement se fait par destruction de la membrane du phagosome du fait de l'action synergique de la listériolysine O (une exotoxine hémolytique de 58 kDa, active, à pH acide et codée par le gène hly) et d'une phosphatidyl-inositol phospholipase C codée par le gène plcA.

Les *Listeria* entrent alors au contact du cytoplasme et se multiplient à nouveau. Le macrophage étant détruit par ses propres lysosomes, les *Listeria* se retrouvent dans le sang puis le foie, la rate et même le cerveau (**Cossart et al., 1989 ; Gaillard et al., 1991 ; Camilli et al., 1993 ; De Chastellier et Berche, 1994**).

L'ensemble de gènes de virulence de *Listeria monocytogenes* se répartit en un îlot chromosomique de pathogénicité de part et d'autre du gène hly. La gravité des infections causées par ce germe est liée au pouvoir invasif de ce pathogène capable de pénétrer, de se multiplier et de se propager dans plusieurs types de cellules eucaryotes et est aussi capable de vaincre les trois barrières principales rencontrées dans l'hôte: la barrière intestinale, la barrière du sang-cerveau et la barrière placentaire (**Farber et Peterkin, 1991**).

Il a été montré que *Listeria innocua* était déficiente dans un locus de virulence de 10 kb, un groupe de gènes qui engendre la pathogénicité de *Listeria monocytogenes*. Cela explique pourquoi *L. innocua* n'infecte généralement pas les humains ou les animaux. Elle a aussi un plasmide circulaire de 81 905 paires de base dont la fonction est inconnue (**Glaser et al., 2001 ; Buchrieser et al., 2003**). Mais de nouveaux cas de méningites impliquant *L. innocua* ont été récemment décrits, remettant ainsi en cause la non pathogénicité de cette bactérie (**Johnson et al., 2004 ; Moreno et al., 2012 ; Favaro et al., 2014**).

IV.6. Habitat et pouvoir pathogène

IV.6.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes est une bactérie ubiquiste, tellurique, très largement répandue dans l'environnement, et résistante dans le milieu extérieur (sol, lacs, rivières, eaux d'égouts ou de baies, végétation principalement en décomposition, etc.). Les ensilages mal faits (acidification insuffisante) peuvent contenir des *L. monocytogenes* en grandes quantités et sont à l'origine de la contamination des ruminants. L'environnement est principalement contaminé par les

Partie bibliographique

excréments d'animaux sains et malades : 6 à 30 % des bovins, ovins, porcins, caprins et poulets hébergent naturellement cette bactérie dans leur tube digestif. Ces animaux constituent pour l'homme la principale source de contamination.

La listériose se présente sous deux formes : invasives (résumées dans le tableau N°05) et non invasives. Les formes non-invasives sont rares : ce sont essentiellement des gastroentérites fébriles, dont des épidémies ont été recensées (Anses b, 2011, Jemmi et Stephan, 2006).

Tableau N°5 : Caractéristiques de la listériose (Anses a, 2011)

Durée moyenne d'incubation	Population cible	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période d'excrétion	Complications
Toutes formes confondues : 2 à 88 j, médiane 17 j Formes materno-néonatales : 14 à 88 j, médiane: 28 j Formes neuro-méningées : 2 à 19 j, médiane: 10 j	Toute la population, toutes classes d'âge confondues	Septicémie/bactériémie Méningites, méningoencéphalites, rhomboencéphalites, abcès cérébral Infections locales	Plusieurs jours	Inconnue	Séquelles neurologiques Taux de létalité de 20 à 30 % selon les études Infections locales
	Femme enceinte	Syndrome pseudo-grippal (fièvres, frissons, lombalgies) Avortement spontané Mort <i>in utero</i> , prématurité Infection néonatale	Plusieurs jours	Inconnue	Taux de létalité de 20 % chez les nouveau-nés

IV.6.2. *Listeria innocua*

Listeria innocua est classée comme espèce non pathogène du genre *Listeria*. Elle a été isolée à partir d'échantillons d'aliments divers et de différentes sources environnementales, principalement des usines de transformation des aliments. Jusqu'à la dernière décennie, on considérait que le génome de *L. innocua* ne présente pas les gènes de virulence décrits chez *L. monocytogenes* pathogène et *L. ivanovii* même si elle reste étroitement liée à *L. monocytogenes*.

Cependant, des souches atypiques de *L. innocua* hémolytiques étaient isolées et caractérisées phénotypiquement et génétiquement. Ces souches étaient positives pour plusieurs gènes de virulence du groupe de gènes de l'îlot 1 (LIPI-1) et ont exprimé des caractères de pathogénicité de *L. monocytogenes* notamment l'opéron *inlAB* spécifique à *L. monocytogenes*. Ces souches peuvent éventuellement représenter une étape dans l'évolution de *L. innocua* appartenant probablement à un ancêtre commun à *L. monocytogenes*. Elles peuvent provoquer des infections animales, mais n'étaient pas considérées comme pathogènes pour l'homme jusqu'à la publication de Perrin *et al* (2003) qui a présenté un cas d'infection fatale causé par *L. innocua* ainsi que d'autres auteurs qui ont aussi décrit un cas de méningite causé par *L. innocua*. Des perspectives de recherches restent toujours ouvertes afin de compléter et confirmer les connaissances acquises sur *L. innocua* et son éventuelle diversité génomique (Johnson *et al.*, 2004 ; Moreno *et al.*, 2012 ; Favaro, M, 2014).

IV.7. Formation de biofilm chez *Listeria*

a. *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est capable de coloniser aussi bien les surfaces hydrophiles comme l'acier inoxydable que les surfaces hydrophobes telles que le polytetrafluoroéthylène (PTFE)

Elle peut persister pendant de longues périodes, favorisant la contamination des aliments **(Moltz et Martin, 2005)**. La capacité de *L. monocytogenes* à former des biofilms a été étudiée par plusieurs chercheurs. Différentes surfaces ont été testées telles que le polystyrène, l'inox, le plastique et le verre **(Chae et Schraft, 2000)** et cela, sous différentes conditions **(Mafu et al., 1990; Helke et al., 1993; Ronner et Wong, 1993; Wirtanen, 1995; Borucki et al., 2003; LundeÅn, 2004)**.

b. *Listeria innocua*

L. innocua présente la particularité d'avoir les mêmes caractéristiques que *L. monocytogenes* sans pour autant être pathogène. Sa capacité à former des biofilms a été étudiée par plusieurs chercheurs et sur plusieurs types de surfaces **(Jeon et al., 2018)**. Les taux d'adhésion et de formation de biofilms les plus importants ont été observés sur le caoutchouc, suivi du polypropylène, du verre et l'acier inoxydable **(Jeon, et al., 2018)**.

IV.7.1. Déterminants de la formation de biofilm chez *L. monocytogenes*

Plusieurs structures et composantes sont supposées être impliquées dans les mécanismes de la formation des biofilms tel que les flagelles, les EPS, l'ADN extra cellulaire et les protéines de surfaces. Des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour préciser leur rôle potentiel dans le processus d'adhésion et la formation des biofilms **(Desvaux et al. 2006; Desvaux and Hebraud 2006; Desvaux and Hébraud 2008)**.

a. Flagelles

Les flagelles jouent un rôle très important dans les premières étapes de la formation des biofilms chez plusieurs espèces bactériennes. Chez *L. monocytogenes*, les premières études réalisées sur les flagelles, en tant que structures potentiellement impliquées dans la formation de biofilms, ont montré que leur absence affectait l'adhésion initiale. Cependant, aucune différence quantitative n'était constatée au bout de 24 heures de formation de biofilm **(Vatanyoopaisarn et al., 2000)**. Plusieurs études ont été réalisées en utilisant des mutants et en faisant varier plusieurs paramètres afin de déterminer le degré d'implication des flagelles dans la formation des biofilms. Ces études ont démontré que les flagelles permettent l'amélioration de l'adhésion initiale chez *L. monocytogenes* par la mobilité qu'il procure à la fois en condition

Partie bibliographique

statique que dynamique, ces flagelles ne sont pas nécessaire à l'adhésion, ni à la formation de biofilms (Tresse *et al.*, 2006; Gueriri *et al.* 2008; Tresse *et al.*, 2009).

b. Déterminants de la communication cellulaire

Plusieurs travaux de recherches ont été réalisés pour essayer de comprendre les mécanismes de communication inter cellulaire lors de formation des biofilms par *L.monocytogenes* et leur impact sur le développement et le maintien de la structure du biofilm. Les régulations mises en place au cours du développement sessile sont complexes et sans doute transitoires. Ces systèmes de signalisation sont très certainement impliqués dans des régulations physiologiques avec des conséquences indirectes sur la formation de biofilm, mais la mise en évidence de la présence d'un système de QS (quorum sensing) reste encore à démontrer chez *L. monocytogenes* (Garmyn *et al.*, 2009).

c. Matrice extracellulaire

C'est un mélange complexe d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire (ADNe), de protéines, et d'autres polymères extracellulaires.

Dans de nombreux biofilms bactériens, les exopolysaccharides sont décrits comme les principaux composants de la matrice extracellulaire (Vu *et al.*, 2009), leur présence systématique et leur contribution dans la formation de biofilm chez *L. monocytogenes* restent quelque peu controversés. A la place d'une matrice extracellulaire épaisse et collante, la présence de fibres reliant les cellules individuelles entre elles a été observée chez *L. monocytogenes* (Borucki *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2003; Hefford *et al.*, 2005; Zameer *et al.*, 2010).

Concernant l'ADN extracellulaire, il a été récemment montré qu'il jouait un rôle important dans les premières phases de formation de biofilm chez *L. monocytogenes* (Harmsen *et al.*, 2010).

Des études ont également montré que des protéines de surface et des protéines extracellulaires jouaient un rôle essentiel dans l'adhésion initiale de la bactérie à une surface (Longhi *et al.*, 2008).

Des investigations supplémentaires méritent d'être faites afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués par chaque structure précédemment citée dans la formation des biofilms à *L. monocytogenes*.

V. Contamination des surfaces par les bactéries

Les surfaces constituent un support pouvant recevoir et héberger à la fois des salissures et des micro-organismes. Dans des conditions favorables (température et hygrométrie des locaux, nature et fréquence des opérations de décontamination...), les cellules microbiennes ayant adhéré peuvent se multiplier sur la surface et former un biofilm (**Cappitelli et al, 2014**).

Les surfaces peuvent favoriser la persistance de flores microbiennes indésirables, en particulier la flore résistante à l'action d'agents antimicrobiens. Elles peuvent également se comporter comme émetteurs de micro-organismes (**Bonsaglia, 2014**).

Dans les zones à environnement maîtrisé, le concept de bio nettoyage combine un nettoyage des surfaces, une évacuation des produits utilisés et des salissures à éliminer et l'application d'un désinfectant (**Fabien, 2017**).

V.1. Intérêt des opérations de nettoyage et désinfection

Les opérations de nettoyage et de désinfection ont pour objectif d'éliminer les salissures (déchets des produits traités ou salissures apportées par les outils ou machines employées dans le procédé industriel) ainsi que les contaminations d'origine microbiologique et chimique. Ces dernières peuvent, par exemple, provenir des détergents ou des désinfectants eux-mêmes utilisés dans le processus d'élimination de la contamination microbiologique, d'où l'importance donnée aux rinçages. Parmi les autres contaminations potentielles, peuvent également être cités les déchets provenant de la maintenance des machines (graisses, huiles, etc.) (**Belco et al., 2017**).

Le nettoyage consiste en l'élimination des contaminations au moyen d'un détergent. La désinfection est une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Les résultats de ces deux opérations ne sont pas exclusifs les uns des autres : en effet, si l'opération de nettoyage permet d'éliminer un certain nombre de déchets, elle va aussi permettre de réaliser un certain niveau d'élimination de micro-organismes. Cette élimination pourra ensuite être complétée si nécessaire par une opération de désinfection proprement dite mettant en œuvre un produit spécifique. Couramment un détergent (alcalin par exemple) sera utilisé simultanément avec un désinfectant (chlore et dérivé) sous la forme d'alcalin chloré.

Certaines formulations comprennent même un ammonium quaternaire ou un autre produit pour augmenter le pouvoir désinfectant en une seule opération de nettoyage/désinfection.

Les opérations de nettoyage et désinfection se déroulent en plusieurs étapes successives :

- Rangement de l'atelier et la protection des appareils fragiles.
- Pré-nettoyage pour éliminer les plus gros résidus alimentaires faiblement accrochés aux

surfaces.

- Nettoyage dont l'objectif est d'éliminer les souillures difficiles à décrocher.
- Rinçage intermédiaire visant à évacuer les souillures décrochées par les produits détergents.
- Désinfection dans le but d'éliminer les micro-organismes.
- Rinçage final pour enlever les produits désinfectants (étape obligatoire pour les surfaces en contact avec les produits alimentaires).
- Séchage (**Jaudon et al., 2000 ; Beauclair et al., 2011**).

V.2. Nettoyage et désinfection en industrie agroalimentaire

Le nettoyage et la désinfection ne sont pas des opérations à réaliser en marge de toutes les autres interventions ; un soin et une attention particulière doivent leur être apportés. L'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection repose sur le choix de la méthode utilisée, le choix du produit (qui doit être adapté à la souillure et à la surface) et surtout l'identification de la nature des salissures afin de pouvoir les éliminer. Combiner entre deux méthodes ou deux produits est fréquent afin d'améliorer l'efficacité de l'opération de nettoyage et désinfection évitant ainsi les risques de contamination transversale qui mène à la diminution de la durée de conservation et la détérioration de l'aliment ou tout simplement à sa contamination causée par la persistance des bactéries sur les surfaces, leur adhésion et la formation des biofilms (**Allison et Gilbert, 1992; Mattila et Wirtanen, 1992 ; Carpentier et Cerf, 1993; Jaudon et al., 2000 ; Sharma et Anand, 2002; Stepanovic et al., 2003**).

V.2.1. Nettoyage

Le nettoyage est l'action qui consiste à retirer totalement les résidus et souillures des surfaces, les laissant visuellement propres et aptes à être désinfectées efficacement. Il permet à la fois d'éliminer des salissures organiques (graisses, sang, sucre, amidon, protéines dont allergènes...) et inorganiques (sels minéraux, rouille, résidus de carbonisation). Il permet également d'éliminer des corps étrangers.

L'efficacité du nettoyage est conditionnée par quatre facteurs principaux : (1) l'action chimique, (2) l'action mécanique, (3) la température, et (4) le temps de contact, qui forment ensemble le cercle de Sinner. Ce dernier a décrit un processus économiquement idéal de nettoyage utilisant les interactions optimales entre ces facteurs de base. La réduction de l'un des facteurs doit être compensée en renforçant les autres facteurs (**Codex alimentarius, 2003 ; Wirtanen et Salo, 2003**).

a) Température

L'utilisation de détergents et de chaleur permettent la diminution des forces de cohésion souillures-supports et rendent plus aisé l'arrachement des souillures quand elles sont soumises à un cisaillement généré par l'écoulement du fluide sur les surfaces ou dans les équipements fermés (**Bénézech *et al.*, 2002**).

L'efficacité d'un détergent est étroitement liée au respect de la température recommandée de l'eau. D'autre part, la nature de la souillure ou de la surface jouent un rôle très important dans la sélection de la température à utiliser. Par exemple, à basse température, une protéine a tendance à se gélifier avec le détergent, rendant son élimination encore plus difficile. En effet, plus la température est élevée, plus les réactions sont rapides mais elles peuvent s'accompagner de réactions indésirables entre le détergent et les matériaux des équipements nettoyés.

Aussi, l'utilisation des produits à la bonne température intervient dans la réduction du coût de l'opération de nettoyage car la réduction du temps de nettoyage et désinfection est aussi à considérer. A titre d'exemple, les faibles températures permettent de préserver les équipements mais rendent les opérations de nettoyage trop longues et donc économiquement inintéressantes (**Perlat *et al.*, 1986 ; Mafu *et al.*, 1990 ; Guilbert *et al.*, 1994**).

b) Action mécanique

Elle consiste en l'utilisation d'ustensiles spécifiques (brosses, racleuse, lavette etc.) dans le but de faciliter le décrochage des souillures et les remettre en suspension rendant ainsi plus facile l'opération de nettoyage. Quand il s'agit d'un nettoyage en circuit fermé, on parle plutôt d'effet de la turbulence et du débit. Plus le débit est élevé, plus le temps de nettoyage pour la même efficacité est court (le coût énergétique et le coût d'investissement dans des équipements de pompage doit alors être pris en compte) (**Jensen *et al.*, 2007 ; Blel *et al.*, 2008**).

c) Action chimique

Le choix du détergent est guidé par la nature des dépôts à éliminer. Le pouvoir saponifiant des détergents alcalins permet d'éliminer les dépôts organiques contenant des lipides, alors que les dépôts minéraux pourront être dissous par des agents acides. La soude est le principal composant des détergents alcalins. Elle détruit de nombreuses souillures organiques par saponification et facilite leur solubilisation. Les principaux détergents acides sont à base d'acide phosphorique et nitrique agissant sur la fraction minérale par dissolution mais reconnu également comme ayant une action sur la fraction organique des souillures. (**Corrieu, 1986 ; Vincent, 1999**)

Partie bibliographique

Les produits détergents sont des composés de nature complexe, en plus du principe actif principal, d'autres molécules sont souvent rajoutées dans la formulation des produits afin d'augmenter leur efficacité. Nous citerons comme exemples :

- L'utilisation des tensio-actifs pour baisser la tension superficielle de certains produits comme la soude lui permettant un contact plus facile avec les surfaces à nettoyer ou pour supprimer les forces d'adhésion qui retiennent les souillures aux surfaces.
- L'utilisation de dispersant pour disperser les flocons de savons générés suite à la saponification de la matière grasse, facilitant ainsi leur élimination.
- L'utilisation de séquestrant pour limiter les dépôts de matière minérale évitant ainsi la formation de tartre sur les surfaces.

La structure des souillures est souvent complexe, mixant protéines, matières grasses, minéraux et microorganismes. L'utilisation de ces deux types de détergents (alcalin et acide) à la suite l'un de l'autre dans les protocoles de nettoyage des circuits fermés, ou en alternance dans les protocoles de nettoyage des surfaces ouvertes s'avère nécessaire.

La méthode et le produit à employer dépendent de la nature de la souillure et de la fragilité de la surface à traiter (**Massicotte, 2009 ; Jaudon et al., 2000**).

d) Temps de contact

Le respect du temps de contact préconisé lors de l'utilisation d'un détergent est très important pour que ce derniers soit efficace.

Lorsqu'un détergent est appliqué sur une surface, il est nécessaire de lui donner le temps de réagir avec les salissures afin de pouvoir les déloger (**Massicotte, 2009**).

V.2.2.Agents de nettoyage

V.2. 2.1.Agents de nettoyage alcalins

Le produit de nettoyage alcalin est utilisé pour l'élimination des souillures organiques (glucides, protéines, matières grasse etc.). Les molécules actives se retrouvent souvent combinées à d'autres produits afin de les rendre plus efficaces, moins corrosifs ou plus faciles à manipuler (**Khamisse, 2013**). Il existe quatre classes d'agents alcalins (**Dupuis et al., 2003**).

a) Alcalins forts

Représentés en général par la soude caustique (NaOH) et la potasse caustique (KOH). Ils sont considérés comme étant très alcalins (pH 12-14). Ils ont une action très puissante sur les résidus organiques, mais il faut limiter leur utilisation sur les métaux mous et le caoutchouc, car ils sont corrosifs (**Bird et Fryer ,1991 ; Dupuis et al., 2003**).

b) Alcalins moyens

Cette classe contient principalement les phosphates. Ils ont une alcalinité modérée (pH 9,5-11,5) et présentent plus de détergence que les autres adjuvants. Ils offrent une certaine protection aux métaux mous et immobilisent les ions de l'eau dure, les empêchant ainsi d'entraver le processus de nettoyage ; mais leur utilisation est de plus en plus limitée à cause de leurs effets néfastes sur l'environnement (**Grasshoff, 1989 ; Dupuis *et al.*, 2003**).

c) Alcalins doux

Comme alcalins doux, on retrouve principalement les carbonates. Ils sont légèrement alcalins (pH 9-9,5) et sont principalement utilisés pour neutraliser les contaminants acides. Ils ne présentent généralement pas de risque pour les métaux mous et offrent une alcalinité de réserve aux autres adjuvants de la composition. On utilise les alcalins doux pour le nettoyage d'équipements en aluminium ou tout autre métal mou et pour le nettoyage manuel demandant un brossage (**Vincent, 1999 ; Dupuis *et al.*, 2003**).

d) Alcalins chlorés

Ils sont souvent utilisés car l'ajout du chlore confère au produit l'avantage d'oxyder la matière organique. L'inconvénient majeur de ces produits est qu'ils risquent de corroder avec le temps les équipements en attaquant la couche de passivation, surtout si on ne respecte pas les concentrations. Aussi, la stabilité du produit dépend en général de la qualité de la formulation et des conditions de stockage (**Dupuis *et al.*, 2003 ; Laithier *et al.*, 2005**).

V.2.2.2. Agents de nettoyage acides

Les produits de nettoyage acides ont pour but d'éliminer les résidus minéraux en causant leur dissolution dans la solution de lavage et leur élimination lors du rinçage. Ces résidus peuvent provenir des aliments, de l'eau (dureté de l'eau) ou bien des réactions chimiques entre les détergents et la matière organique. Ces produits peuvent être classés en acides minéraux et acides organiques.

a) Acides minéraux

Représentés par l'acide phosphorique, l'acide nitrique et sulfamique. Ces molécules sont les plus utilisées dans les opérations de détartrage. Des produits contenant de l'acide nitrique combiné à l'acide phosphorique peuvent aussi être utilisés. L'acide phosphorique a l'avantage d'être plus détartrant que l'acide nitrique. Il est aussi moins corrosif et repassivant pour l'inox (**Belloin, 1993**).

b)Acides organiques

Les acides citrique, gluconique, lactique et hydroxyacétique sont les plus utilisés. Ils sont moins dangereux et moins corrosifs avec une tension superficielle basse leur conférant une meilleure mouillabilité et par conséquent une meilleure élimination des résidus. Ils ont aussi un pouvoir séquestrant vis-à-vis certains minéraux (**Belloin, 1993 ; Vincent, 1999**).

V.2. 2.3. Détergents enzymatiques :

Ils sont utilisés pour éliminer des souillures organiques lorsque les produits détergents classiques se révèlent trop agressifs. Ce sont des produits souvent chers et très sensibles à la chaleur et au pH. Leur utilisation est d'un grand intérêt pour l'élimination des biofilms. En effet, en raison de l'hétérogénéité de l'exopolysaccharide, un mélange des enzymes (protéases et enzymes d'hydrolyse des polysaccharides) peut être nécessaire pour une meilleure dégradation du biofilm (**Simoës *et al.*, 2010**). Plusieurs chercheurs ont confirmé leur efficacité en les combinant avec d'autres molécules telles que les tensio-actives (**Jacquelin *et al.*, 1994 ; Meyer, 2003 ; Oulahal-Lagsir *et al.*, 2003 ; Parkar *et al.*, 2004**).

V.2.3. Désinfection

V.2.3.1. Définition

La désinfection est la réduction au moyen d'agents chimiques ou de méthodes physiques du nombre de microorganismes présents dans l'environnement jusqu'à l'obtention d'un niveau ne risquant pas de compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments (**AFNOR, 1999**).

L'efficacité d'un désinfectant dépend de son spectre d'action, du temps de contact nécessaire pour la réduction du nombre des microorganismes et aussi de la bonne utilisation de ce dernier en veillant à :

- Respecter la température et la concentration préconisées.
- Vérifier la possibilité de son utilisation en présence de matière organique ou d'eau dure.
- Sélectionner la matière active en fonction de la nature du nettoyage (surface ou circuits fermés) et de la nature du support à désinfecter.

Il ne faut pas non plus négliger l'impact sécuritaire, environnemental et économique dans le choix des désinfectants à utiliser (**Sequiera *et al.*, 1988; Larson et Morton, 1991; Black, 1993; Troller, 1993; Wirtanen, 1995 ; Wirtanen *et al.*, 2002 ; Vloková *et al.*, 2008**).

V.2.3.2 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants

L'efficacité d'un désinfectant ne repose pas uniquement sur le choix de la molécule active. Le respect des conditions d'utilisation est primordial pour obtenir le résultat espéré de la désinfection.

a) Concentration et temps de contact

Pour un désinfectant, le temps de contact se définit comme étant la durée nécessaire à la réduction du nombre des microorganismes selon sa concentration et son spectre d'action. L'élimination des microorganismes est étroitement liée à la concentration du désinfectant utilisé pendant un temps de contact bien déterminé (en fonction du pH du milieu et de la présence ou non de matière interférente). En général, une augmentation de la concentration en désinfectant diminue le temps de contact nécessaire pour obtenir la même réduction logarithmique en microorganismes et réciproquement (Salvat et Colin, 1995).

b) Type de microorganisme

Le choix du désinfectant se fait en fonction du spectre d'activité visé. Ce dernier peut changer en fonction du milieu dans lequel le principe actif est utilisé (acide, basique ou neutre). Certains microorganismes sont naturellement résistants à certaines molécules actives (Cloete *et al.*, 1998).

c) Présence de substances interférentes

Les molécules désinfectantes sont des composés chimiques qui peuvent réagir avec les molécules organiques ou minérales présentes dans le milieu dans lequel elles sont appliquées, causant ainsi une diminution de leur pouvoir désinfectant (cas des produits oxydants). Par ailleurs, cette réaction avec la matière organique peut au contraire, représenter un avantage pour certains principes actifs (cas des ammoniums quaternaires) qui leur donne la possibilité d'être utilisés en combinaison avec un détergent afin de réduire le temps consacré aux opérations de nettoyage et désinfection sans pour autant diminuer de leur efficacité (Kuda, 2008).

d) Température

Certains produits perdent de leur efficacité à haute température tels que les produits chlorés ou l'acide peracétique. D'autres sont inefficaces à basse température tels que le glutaraldéhyde et les composés d'ammonium quaternaire (à une température de 4°C ou moins). Le passage d'une température de l'eau basse (de 4 à 20°C) à une température plus élevée (de 37 à 50°C) peut réduire de 5 à 60 fois la concentration nécessaire du produit utilisé pour désinfecter une surface d'acier inoxydable (Kahrs, 1995).

V. 2.3.3. Types de désinfectants et mécanismes d'action généraux

Les désinfectants constituent le groupe 1 des 04 groupes des biocides. Ces derniers sont définis comme étant toute substance ou tout 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

Partie bibliographique

autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique (**Règlement européen relatif aux produits biocides n° 528/2012**).

Chaque groupe de biocides classe les produits selon leurs usages. Le groupe des désinfectants contient les types de produits ci-dessous (**Règlement européen relatif aux produits biocides n° 528/2012**):

- Type de produit 1: destinés à l'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.
- Type de produits 2: Désinfectants et produits algicides non destinés à l'application directe sur des êtres humains ou des animaux. 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. 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. Produits utilisés comme produits algicides pour le traitement des piscines, des aquariums et des autres eaux, ainsi que pour le traitement curatif des matériaux de construction. 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.
- Type de produits 3: Hygiène vétérinaire. Produits utilisés pour l'hygiène vétérinaire, tels que désinfectants, savons désinfectants, produits d'hygiène buccale ou corporelle ou ayant une fonction antimicrobienne. Produits utilisés pour désinfecter les matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux.
- Type de produits 4: Surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. 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. Produits utilisés pour être incorporés dans des matériaux susceptibles d'entrer en contact avec des denrées alimentaires.

Partie bibliographique

- Type de produits 5: Eau potable. Produits utilisés pour désinfecter l'eau potable destinée aux hommes et aux animaux (**Directive n° 98/8/CE ; Règlement (UE) N° 528/2012**).

Afin de réaliser une formulation d'un désinfectant efficace, la compréhension des mécanismes d'action des différents principes actifs est primordiale.

Le mode d'action des désinfectants est plus ou moins bien compris selon les molécules.

Fleurette *et al.* (1997) proposent un mode d'action en cinq étapes :

- 1/ Adsorption à la surface de la cellule suivie de la pénétration dans la paroi (Gram positif) ou membrane externe (Gram négatif) ;
- 2/ Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique, qui est le site d'action primaire, conduisant à sa désorganisation ;
- 3/ Sortie des composants de faibles poids moléculaires du cytoplasme ;
- 4/ Dégradation des protéines et des acides nucléiques ;
- 5/ Lyse de la paroi causée par les enzymes autolytiques ;

Les sites d'action des molécules désinfectantes sont représentées dans la figure N°3 (**Rossmore, 1995 ; Denyer and Stewart 1998 ; Wirtanen *et al.*, 2000 ; Maillard 2002 ; Dosti *et al.*, 2005 ; Bremer *et al.*., 2006 ; Simoes *et al.*, 2006**).

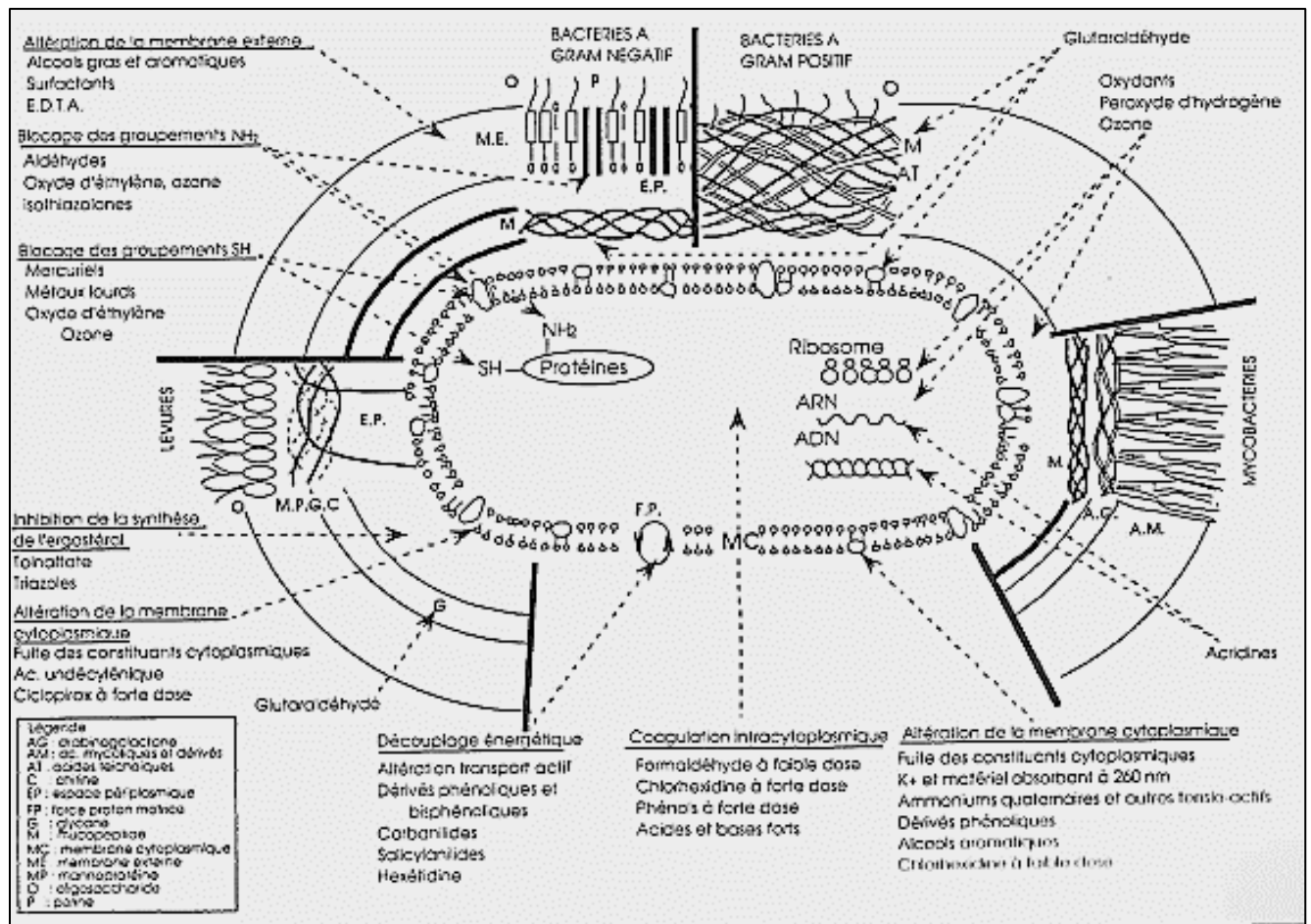


Figure N° 3 : Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les microorganismes (Crémieux et Freney, 1995).

Nous avons sélectionné quelques familles des principes actifs couramment utilisés en industrie agroalimentaire : les halogènes et dérivés, les aldéhydes, les alcools, les oxydants, les amphotères et les ammoniums quaternaires.

a) Halogènes et dérivés

Le fluor, le chlore, le brome, l'iode et l'astate, élément radioactif plus récemment découvert, composent la famille des éléments connus sous le nom d'halogènes.

Les produits chlorés sont les plus utilisés en industrie alimentaire. Parmi eux, nous pouvons citer : les hypochlorites alcalins (le plus populaire est certainement l'eau de javel ou hypochlorite de sodium), les phosphates trisodiques chlorés, les acides chlorocyanuriques et les chlorocyanurates.

On définit une eau de Javel par son degré chlorométrique. C'est le nombre de litres de chlore gazeux, mesurés à 0 °C et 760 mm de mercure, nécessaires pour fabriquer un litre d'eau de Javel suivant la réaction théorique : $2 \text{ Na OH} + 2 \text{ Cl} \rightarrow \text{Na O Cl} + \text{Na Cl} + \text{H}_2\text{O}$

Partie bibliographique

Le produit commercial change de nom en fonction de la dilution et on parlera : d'extrait de javel pour un produit titrant 40 °C chlorométriques minimum, d'eau de Javel si la concentration est comprise entre 12° et 35° chlorométriques et d'eau de Labarraque pour un produit titrant 2° chlorométriques.

Il possède une puissante activité désodorisante, blanchissante ainsi qu'un large spectre d'activité sur les microorganismes.

Mode d'action : il pénètre facilement à travers les parois ou les membranes des microorganismes. Grace à son pouvoir oxydant, il entraîne une dénaturation des protéines provoquant la mort cellulaire suite à l'arrêt des réactions du métabolisme.

Avantages : ils présentent plusieurs avantages

- Activité antimicrobienne rapide.
- Pas de résidus, bon Rinçage.
- Agit à basse température.
- Non influencé par la dureté de l'eau.
- Non moussant.
- Économique.

Inconvénients : les produits chlorés sont

- Corrosifs pour l'inox et les autres métaux : potentiel oxydant fort.
- Efficacité varie en fonction du pH.
- Sensibles à la lumière.
- Instabilité à des températures hautes (60°), aux UV, à la présence de minéraux et de matières organiques.
- Irritants pour la peau.
- Présentent une toxicité respiratoire (**Trueman, 1971 ; McDonnell and Russell 1999; Beumer, Bloomfield et al. 2000 ; Stellman, 2000 ; Massicotte, 2009**).

b)Aldéhydes

Les aldéhydes appartiennent à la classe des composés chimiques organiques symbolisés par la formule générale $R-CHO$, où R représente soit un atome d'hydrogène, soit un radical hydrocarboné. Les principales réactions des aldéhydes sont l'oxydation (avec formation d'acides carboxyliques), la réduction (avec formation d'alcool), la condensation en aldol ou aldolisation (lorsque deux molécules d'un aldéhyde réagissent en présence d'un catalyseur pour donner un hydroxyaldéhyde), et la réaction de Cannizzaro (avec formation d'un alcool et du sel de sodium d'un acide). Les acétals sont des diesters des hydrates d'aldéhydes ou de cétones. Ils sont obtenus par réaction d'un aldéhyde sur un alcool.

Partie bibliographique

Les principaux produits désinfectants qui font partie de cette catégorie sont : le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et l'aldéhyde succinique.

Mode d'action : ils provoquent une dénaturation des acides nucléiques et des protéines des micro-organismes.

Avantages :

- Produits à large spectre.
- Faciles à rincer.
- Principe actif majeur pour la désinfection terminale des surfaces, par voie aérienne.
- Produit peu corrosif.

Inconvénients :

- Gaz incolore, à odeur irritante et lacrymogène.
- Allergène.
- Classé à risque (**Stellman, 2000 ; Massicotte, 2009 ; Khamisse, 2013**).

c) Alcools

Les alcools constituent une classe de composés organiques formés à partir des hydrocarbures en substituant un ou plusieurs atomes d'hydrogène par nombre égal de groupements hydroxydes; le terme s'étend aussi à un certain nombre de produits de substitution à réaction neutre et porteurs d'une ou de plusieurs fonctions alcool.

Parmi les alcools les plus utilisés, on trouve l'éthanol et l'isopropanol.

Mode d'action : ils agissent par dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

Avantages :

- Temps de contact court.
- Peuvent être utilisés en association avec d'autres principes actifs pour la formulation des désinfectants par voie aérienne. Ils sont aussi utilisés dans la formulation des solutions hydro-alcooliques pour la désinfection des mains.

Inconvénients :

- Stabilité moyenne.
- Inefficacité contre les spores.
- Inefficacité en présence de matières organiques (**Stellman, 2000 ; CAPP-INFO, 2007 ; Massicotte, 2009**).

d)Oxydants

Par agents oxydants, on entend essentiellement : le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H_2O_2), le perborate de sodium et le permanganate de potassium.

Les désinfectants à base de peroxyde d'hydrogène sont très appréciés en industries alimentaires car les résidus ne sont pas toxiques (décomposition en eau et en oxygène). C'est pour cette raison qu'ils sont utilisés pour stériliser les emballages avant soutirage aseptique. A cet effet, on travaille à des concentrations importantes et à une température élevée pour réaliser une désinfection complète dans le temps court imparti (quelques secondes). Les désinfectants à base de peroxydes conviennent également à la désinfection à froid, à basse concentration.

Toutefois, le temps d'action sera long, le peroxyde d'hydrogène libérant son oxygène lentement.

Mode d'action : L'action microbicide du peroxyde d'hydrogène est basée sur son pouvoir oxydant qui détruit de façon irréversible les systèmes actifs des microorganismes. Ils produisent des radicaux libres qui interagissent avec les lipides, les protéines et l'ADN.

Avantages :

- Produits à large spectre.
- Non moussants.
- Bonne rinçabilité.

Inconvénients :

- Instables à la lumière et à des températures de 40°C.
- Corrosifs sur alliages fragiles.
- Sensibles à la matière organique.
- Irritants (Stellman, 2000 ; CAPP-INFO, 2007 ; Massicotte, 2009 ; Khamisse, 2013).

e)Amphotères

Représentés par les chlorhydrates d' amino-acides, les polyalkylamine et les alkylamine (par exemple, la N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1-3-diamine).

Leur pouvoir désinfectant augmente avec le nombre de groupements basiques.

Mode d'action : Les cellules incorporent les amphotères en lieu et place des acides aminés habituels, ce qui provoque des perturbations dans les structures cellulaires.

Avantages

- Peu sensibles aux souillures organiques (possibilité de les utiliser en association avec des détergents acides ou alcalins).
- Bon pouvoir mouillant.
- Peu toxiques.

Partie bibliographique

- Non corrosif.
- Activité accrue avec la température.
- Ne colorent pas les matériaux et n'ont pas d'odeur.
- Spectre bactéricide et fongicide.
- Activité rémanente.
- Biodégradables.

Inconvénients

- Moussants (difficilement rinçables).
- Action lente.
- Prix de revient élevé (en prenant en considération le coût généré par les multiples opérations de rinçages en matière de consommation d'eau, d'énergie et de temps) (Stellman, 2000 ; CAPP-INFO, 2007).

f) Ammoniums quaternaires

Ce sont des substances de type chlorure de lauryl-diméthyl-benzyl ammonium ou chlorure de benzalkonium.

L'efficacité de ce type de substances actives résulte de l'association de l'abaissement de la tension superficielle (ce sont des tensio-actifs cationiques) et de la polarité de la molécule.

Mode d'action : Les ammoniums quaternaires agissent par inactivation des enzymes et dénaturation des protéines cellulaires. L'adsorption des ammoniums quaternaires à la surface des cellules perturbe la perméabilité de la paroi ; les substances contenues dans la cellule se retrouvent dans le milieu extérieur, entraînant la destruction de celle-ci. Ils procèdent aussi par inhibition des protéines enzymatiques, dénaturation des lipoprotéines et déstructuration des protéines.

Avantages :

- Bon pouvoir mouillant.
- Très grande stabilité.
- Non corrosif.
- Efficace contre bactéries Gram +, levures et moisissures.
- Peut être utilisé en milieu acide, neutre ou alcalin.
- Peu toxique.

Inconvénients

- Difficilement rinçables.
- Contrôle obligatoire du rinçage.
- Moussant.

- Spectre bactéricide sélectif (Gram +, levures, moisissures).
- Seules certaines molécules sont autorisées en laiterie (**McDonnell and Russell, 1999; Stelman, 2000 ; Massicotte, 2009 ; Khamisse ,2013**).

V.3. Protocoles de nettoyage et désinfection

Les protocoles de nettoyage et désinfection diffèrent d'une industrie à une autre. Ils dépendent notamment de la nature des produits fabriqués, la nature des surfaces à nettoyer (surfaces ouvertes ou circuits fermés) et aussi des produits utilisés (détergent, détergent/désinfectant et désinfectant).

Le protocole de nettoyage des surfaces ouvertes se déroule en général en quatre étapes :

- Rinçage ;
- Nettoyage (alcalin ou acide à une concentration de 1 à 3%) ;
- Rinçage ;
- Désinfection (la concentration varie selon le principe actif et selon le spectre visé, en général, une concentration de 1% est utilisée);
- Rinçage final.

Afin d'optimiser le temps de l'opération de nettoyage et désinfection, des produits de type détergent/désinfectant peuvent être utilisés.

La fréquence d'alternance entre le détergent alcalin et le détergent acide est déterminée en fonction des produits fabriqués donc en fonction de la nature des souillures à éliminer. En général, un nettoyage acide (en utilisant plutôt l'acide phosphorique) est réalisé après trois nettoyages alcalins. L'utilisation de produits neutres peut aussi se faire quand les matériaux sont en alliage fragile ou si le nettoyage est réalisé manuellement.

Ils sont également largement utilisés pour nettoyer et désinfecter les circuits fermés, pour les procédures de nettoyage en place (NEP). Ces procédures sont réalisées sans démonter ou ouvrir les équipements et avec peu ou pas de participation manuelle (**Romney, 1990 ; Bremer et al., 2006**).

Le protocole de nettoyage des circuits fermés standard se déroule en sept étapes :

- Rinçage.
- Nettoyage alcalin en utilisant une soude additive à 2 % à une température de 75 - 80°C pendant 15 à 20 minutes.
- Rinçage.
- Nettoyage acide (la concentration appropriée de l'acide est généralement de 1%) pendant 15 à 20 minutes à une température de 60°C.

Partie bibliographique

- Rinçage.
- Désinfection à l'amine ou l'acide peracétique par exemple, à une concentration de 0,5 à 1% pendant 15 minutes.
- Rinçage final pendant 15 à 20 minutes.

Afin de réduire le temps de l'opération de nettoyage et désinfection, l'utilisation de désinfectant en phase acide ou en phase alcaline peut se faire à condition que le principe actif antimicrobien utilisé reste efficace en présence de matière interférente et en étant mélangé au détergent alcalin ou acide. Le protocole passe ainsi de 7 étapes à 5 étapes ce qui représente un gain de temps et d'énergie. L'application de protocole à 3 étapes est aussi possible, une alternance entre le nettoyage alcalin et acide peut être réalisée en fonction de la nature du produit fabriqué (**Bylund, 1995; Stewart et Seiberling, 1996 ; Changani *et al.*, 1997; Tamine et Robinson 1999; Jaudon *et al.*, 2000 ; Lelievre *et al.*, 2001, Lelievre *et al.*, 2002 ; Boulange-Petermann *et al.*, 2004**).

VI. Résistances bactériennes aux désinfectants

Il est nécessaire de définir deux termes dont l'emploi fait souvent débat : « résistance » et «tolérance ». Selon Harrison, la résistance est la capacité d'un microorganisme à poursuivre sa croissance en présence d'un biocide (**Harrison *et al.*, 2007**). La résistance doit être distinguée de la tolérance qui correspond à la capacité du microorganisme à survivre. Ainsi, des cellules tolérantes à un biocide ne présentent pas de croissance en présence du composé, mais ne meurent pas non plus (**Keren *et al.*, 2004**). D'autres termes peuvent aussi être employés comme la pseudo-résistance qui est une résistance liée à une mauvaise utilisation en pratique du désinfectant (**Heinzel, 1998**), l'adaptation, qui fait référence à une résistance entraînée par les conditions du biotope (**Anonyme, 2007**) et sensibilité moindre, ce terme est fréquemment retrouvé dans les études portant sur la sensibilité des bactéries aux désinfectants (**McDonnell and Russell 1999; Beumer, Bloomfield *et al.* 2000; Langsrud, Singh Sidhu *et al.* 2003**).

La résistance peut être définie comme la capacité temporaire ou permanente d'un microorganisme et de sa descendance à rester viables et/ou à se multiplier dans des conditions qui pourraient détruire ou inhiber d'autres souches de la même espèce (**Cloete, 2003**). Cette définition est liée à la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) nécessaire pour obtenir un effet visible sur la population bactérienne (**Gilbert et McBain, 2003**).

L'étude de la sensibilité des bactéries aux biocides suggère que cette sensibilité diffère naturellement d'un microorganisme à un autre. Certains organismes sont intrinsèquement

résistants (propriété commune à toutes les souches du genre ou de l'espèce). Alternativement, des modifications de la sensibilité des bactéries aux biocides peuvent survenir. L'origine de ces modifications peut être soit les conditions dans lesquelles ils ont été cultivés, soit une mutation, ou l'acquisition d'éléments génétiques qui codent pour des mécanismes de résistance (**Beumer et al., 2000**).

VI.1. Propriétés intrinsèques des bactéries conférant une sensibilité réduite aux biocides

Les biocides interagissent avec les microorganismes initialement à la surface de la cellule. La susceptibilité intrinsèque est donc significativement influencée par la composition de la paroi et de la surface cellulaire, qui déterminent cette interaction et absorption par la cellule.

Les bactéries à Gram négatif sont généralement relativement moins sensibles aux biocides que les bactéries à Gram positif car leurs parois cellulaires constituent une barrière plus importante à l'entrée. La membrane externe des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière de perméabilité car les canaux poreux étroits limitent la pénétration de molécules hydrophobes et la faible fluidité des LPS ralentit la pénétration et la diffusion des composés lipophiles. Cela explique aussi l'extrême insensibilité des mycobactéries (présence de paroi épaisse riche en lipides) et des spores (présence de cortex et tuniques) aux désinfectants (**Russell 1996 ; Sidhu et al., 2002**).

Des études récentes ont montré que les pompes à efflux, avec parfois une spécificité exceptionnellement large (molécules principalement lipophiles ou amphiphiles), contribuent également à la résistance intrinsèque des bactéries Gram négatives en pompant divers agents, notamment des colorants, des détergents et des antibiotiques. Ces pompes sont situées dans la membrane plasmique, fonctionnent avec l'énergie protomotrice et appartiennent soit à la grande famille des protéines de transport soit à la famille des protéines de multirésistance (*mdr*) (**Heir, Sundheim et al., 1995; Sudheim, et al., 1998; Heir et al., 1999**). Un grand nombre de gènes codant pour ces pompes a été identifié à la fois chez des bactéries à gram positif (*qacA*, *qacB*, *smr*, *qacG*, *qacH*) et à gram négatif (*emrE*, *qacE* et *qacEΔ1*) (**Chapman, 2003**). Toutes ces pompes sont capables d'excréter activement les ammoniums quaternaires, ce qui conduit à une résistance plus ou moins élevée en fonction du type de pompe et de l'espèce bactérienne. Les gènes *qacE* et *qacEΔ1* ont été détectés sur des intégrons de bactéries à gram négatif. Ces éléments génétiques mobiles sont susceptibles d'être échangés entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes.

En plus d'une absorption réduite ou d'un efflux accru, certains microorganismes présentent des résistances intrinsèques par inactivation de biocides. Des exemples d'inactivation de chlorure de didécyltriméthylammonium par une souche de *Pseudomonas fluorescens* ont été

Partie bibliographique

décrits par **Nishihara *et al.* (2000)**. D'autres travaux de recherches évoquent des processus d'inactivation de composés d'ammonium quaternaire, chlorhexidine et le phényléthanol, mais uniquement à des concentrations inférieures à celles utilisées en pratique. Il est donc peu probable qu'il s'agisse d'un mécanisme de résistance à ces composés (**Russell *et al.* 1999**).

Une réduction de la sensibilité aux biocides peut aussi résulter de changements phénotypiques. La sensibilité intrinsèque d'un organisme à un biocide déterminée à partir du calcul des CMI et CMB est tributaire de la stabilité phénotypique. Or, le phénotype cellulaire exprimé peut varier considérablement en fonction des conditions environnementales dans lesquelles il est cultivé. Des adaptations physiologiques du phénotype des micro-organismes réduisant leur sensibilité aux biocides en réponse aux changements environnementaux sont également considérées comme une résistance intrinsèque. Un des paramètres à l'origine de ces modifications est la concentration du milieu en nutriments. En effet, un épuisement en nutriments induit des niveaux significatifs de résistance aux agents antimicrobiens (**Brown *et al.*, 1990; Gilbert *et al.*, 1990; Brown et Barker 1999**). La résistance de ces microorganismes à la fois aux biocides et aux antibiotiques peut provenir en partie des modifications des couches cellulaires externes augmentant ainsi leur rôle de barrière qui empêche l'accès aux molécules à leur site d'action, mais d'autres modifications sont également impliquées.

L'adhésion des microorganismes avec des surfaces solides et la formation de biofilm et aussi à l'origine de ce type de changements. Les bactéries se retrouvent dans des conditions nutritives environnementales différentes les unes par rapport aux autres, par conséquent, elles vont afficher des propriétés physiologiques différentes. D'autres mécanismes peuvent aussi intervenir tels que : une diminution de la cinétique de diffusion des désinfectants au sein du biofilm, une diminution de l'accès des désinfectants aux bactéries par différents moyens, interaction chimique entre le désinfectant et le biofilm et la production d'enzymes de dégradation et de produits chimiques neutralisants.

Dans les biofilms, les bactéries présentant un phénotype résistant au sein des populations bactériennes sensibles sont nommées « persister » (**McDonnell et Russell, 1999 ; Chapman, 2003 ; Beumer *et al.*, 2000 ; Lewis, 2005**).

VI.6. Résistance acquise aux désinfectants associée aux modifications génotypiques

Une sensibilité réduite aux biocides peut également être acquise par mutation ou par l'acquisition d'un plasmide ou transposon qui confère des caractéristiques phénotypiques spécifiques des cellules, telles l'expression de la virulence et la résistance aux antimicrobiens.

Par exemple, les gènes de résistance aux ammoniums quaternaires portés par des éléments génétiques transférables ont été largement identifiés (**Chapman 2003 ; Müller *et al.*, 2014**).

Différentes études ont confirmées que les biofilms pourraient constituer un environnement optimal pour l'échange de matériel génétique conduisant à la diffusion de gènes de résistance aux biocides dans la population. En effet, une densité cellulaire élevée, la présence d'une matrice, la libération de grandes quantités d'ADN ou la disponibilité des nutriments dans les biofilms peut favoriser la conjugaison et les processus de transformations et favorisent l'occurrence des mutations. Sachant que l'identification des sites d'action de plusieurs désinfectants a été faite, des mutations pourraient par conséquent, induire une sensibilité moindre au désinfectant agissant sur le site en question. Par exemple, les mutations qui affectent les pompes d'efflux et chez *E. coli* (AcrAB) et *P. aeruginosa* (MexAB) sont associées à une sensibilité réduite à certains désinfectants. Les résultats des quelques travaux consacrées à l'étude de l'influence des mutations sur la sensibilité aux désinfectants ont conclus aussi que ce mécanisme avait un impact qui reste à discuter car les désinfectants agissent parfois simultanément sur plusieurs sites au niveau cellulaire rendant ainsi la conséquence de la mutation variable (**Heinzel 1998 ; McDonnell et Russell 1999; Beumer *et al.*, 2000 ; Kjelleberg et Molin., 2002; Chapman 2003**).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

L'objectif de ce travail est d'étudier la capacité de certaines espèces bactériennes de grand intérêt sanitaire à former des biofilms sur certaines surfaces et leurs sensibilités aux biocides les plus fréquemment utilisés en industrie agroalimentaire.

Trois espèces bactériennes ont été choisies pour réaliser cette étude.

- *Escherichia coli* qui est souvent utilisé comme organisme indicateur d'hygiène des procédés.
- *Listeria monocytogenes* qui est un critère de sécurité des aliments.
- *Listeria innocua*, espèce rarement pathogène, mais qui est souvent apparentée à l'espèce pathogène *Listeria monocytogenes*.

Plusieurs paramètres susceptibles d'influencer la capacité de ces bactéries à former des biofilms ont été pris en considération pour réaliser cette étude, à savoir :

- + L'aérobiose et la microaérophilie ;
- + La charge bactérienne ;
- + Les associations d'espèces bactériennes : biofilms mono espèce et biofilms multi-espèces ;
- + La nature du support sur lequel se développe le biofilm : polystyrène et plastique ;
- + Le renouvellement du milieu de culture.

L'étude est structurée en trois parties :

- 1- La première partie a consisté en la sélection des bactéries à tester :
 - 4- Il a été procédé d'une part, à l'isolement et à l'identification d'isolats d'*E. coli*, de *L. monocytogenes* et *L. innocua* à partir de prélèvements réalisés sur les surfaces dans un abattoir de viande rouge.
 - 5- Puis à la récupération et à la revivification de souches de *L. monocytogenes* (*L.m*) et *L. innocua* (*L.i*) isolées lors d'une étude précédente (**Bouayad et al., 2015**).
- 2- Dans un deuxième temps, nous avons étudié la capacité des bactéries sélectionnées à former des biofilms sous différentes conditions.
- 3- Et enfin, l'étude de la sensibilité de certaines de ces bactéries formant des biofilms à 4 biocides sélectionnés termine notre travail.

Ces trois parties ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre de l'Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira, et dans les laboratoires d'HIDAOA, HASAQ et SPA de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériels

I.1.1. Echantillonnage des surfaces

a) Lieu d'échantillonnage

Afin de collecter les bactéries à tester, des prélèvements de surfaces ont été réalisés au sein d'une unité d'abattage (abattoir de bovin et ovin) située dans la commune d'Ain-Bessem dans la wilaya de Bouira. L'abattoir est situé à l'extrémité de la ville à environ 1km, pas loin de la route nationale N°5. Ses caractéristiques sont les suivantes : Il s'étend sur une superficie globale de 500m². Il comprend deux salles de stabulation, l'une pour les bovins et l'autre pour les ovins. Il comprend une seule grande salle d'abattage équipée d'une chaîne d'abattage. Le sol est couvert de carrelage et les murs de faïence à hauteur de deux mètres. On retrouve également, une salle de lavage des abats, une chambre froide et un bureau pour les services vétérinaires. Les capacités de production de cette unité sont rapportées dans le tableau N° 06.

Tableau N° 06: Capacité de production de l'unité d'abattage.

	Capacité de production	Production journalière moyenne
Ovins	15 à 20 sujets / h	50 à 60 sujets/ 3h /jour
Bovins	5 à 10 sujets / h	20 à 25 sujets /3h/jour

b) Surfaces échantillonnées

80 prélèvements ont été collectés à partir de différentes surfaces de l'abattoir durant la période allant du 20 avril au 27 mai 2018. 70 prélèvements ont été réalisés avant les opérations de nettoyage et de désinfection et 10 après ces opérations. La répartition de ces prélèvements selon la nature de la surface échantillonnée est résumée dans le tableau N° 07.

Partie expérimentale

Tableau N° 07 : Répartition des prélèvements selon la nature de la surface échantillonnée.

Surfaces prélevées	Nombre de prélèvements
Avant nettoyage et désinfection	
Remorques pour carcasses	04
Aiguiseurs pour couteaux	04
Crochets	04
Petits couteaux	10
Grands couteaux	04
Carcasses	02
Tables	09
Vêtements	02
Murs	13
Mains	18
Après nettoyage et désinfection	
Crochets	02
Couteaux	02
Tables	02
Murs	02
Mains	02
Total	80

I.1.2. Isolats et souches bactériennes testés

Comme stipulé précédemment, nous avons utilisé deux catégories d'isolats bactériens :

- ✚ Ceux isolés à partir de nos prélèvements réalisés sur les surfaces de l'abattoir de Ain-Bessem : *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *E.coli* (10 isolats/espèce).
- ✚ Et les souches de *L. monocytogenes* (L.m) et *L. innocua* (L.i) isolées au cours d'une étude précédente réalisée dans un établissement d'abattage par Bouayad *et al.* (2015). Nous avons utilisé 06 souches de *L. monocytogenes* phénotypiquement caractérisées (sérogroupées) et pulsotypées à l'Institut Pasteur Paris. Trois souches (*L.m* 026, *L.m* 038 et *L.m* 055) appartiennent au même séro groupe IIa (*L.m*/IIa) et au même pulsotype ; 02 souches (*L.m* 023 et *L.m* 043) appartiennent au séro groupe IIa et ont des pulsotypes différents, une souche (*L.m* 036) appartient au séro groupe IIb (*L.m*/ IIb) et possède son

Partie expérimentale

propre pulsotype. Ces souches ont fait objet de l'étude de l'effet séroroupe sur la formation des biofilms

I.1.3. Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé se compose de :

- Bain-marie (Water Bath NB 20);
- Balance de précision (ScoutTM SE) ;
- pH mètre (METTLER TOLEDO) ;
- Autoclave (DaiHanWAC-80, Korai) ;
- Etuve (Dlabtech LDO-080N) ;
- Spectrophotomètre (OPTIZEN 32200 UV) ;
- Lecteur ELISA ;
- Densitomètre (Densicheck Plus Instrument, bioMérieux) ;
- Micropipettes avec embouts jetables (THOMOS) ;
- Ecouvillons stériles ;
- GENboxmicroaer (bioMérieux);
- GENbag (bioMérieux) ;
- Matériel usuel de laboratoire de microbiologie.

a. Support pour biofilms

- Cuves en plastiques (Dutscher);
- Microplaques en polystyrène (Dutscher).

b. Réactifs

Pour notre étude, nous avons utilisé :

a/ Pour la partie recherche et isolement des bactéries :

- Milieu sélectif chromogène ALOA[®]et additifs (bioMérieux) ;
- Milieu sélectif chromogène chrom IDTM Coli (bioMérieux) ;

b/ Pour la revivification des souches de *Listeria* :

- Milieux sélectif chromogène ALOA[®]et additifs (bioMérieux) ;
- Gélose TSA (bioMérieux);

c / Pour les tests d'adhésion et formation de biofilms :

- Bouillon TSB (bioMérieux);
- Gélose TSA (bioMérieux);
- Eau physiologique stérile ;
- Désinfectant EAS ECO (Anios);

Partie expérimentale

- Cristal violet (bioMérieux)
- Ethanol.

c / Pour les tests de sensibilité aux biocides

- Détergent acide + désinfectant à base d'ammonium quaternaire (DDAC),
- Détergent alcalin + désinfectant à base d'ammonium quaternaire (DDAL),
- Désinfectant à base d'amine (DA);
- Hypochlorite de sodium (NaClO) (Eau de javel).
- Bouillon TSB (bioMérieux);
- Cristal violet (bioMérieux)
- Ethanol.

I.2. Méthodes

I.2.1. Echantillonnage

Pour des raisons de commodité de travail, de simplicité, et de rapidité, nous avons choisi la technique d'écouvillonnage selon les recommandations de la norme **ISO 18593 (2004)** intitulée : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons. Cette norme spécifie des méthodes horizontales pour le prélèvement d'échantillons sur les surfaces rencontrées dans l'environnement des industries agro-alimentaires (et d'autres transformateurs des produits alimentaires), en vue de rechercher ou de dénombrer des micro-organismes viables.

➤ Préparation de l'écouvillon

10 ml de TSB (*trypticase soy broth*) sont versés dans les conteneurs des écouvillons stériles. Ces derniers sont stockés à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation (une heure approximativement).

➤ Technique d'écouvillonnage

L'échantillonnage a porté sur un nombre total de 80 prélèvements. L'écouvillonnage est réalisé sur différentes surfaces : les mains et les vêtements du personnel, les carcasses et les outils de travail tel que la remorque, les crochets, les tables, les couteaux et l'aiguiseur avant et après les opérations de nettoyage et désinfection selon la méthode décrite ci-dessous :

Après ouverture de l'écouvillon, l'extrémité est comprimée sur la paroi du tube pour éliminer l'excès de TSB. La pointe de l'écouvillon est placée sur la surface à étudier, un frottement par stries est réalisé avec un gabarit sur une superficie de 10cm² pour les surfaces planes en faisant tourner l'écouvillon entre le pouce et l'index dans deux directions

Partie expérimentale

perpendiculaires l'une à l'autre. L'écouvillon est remis par la suite dans le tube et fermé. Un étiquetage est réalisé pour identifier la nature de la surface prélevée.

Pour les surfaces qui ne permettent pas un écouvillonnage avec un gabarit de 10 cm², les écouvillons sont frottés sur un maximum de surface à prélever.

Les écouvillons sont conservés à +4°C dans une enceinte frigorifique et acheminés directement au laboratoire pour analyse.

NB : Il est à signaler que dans le cas de notre établissement d'abattage, les opérations de nettoyage et de désinfection se résument à un simple rinçage à l'eau de l'ensemble des surfaces.

I.2.2. Isolement et identification

a/ *L. monocytogenes* et *L. innocua*

La méthode utilisée pour l'isolement des *L. monocytogenes* et *L. innocua* est la norme **EN ISO 16140** (Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives) en se basant sur les principes de la méthode **NF EN ISO 11290** parties 1 et 2 – Amendement 1 (2004) : Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria*. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un milieu chromogène : ALOA® Count.

➤ Domaine d'application

La méthode ALOA® Count est une méthode alternative d'analyse pour l'agroalimentaire, certifiée par AFNOR : Certification pour les produits d'alimentation humaine et les échantillons d'environnement.

➤ Principe

Sur ce milieu, *L. innocua* forme des colonies rondes, régulières, de couleur bleue à bleu vert (détection de la bêta-glucosidase grâce à un substrat chromogénique spécifique).

Les colonies de *L. monocytogenes* présentent en plus de cet aspect arrondi et bleu verdâtre, un halo opaque qui permet de les différencier aisément des autres espèces de *Listeria*. Ce halo est lié à l'activité d'une phospholipase impliquée dans le processus infectieux de cette bactérie. La sélectivité est obtenue par l'action combinée du chlorure de lithium, des antibiotiques et antifongiques contenus dans le milieu.

➤ Mode opératoire

L'ensemencement est réalisé directement sur gélose ALOA par technique d'épuisement, sans passer par l'étape de l'enrichissement et cela en suivant les recommandations de la norme **ISO 18593 (2004)**. Le contenu du conteneur de l'écouvillon est vortexé pour récupérer toutes

Partie expérimentale

les bactéries accrochées à l'écouvillon. De cette suspension, une goutte est prélevée par anse de platine afin d'êtreensemencée sur la gélose.

Le mode opératoire est représenté dans la figure N° 04.

b/ *E. coli*

La méthode utilisée pour l'isolement d'*E. coli* est la méthode **ISO 4832 (2006)**. Elle est basée sur l'utilisation d'un milieu chromogène : le chromID™ Coli.

➤ **Domaine d'application**

La méthode basée sur l'utilisation de la gélose chromID™ Coli (milieu chromogène sélectif pour la détection et le dénombrement d'*E. coli* β -D-glucuronidase-positif et des autres coliformes) est certifiée selon la norme **EN ISO 16140** (Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives) en se basant sur les principes de la méthode **NF ISO 4832(2006)** Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies.

➤ **Principe**

Le milieu chromID™ Coli contient deux substrats chromogènes : l'un pour la mise en évidence de la β -D-glucuronidase colorant les colonies d'*E. coli* en rose et l'autre pour la mise en évidence de la β -galactosidase colorant les colonies des autres coliformes en bleu. La combinaison de ces deux substrats optimise la détection d'*E. coli* et des autres coliformes. La multiplication de la plupart des bactéries Gram positif est inhibée.

➤ **Mode opératoire**

Le contenu du conteneur de l'écouvillon est vortexé pour récupérer toutes les bactéries accrochées à l'écouvillon. De cette suspension, une goutte est prélevée par anse de platine afin d'êtreensemencée sur la gélose. L'ensemencement est réalisé directement sur gélose chromID™ Coli par technique d'épuisement (ensemencement en surface) cela en suivant les recommandations de la norme **ISO 18593 (2004)**. Le mode opératoire est représenté dans la figure N° 05.

Partie expérimentale

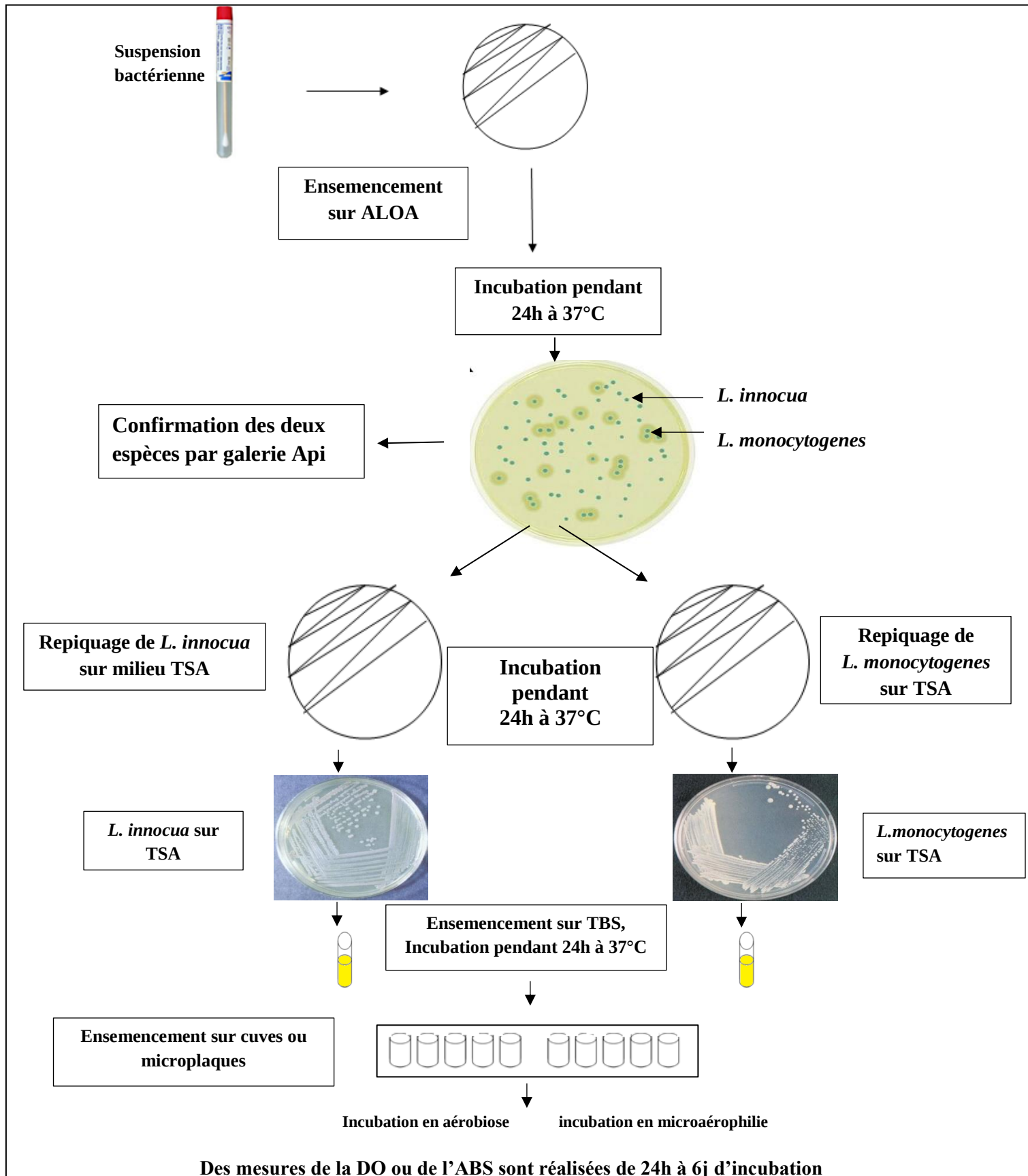


Figure N° 04 : Diagramme d'isolement, d'identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* et *L. innocua*.

Partie expérimentale

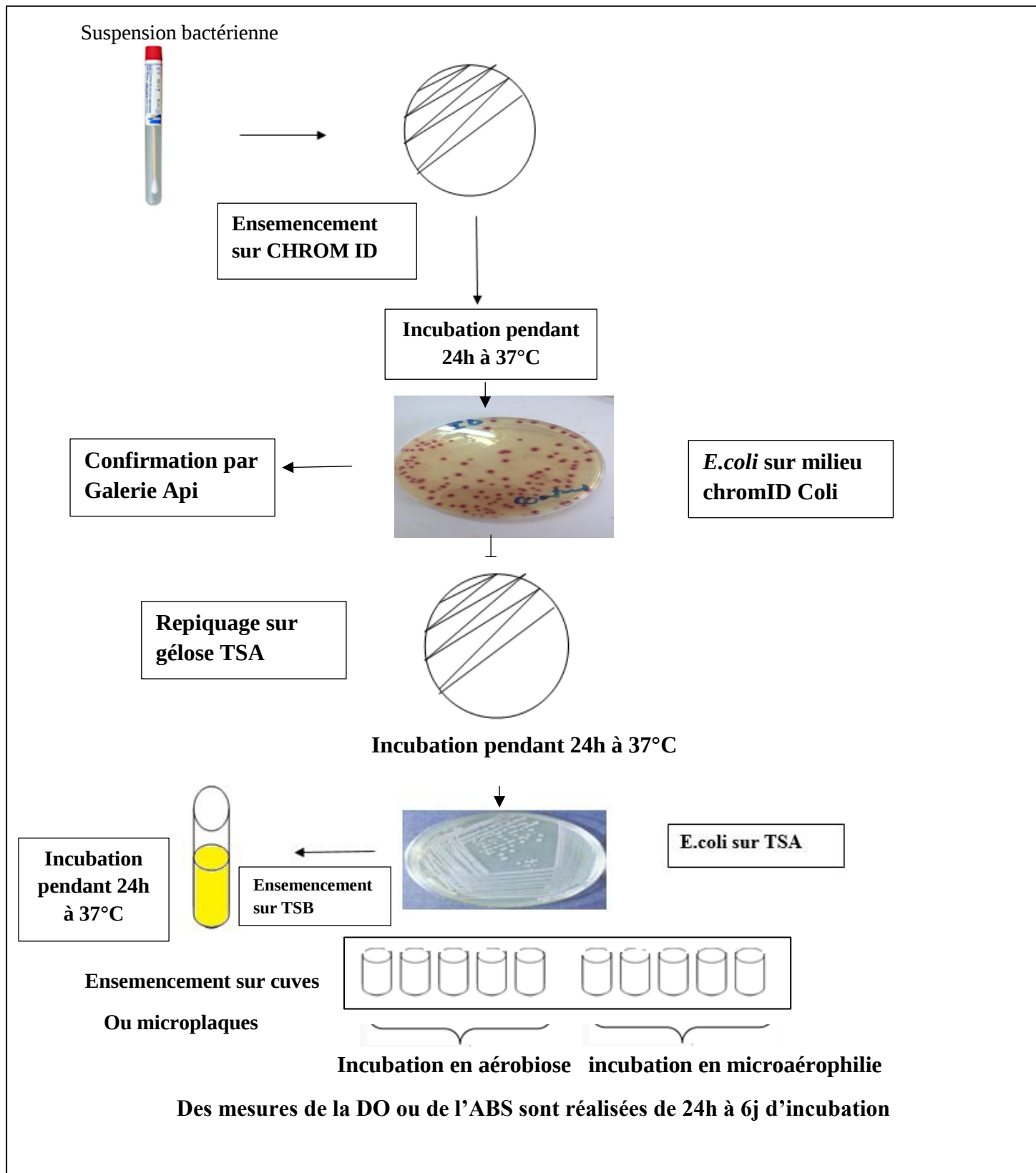


Figure N° 05: Diagramme d'isolement, d'identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli*.

Partie expérimentale

I.2.3. Revivification des souches de *L. monocytogenes* et *L. innocua*

Les bactéries sont revivifiées par ensemencement dans un premier temps sur de la gélose ALOA incubée à 37°C pendant 24h, puis repiquées sur de la gélose TSA (Trypticase Soy Agar) (bioMérieux) incubée à 37°C pendant 24h.

I.2.4. Méthodes de réalisation des tests d'adhésion et de formation de biofilms

Les tests d'adhésion et de formation de biofilm sur le support en polystyrène ont été réalisés selon les principes de la méthode de quantification de la biomasse décrite par Christensen *et al.* (1985). La mesure des densités optiques (DO) est réalisée en utilisant un lecteur ELISA après coloration au réactif Cristal violet (CV). Les principes de cette méthode ont été suivis pour la réalisation des tests d'adhésion et formation de biofilms sur un support en plastique (cuves).

La mesure des absorbances (ABS) est réalisée en utilisant un spectrophotomètre, sans passer par la coloration au Cristal violet car le milieu de culture utilisé (TSB) est de couleur jaune (spectre lisible).

La force de formation des biofilms est estimée selon la classification décrite par **Stepanovic *et al.* (2000)**. Les espèces bactériennes, compte tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en trois catégories : **non adhérentes, faiblement adhérentes et hautement adhérentes** (tableau N° 08). La mesure des densités optiques (DO) est remplacée par l'absorbance (ABS) pour les tests réalisés sur le support en plastique.

Tableau N° 08 : Estimation de la formation des biofilms.

DOs ≤ DOnc (Témoin)	Non Adhérentes : Bactéries ne formant pas de biofilm (NA)
ABS _s ≤ ABSnc (Témoin)	
DOnc × 2 ≤ DOs ≤ DOnc × 4	Moyennement adhérentes : Formation modérée de biofilm (M) ce qui correspond à une force moyenne de formation des biofilms
ABSnc × 2 ≤ ABSs ≤ ABSnc × 4	
DOnc × 4 ≤ DOs	Hautement Adhérentes : Bactéries fortement formatrices de biofilm (F) ce qui correspond à une force élevée de formation des biofilms
ABSnc × 4 ≤ ABSs	

-DOs : Densité Optique des suspensions bactériennes. - ABSs : absorbance des suspensions bactériennes. -DOnc : Densité Optique du témoin (négatif control) (TSB). - ABSnc : absorbance du témoin (négatif control) (TSB).

➤ Préparation des isolats et souches bactériennes

Les isolats et souches d'*E. coli*, *L. monocytogenes* et *L. innocua* ont fait l'objet d'un repiquage sur gélose TSA suivi d'un enrichissement sur TSB en vue de la réalisation des tests d'adhésion et de formation de biofilms (figures N°5 et N°6).

➤ Préparation des suspensions

Afin d'étudier l'influence de la charge bactérienne initialement mise en contact avec la surface ainsi que l'effet de l'association des souches et d'espèces et leurs concentrations sur la capacité des bactéries à adhérer et à former des biofilms mono souche, mono espèce et multi espèces, des suspensions bactériennes ont été préparées en ajustant la concentration à 1 et à 4 McFarland à l'aide d'un densitomètre.

Les différentes suspensions bactériennes préparées sont répertoriées dans le tableau N°09.

Des suspensions bactériennes à 1 McFarland sont préparées à partir des espèces bactériennes seules et des associations suivantes : *L.m* ; *L.m* + *L.i* ; *L.m* + *E.coli* ; *Li* + *E.coli* ; *L.m* + *L.i* + *E.coli*. Des suspensions bactériennes à 4 McFarland sont préparées à partir des espèces bactériennes seules et des associations : *L.m* + *E.coli* et *L.i* + *E.coli*.

Afin d'étudier l'influence du sérotype des *L. monocytogenes* sur leur capacité à former des biofilms, des suspensions bactériennes à 1 McFarland sont préparées à partir des souches seules et des associations suivantes: *L.m/ Ila* ; *L.m/ Ila* + *L.i* ; *L.m/ I Ib* + *L.i* ; *L.m/ Ila* + *E.coli* ; *L.m/ I Ib* + *E.coli* ; *L.m/ Ila*+*L.i* + *E.coli* ; *L.m/ I Ib*+*L.i* + *E.coli* ; *L.i* + *E. coli*. Des suspensions à 4 McFarland sont préparées à partir des souches seules et des associations suivantes : *L.m/ Ila* + *E.coli*, *L.m/ I Ib* + *E.coli* et *L.I* + *E.coli*.

Partie expérimentale

Tableau N° 09: Suspensions bactériennes préparées aux deux densités : 1 et 4 McFarland.

Suspensions mono-espèce	Espèces bactérienne utilisées				
Suspensions à 1 McFarland	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>		
Suspension à 4 McFarland	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>		
Suspensions multi –espèce	Espèces et de souches associées				
Suspensions à 1McFarland	Différentes <i>L.m</i>	<i>L.m+</i> <i>E. coli</i>	<i>L.i+E. coli</i>	<i>L.m+L.i</i>	<i>L.m+L.i+E. coli</i>
Suspension à 4McFarland	/	<i>L.m+</i> <i>E. coli</i>	<i>L.i+E. coli</i>	/	/

➤ Préparation des cuves en plastique

Les cuves en plastique ont été désinfectées avec l'utilisation d'une solution à 1% (spectre de bactéricidie et fongicidie) d'un désinfectant à base d'amine spécifique au secteur agro-alimentaire. Les cuves sont plongées dans la solution désinfectante pendant 15 min. Un rinçage à l'eau physiologique stérile est réalisé par la suite. Le séchage se fait sur pailleasse dans le champ stérile du bec Bunsen.

➤ Remplissage des cuves et incubation

Pour chaque suspension bactérienne à tester (mono et multi espèces, à 1 ou à 4 McFarland) (Tableau N°09), 250 µl sont déposés dans chaque cuve. 08 cuves pour chaque suspension sont préparées. La moitié des cuves est incubée en aérobiose et l'autre moitié en microaérophilie obtenue par utilisation des Genbox microaer et des Genbag et ce à une température de 37°C.

➤ Remplissage des microplaques en polystyrène

Les suspensions de chaque espèce bactérienne et des associations d'espèces à 1 et 4 McFarland sont ensemencées pour chaque expérience sur 08 microplaques en polystyrène en triplicata (3 puits). La méthode utilisée est décrite ci-dessous :

200 µl de chaque suspension sont ensemencés en triplicatas, les trois dernières colonnes sont remplies de 200 µl de TSB pour servir de témoins. Afin de tester l'effet de la teneur en oxygène sur l'adhésion et la formation des biofilms, 04 microplaques sont incubées en aérobiose et 04 autres en microaérophilie pendant 6 jours à 37°C.

Une première lecture de la densité optique (DO) est réalisée après 24h d'incubation.

Une microplaque incubée en aérobiose et une microplaque en microaérophilie sont

retenues pour réaliser un renouvellement du milieu de culture dans le but d'évaluer son effet sur le développement des biofilms. Les puits sont vidés en renversant délicatement les microplaques. Le renouvellement du milieu de culture est réalisé par ajout de 200 µl de TSB dans tous les puits. Ces microplaques sont par la suite réinocubées pendant 96h.

Avant de mesurer les DO, les puits sont aspirés, rincés à l'eau physiologique stérile 3 fois de suite et fixés par ajout de 200µl de méthanol dans chaque puits. Après 15 min, les microplaques sont vidées et séchées à température ambiante et colorées par addition de 200 µl de solution de CV à 2% dans chaque puits. Après 5 minutes, les microplaques sont rincées avec de l'eau courante 5 fois et séchées à température ambiante.

➤ Mesure de l'absorbance (ABS) à 550 nm

Pour le support en plastique : Deux premières lectures de l'absorbance des suspensions bactériennes (ABSs) et d'un témoin négatif (ABSnc) sont réalisées à 24h et à 48h pour évaluer l'adhésion et le début de formation des biofilms. D'autres lectures sont réalisées à 5 et 6 jours pour le développement des biofilms.

L'ABS correspondante à chaque suspension bactérienne testée (ABSs) est obtenue en calculant la moyenne des absorbances mesurées des cuvesensemencées par les mêmes suspensions, cette dernière est comparée avec l'absorbance de la cuve témoin (ABSnc).

➤ Mesure de la densité optique (DO) à 550 nm

Pour le support en polystyrène : Deux premières lectures de la densité optique des suspensions bactériennes (DOs) et d'un témoin négatif (DOnc) sont réalisées à 24h pour évaluer l'adhésion. D'autres lectures sont réalisées à 3j et 6j pour évaluer la formation et le développement des biofilms.

La DO correspondante à chaque suspension bactérienne testée (DOs) est obtenue en calculant la moyenne des densités optiques mesurée des triplicatas, ces dernières sont comparées avec les moyennes des densités optiques des puits témoins (DOnc) (**Lemon et al., 2007; Chen, 2013, Wang et al., 2015 ; Le Hénaff, 2016**).

I.2.5. Sensibilité aux biocides

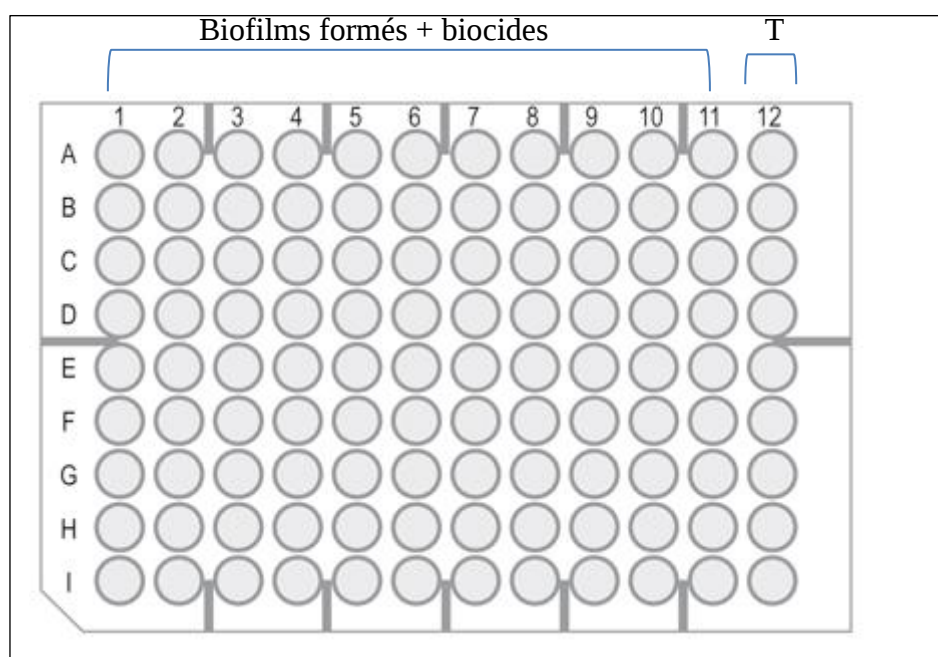
La sensibilité aux biocides a été réalisée uniquement sur les biofilms formés avec les suspensions à 1 McFarland sur le support en polystyrène. Elle concerne uniquement les biofilms formés par les souches sérotypées de *Lm*, les *L.i* et les *E.coli*, seules et en association.

Pour évaluer la sensibilité des bactéries formant les biofilms aux biocides, 04 produits ont été sélectionnés (Tableau 10).

Partie expérimentale

Les biofilms formés à partir de chaque suspension bactérienne qu'elle contienne des souches de *L.m* , les isolats d'*E.coli* ou de *L.i* ou encore les différentes associations d'espèce sont testées en appliquant les méthodes suivantes :

Après 06 jours d'incubation, les plaques contenant les biofilms formés sont vidées par aspiration. 200 µl de chaque solution de biocide sont ajoutés dans chacun des puits (Figure N° 06 et tableau N°10).



T= témoin

Figure N°06 : Test de sensibilité aux biocides des biofilms formés sur le polystyrène.

Tableau N° 10 : Nature et concentration des biocides testés par puits

Puit	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Biocide à tester	DDAC	DDAC	DDAL	DDAL	DDAL	DA	DA	NaClO	NaClO
Concentration	1%	3%	1%	2%	2%	0,5%	1%	1%	2%

Après un temps de contact de 15 min, les puits sont vidés par renversement. La lecture de la DO se fait après coloration au CV.

c) Interprétation des résultats

Les mesures de DO réalisées avant l'ajout du biocide à tester (DO_1) sont comparées avec les valeurs de DO obtenues après l'ajout du biocide (DO_2). Le pourcentage de réduction des biofilms est par la suite calculé.

L'interprétation se fait en appliquant les formules suivantes :

$$DO_r = DO_1 - DO_2$$

$$\text{Pourcentage de réduction} = DO_r \times 100\%$$

Les bactéries testées sont considérées comme étant sensibles aux biocides si le pourcentage de réduction est supérieur à 0.

I.2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat 2018 pour Windows dans le but de comparer entre les différentes valeurs de DO et de l'ABS en prenant en considération tous les paramètres étudiés : incubation en aérobiose et en microaérophilie, nature du support, renouvellement du milieu de culture, charge bactérienne et nature des bactéries formant le biofilm. Les pourcentages de réduction des biofilms après l'utilisation des biocides ont aussi été comparés.

La différence entre les valeurs comparées est significative si $p \leq 0,05$.

II. Résultats

II.1. Isolement de *Listeria*

100% des échantillons prélevés à partir de l'abattoir étaient positifs à *L. monocytogenes* et *L. innocua* sur milieu ALOA (Figures N° 07).

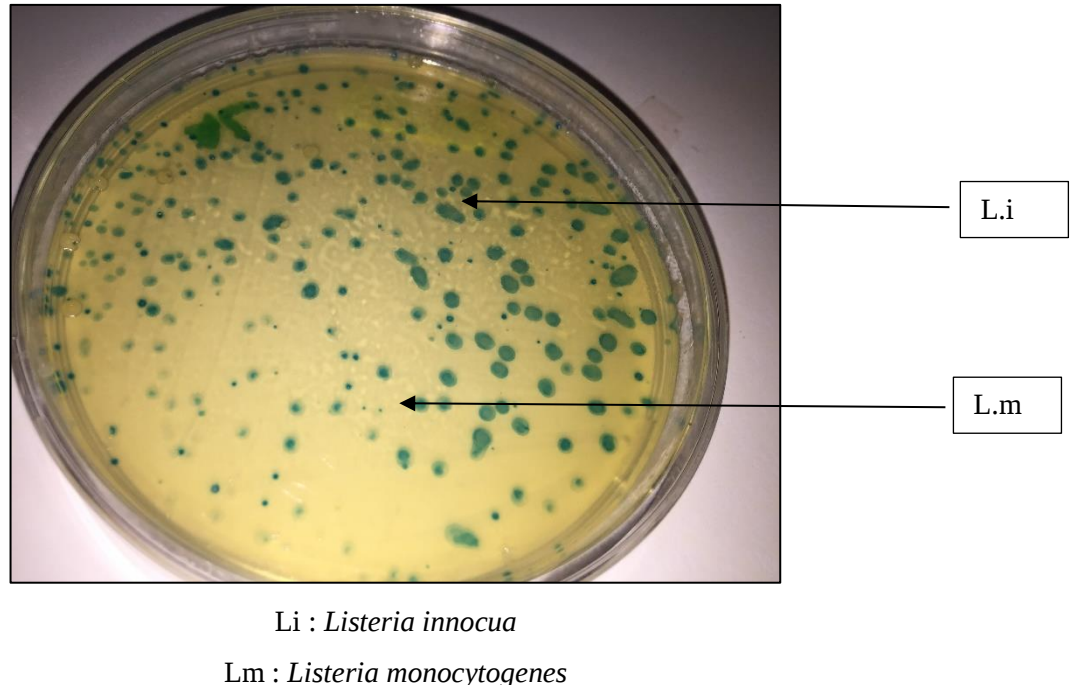


Figure N° 07: Aspect des colonies de *L. monocytogenes* et de *L. innocua* et sur milieu ALOA (photo personnelle).

II.2. Isolement d'*E. coli*

100% des échantillons prélevés à partir de l'abattoir étaient positifs à *E. coli* sur le milieu chromID™ (Figure N° 08).

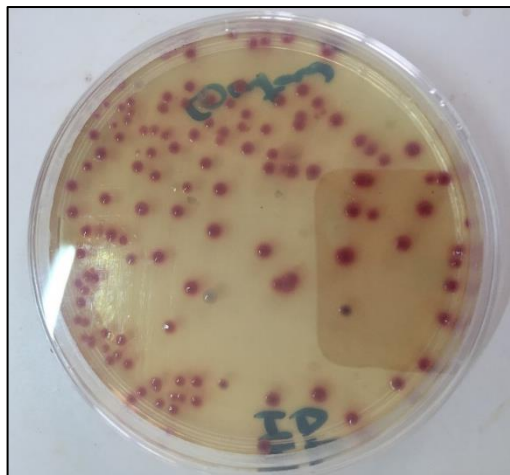


Figure N° 08 : Aspect des colonies d'*E. coli* sur milieu chromID™ (photo personnelle).

Partie expérimentale

II.3. Repiquage sur TSA et enrichissement sur TSB

Toutes les bactéries qui ont fait l'objet d'un repiquage sur TSA ont poussé en donnant des colonies beiges caractéristiques (**figures N° 09 et N°10**).

Tous les tubes de TSB ensemencés à partir des colonies sur la gélose TSA ont présenté un trouble témoignant d'un développement bactérien.

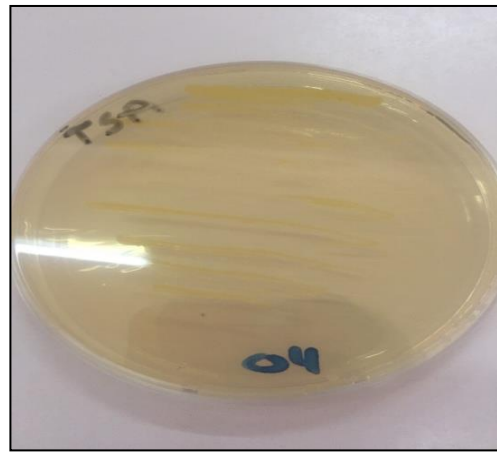
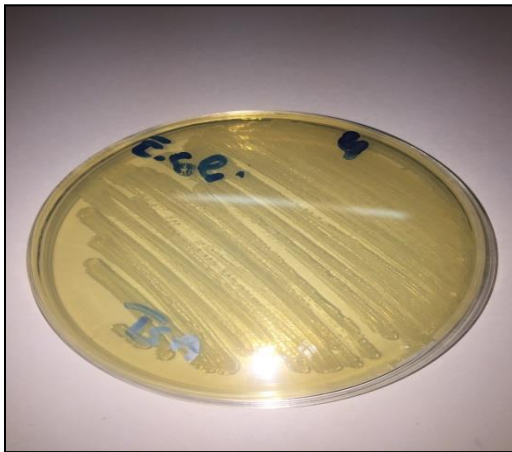


Figure N° 09 : Aspect des colonies sur gélose TSA (photo personnelle).



Figure N° 10 : Tube de TSB après 24h d'incubation (apparition de trouble).

(photo personnelle)

II.4. Résultats des tests d'adhésion et formation de biofilms sur le support en plastique

La capacité de chaque bactérie à adhérer aux cuves en plastique et à former un biofilm a été testée séparément et en association avec les autres bactéries. Ces tests ont été réalisés en aérobiose et en microaérophilie et aux deux concentrations 1 McFarland et à 4 McFarland.

II.4.1. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 1 McFarland

II.4.1.1. Biofilm à *L. innocua*

a- En aérobiose

Partie expérimentale

Après 24h de culture, nous avons observé une forte adhésion suivie d'une forte formation de biofilm durant toute la période d'incubation.

Cette espèce bactérienne est fortement productrice de biofilm après 48h d'incubation. Cette force s'est maintenue à 5 j et à 6 j ($p < 0,05$) (Tableau et Figure N° 11).

b- En microaérophilie

Après 24h de culture, il y a eu une forte adhésion, suivie d'une formation importante de biofilm (l'espèce est considérée comme fortement productrice de biofilm à 48 h).

Au 5^{ème} j et au 6^{ème} j, une diminution de la force de formation des biofilms a été notée (production moyenne de biofilm) (Tableau et Figure N° 11).

Tableau N°11: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de *L. innocua* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,651	0,689	0,355	0,257	0,448	0,367	0,22	0,217
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F	M	M

F : **forte** formation des biofilms, M : **moyenne** formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

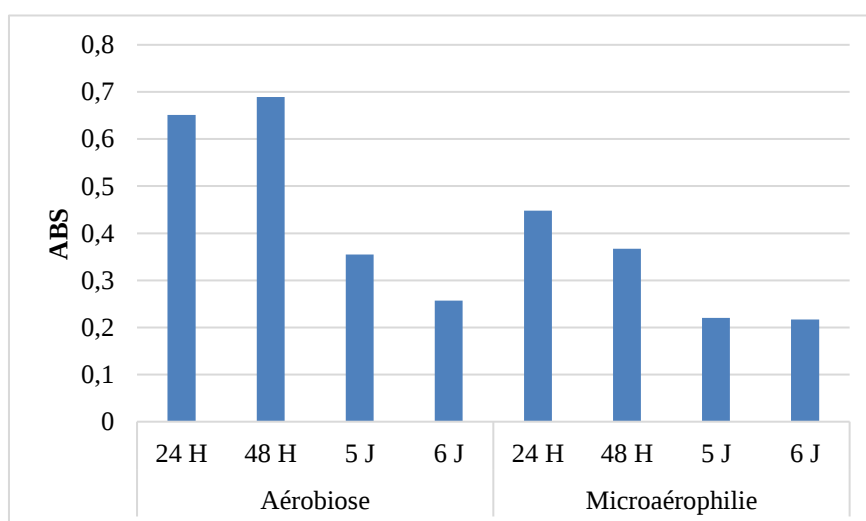


Figure N°11: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de *L. innocua* (Suspension à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.4.1.2. Biofilm à *L. monocytogenes*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée dès les premières 24h de culture, suivie par une forte production de biofilm à 48 h.

La force de formation de biofilm devient moyenne après 5 j d'incubation et remonte légèrement au 6^{ème} j.

b) En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée dès les premières 24h de culture, suivie par une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N° 12).

Tableau N° 12 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de *L. monocytogenes* (Suspension à 1McF)

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,637	0,860	0,293	0,367	0,487	0,431	0,423	0,390
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	M	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

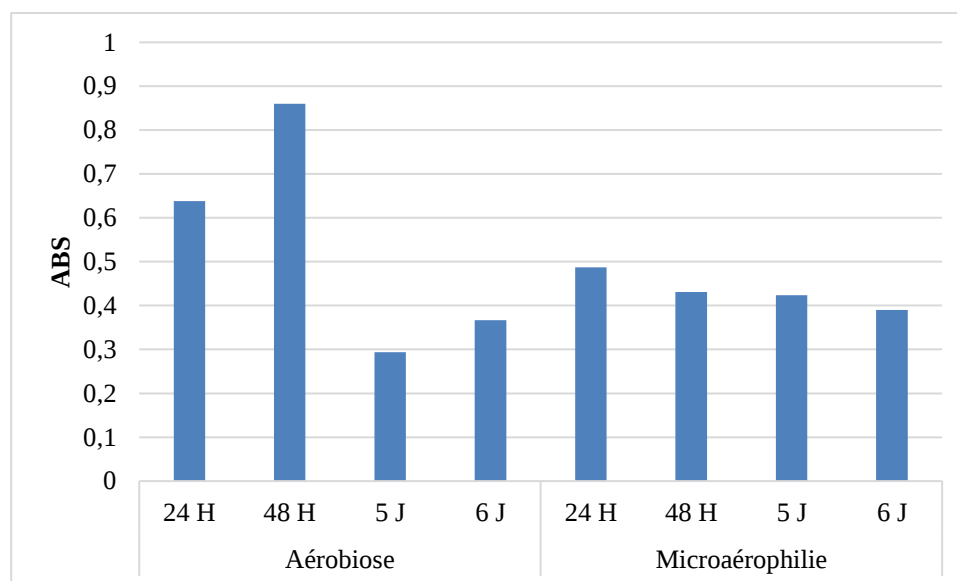


Figure N° 12 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de *L. monocytogenes* (Suspension à 1McFarland).

II.4.1.3. Biofilm à *E. coli*

a) En aérobiose

Après 24h de culture, il y a eu adhésion. La bactérie s'est montrée fortement productrice de biofilm après 48h. La force de formation des biofilms a baissé au 5^{ème} j et 6^{ème} j avec une production moyenne de biofilm (Tableau et Figure N°13).

b) incubation en microaérophilie

Les mêmes résultats obtenus en aérobiose ont été observés en microaérophilie (Tableau et Figure N°13).

Tableau N°13 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli* (suspension à 1 McFarland)

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,527	0,481	0,257	0,261	0,437	0,366	0,219	0,253
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	M	M	F	F	M	M

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

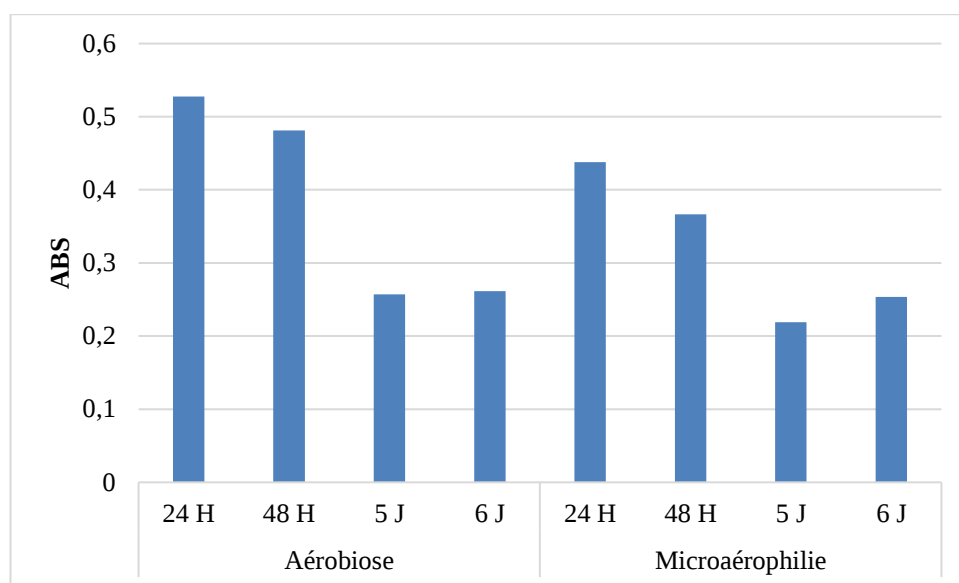


Figure N°13 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli* (Suspension à 1 McFarland).

II.4.2. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 4 McFarland

II.4.2.1. Biofilm à *L. innocua*

a) En aérobiose

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivie d'une forte production de biofilms à 48 h. Cette production devient moyenne aux 5^{ème} j et 6^{ème} j d'incubation (Tableau et Figure N°14).

b) En microaérophilie

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 48 h, aux 5^{ème} j et 6^{ème} j d'incubation (Tableau et Figure N°14).

Partie expérimentale

Tableau N°14: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de *L. innocua* (suspension à 4McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,676	0,633	0,25	0,226	1,055	0,701	0,548	0,432
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	M	M	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

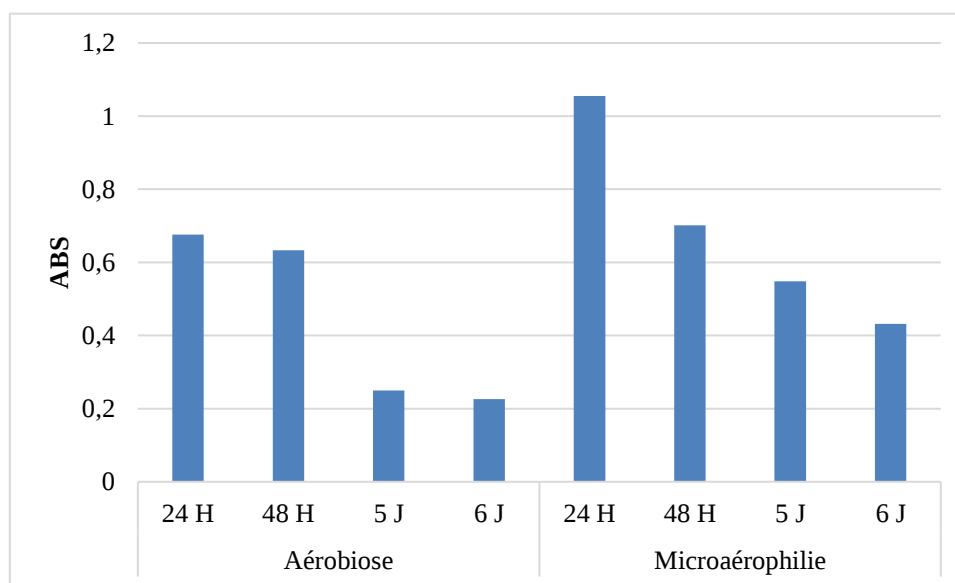


Figure N°14: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilms de *L. innocua* (suspension à 4McFarland).

Partie expérimentale

II.4.2.2. Biofilm à *L. monocytogenes*

a) En aérobiose

L'adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm à 48 h et une production moyenne au 6^{ème} j d'incubation (Tableau et Figure N°15).

b) En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation. (Tableau et Figure N°15).

Tableau N°15 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* (suspension à 4 McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	1,451	1,478	0,520	0,342	1,366	1,437	1,203	1,186
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	M	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

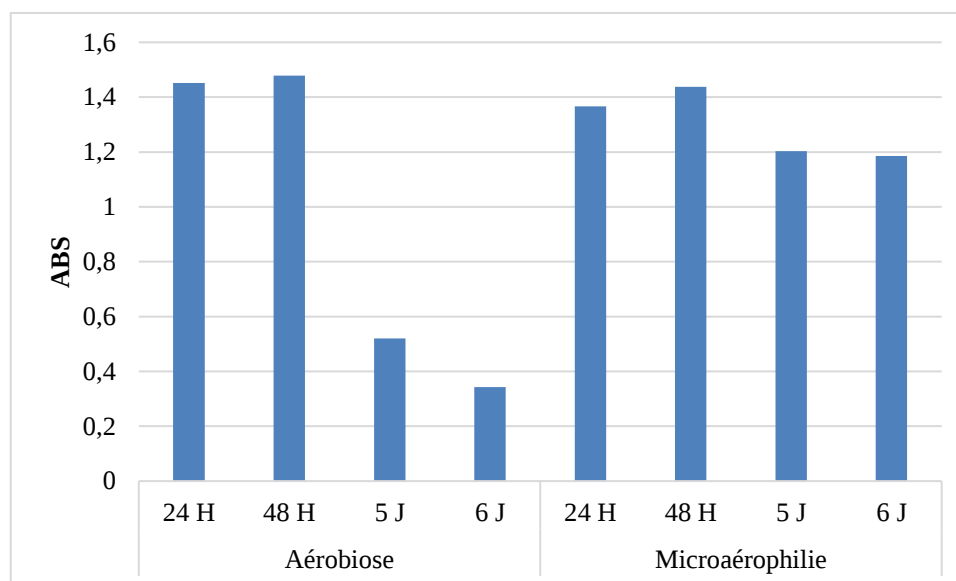


Figure N°15 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* (suspension à 4 McFarland).

II.4.2.3. Biofilm à *E. coli*

a) En aérobiose

La bactérie a adhéré fortement à la surface après 24h de culture, elle a montré une forte production de biofilms à 48 h. La production est devenue moyenne aux 5^{ème} j puis a légèrement augmenté au 6^{ème} j d'incubation redevenant ainsi forte (Tableau et figure N°16).

b) En microaérophilie

La bactérie a adhéré fortement sur la surface après 24h de culture, et elle a montré une forte production de biofilms durant toute la période d'incubation (Tableau et figure N°16°).

Le développement de biofilm en microaérophilie est plus important qu'en aérobiose ($p < 0,05$). *E.coli* est la seule bactérie testée qui a donné ce résultat.

Partie expérimentale

Tableau N°16: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E.coli*
(Suspension à 4McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	1,408	1,208	0,277	0,614	1,124	1,041	0,538	0,516
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	M	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s :absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

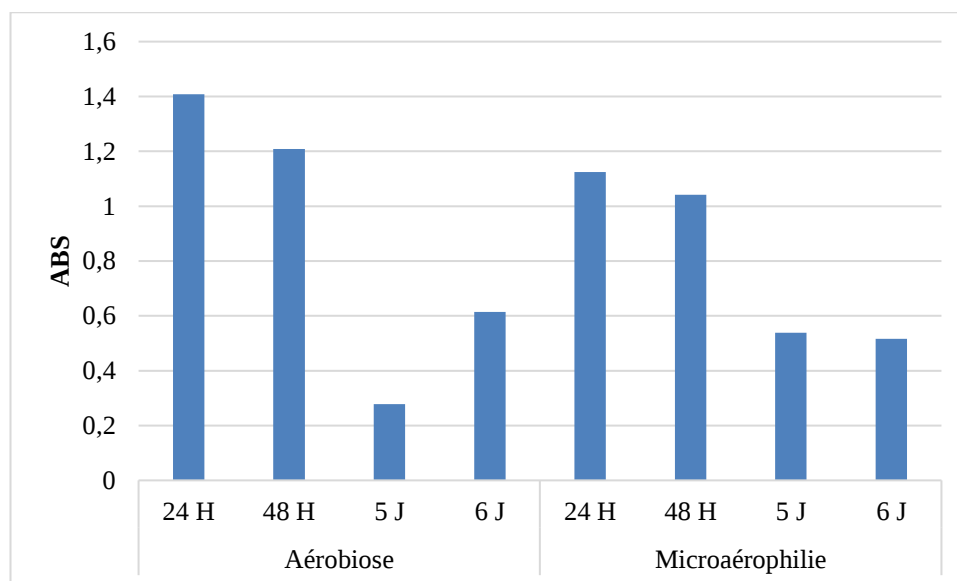


Figure N°16: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E.coli*
(Suspension à 4McFarland).

Partie expérimentale

II.4.3. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi espèces à concentration de 1 McFarland

II.4.3.1. Associations des bactéries de l'espèce *L. monocytogenes*

a. En aérobiose

Une faible force d'adhésion a été observée après 24h de culture, suivi d'une forte production de biofilm à 4j et aux 5^{ème} j et 6^{ème} j d'incubation (Tableau et Figure N°17).

b. En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°17).

Tableau N°17: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de l'association de bactéries de l'espèce *L. monocytogenes* (Suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée de l'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABSs	0,1	1,278	1,237	1,204	0,695	1,407	1,34	1,201
ABSnc	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	M	F	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABSs :absorbance de la solution à tester, ABSnc : absorbance du témoin.

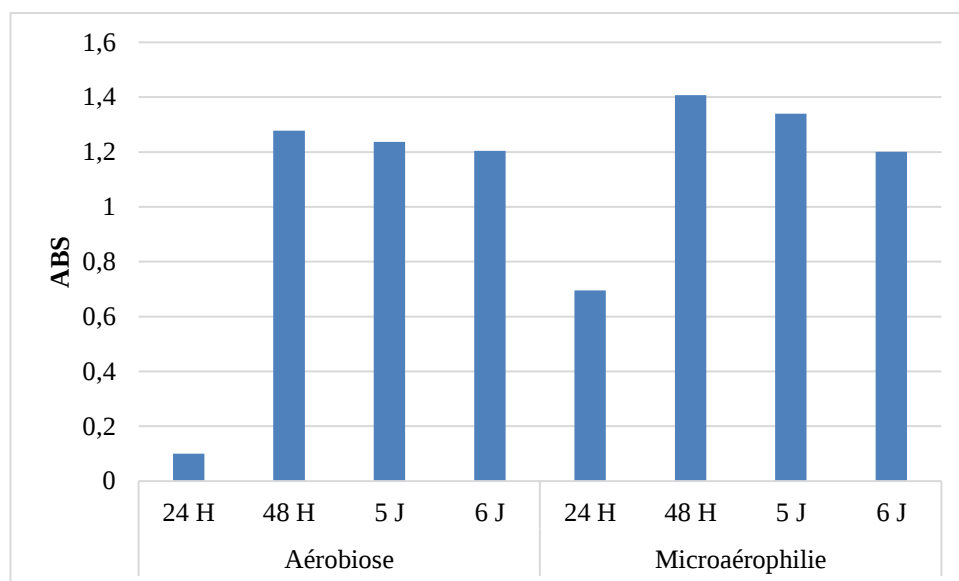


Figure N°17: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de l'association de bactéries de l'espèce *L. monocytogenes* (Suspension à 1McFarland).

II.4.3.2. Association *E. coli* + *L. monocytogenes*

a. En aérobiose

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°18).

b. En microaérophilie

Les mêmes résultats obtenus en aérobiose sont observés en microaérophilie (Tableau et figure N°18).

Partie expérimentale

Tableau N°18 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* + *E. coli* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,72	0,945	0,513	0,532	0,660	0,566	0,555	0,525
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

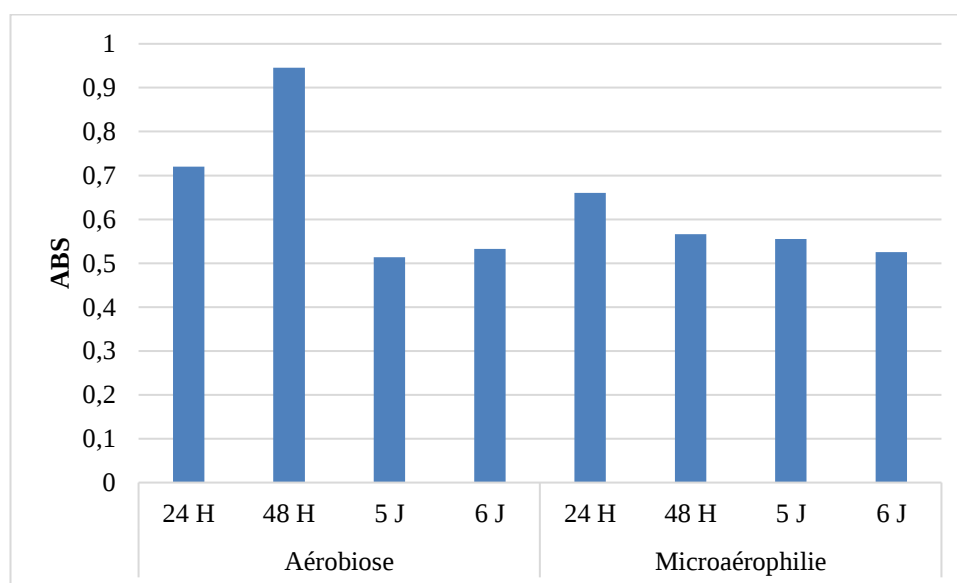


Figure N°18 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* + *E. coli* (suspension à 1McFarland).

II.4.3.3. Association *E. coli* + *L. innocua*

a. En aérobiose

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une production moyenne de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°19).

Partie expérimentale

b. En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°19).

Tableau N°19: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E.coli*+ *L. innocua* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,693	0,21	0,165	0,164	0,544	0,448	0,448	0,377
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	M	M	M	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s :absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

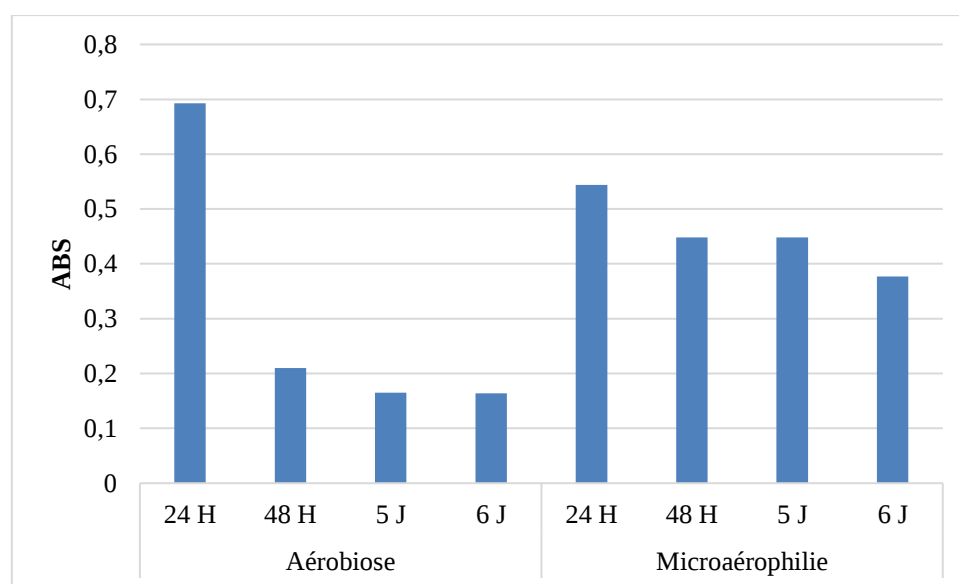


Figure N°19: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E.coli*+ *L. innocua* (suspension à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.4.3.4. Associations *E. coli* + *L. monocytogenes* + *L. innocua*

a. En aérobiose

Une très forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°20).

b. En microaérophilie

Les mêmes résultats obtenus en aérobiose sont observés en microaérophilie (Tableau et Figure N°20).

Tableau N°20 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli*+ *L. innocua* +*L. monocytogenes* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,6835	0,89	1,0185	0,819	0,639	0,5625	0,55	0,4915
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

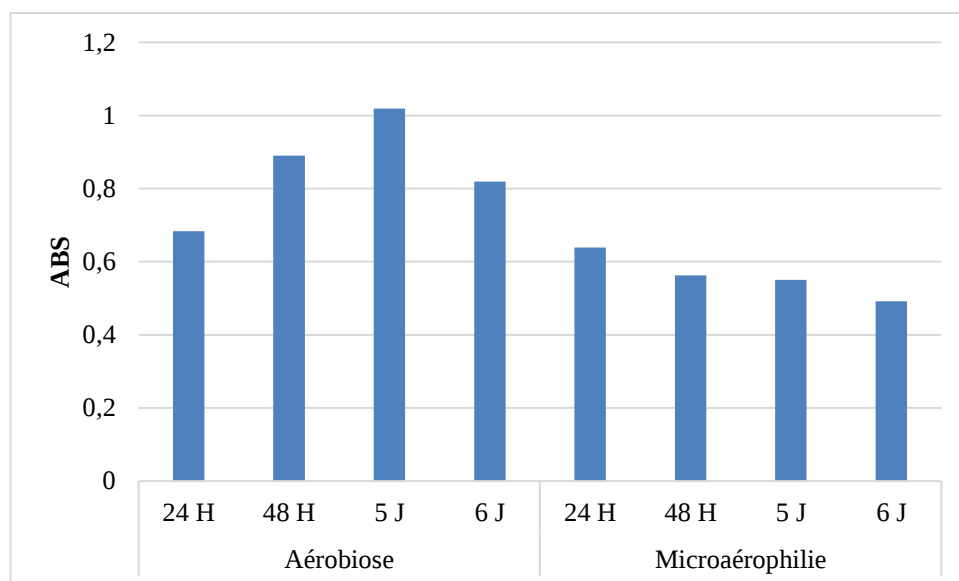


Figure N°20 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli* + *L. innocua* + *L. monocytogenes* (suspension à 1McFarland).

II.4.3.5. Association *L. monocytogenes* + *L. innocua*

a. En aérobiose

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une très forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°21).

b. En microaérophilie

Les mêmes résultats obtenus en aérobiose sont observés en microaérophilie (Tableau et Figure N°21).

Tableau N°21: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *L. monocytogenes* + *L. innocua* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	0,707	0,854	0,944	0,71	0,511	0,8365	0,7145	0,6395
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation des biofilms	F	F	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

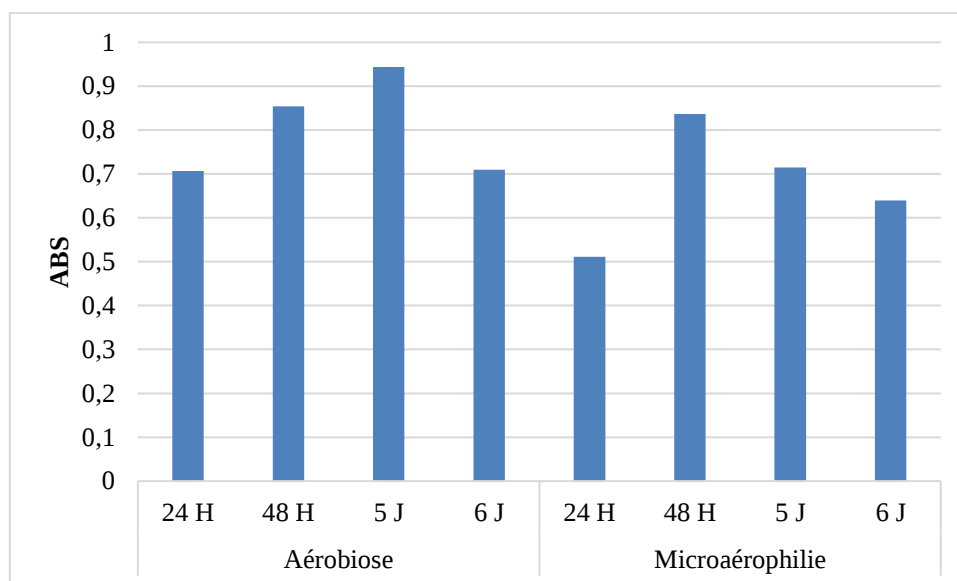


Figure N°21: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *L. monocytogenes* + *L. innocua* (suspension à 1McFarland).

II.4.4. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi espèces à concentration de 4 McFarland

II.4.4.1. Association *E. coli* + *L. innocua*

a. En aérobie

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm à 48h. Celle-ci devient moyenne aux 5^{ème} j et au 6^{ème} j d'incubation (Tableau et Figure N°22).

b. En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°22).

Partie expérimentale

Tableau N° 22: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *E. coli* + *L. innocua* (suspension à 4McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobie				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	1,936	0,641	0,34	0,118	1,812	1,65	1,78	1,747
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	M	M	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

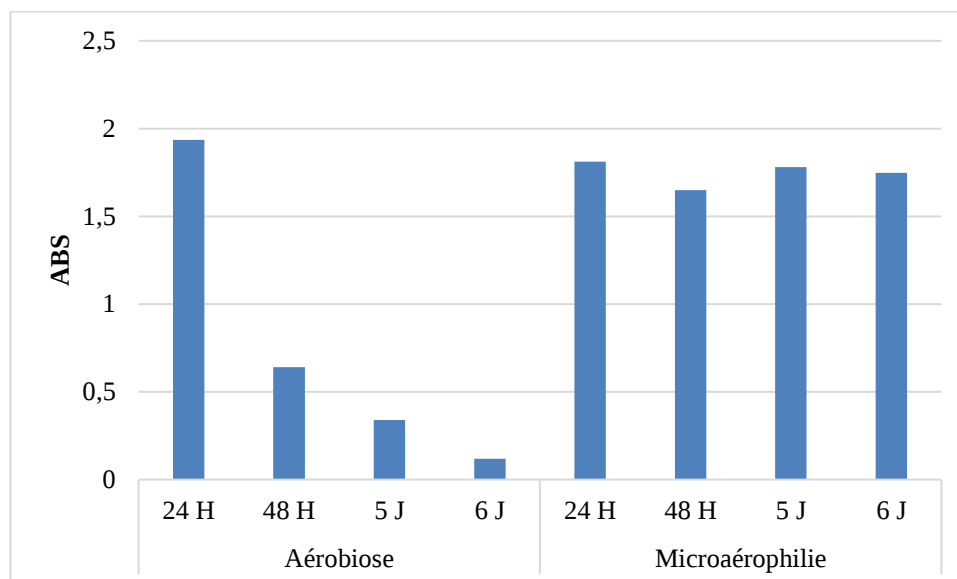


Figure N° 22: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *E. coli* + *L. innocua* (suspension à 4McFarland).

Partie expérimentale

II.4.4.2. Association *E. coli* + *L. monocytogenes*

a. En aérobiose

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivie d'une forte production de biofilm à 48h. Cette dernière devient moyenne à faible durant les deux derniers jours d'incubation (Tableau et Figure N°23).

b. En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h de culture, suivi d'une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°23).

Tableau N°23: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *E. coli* + *L. monocytogenes* (suspension à 4McFarland)

Conditions d'incubation	Aérobiose				Microaérophilie			
Durée d'incubation	24 H	48 H	5 J	6 J	24 H	48 H	5 J	6 J
Moyenne des ABS _s	1,763	1,141	0,606	0,304	1,778	1,752	1,833	1,81
ABS _{nc}	0,088							
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	M	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, ABS_s : absorbance de la solution à tester, ABS_{nc} : absorbance du témoin.

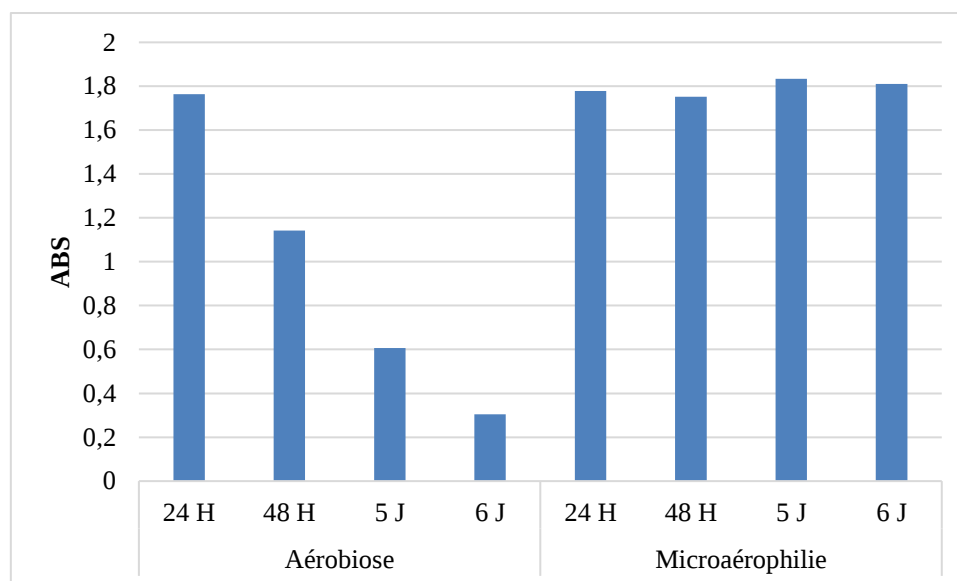


Figure N°23: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *E. coli* + *L. monocytogenes* (suspension à 4McFarland).

II.5. Résultats des tests d'adhésion et formation de biofilms sur le support en polystyrène :

II.5.1. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 1 McFarland

II.5.1.1. Biofilms à *L. innocua*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée après 24h d'incubation suivie d'une forte formation de biofilm durant toute la durée d'incubation (tableau et Figure N°24).

b) en microaérophilie

Les mêmes résultats obtenus en aérobiose ont été observés en microaérophilie (Tableau et Figure N°24).

Partie expérimentale

Tableau N°24 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L.innocua* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des DOs	0,6086	0,8618	1,0664	0,2548	0,8764	0,852
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs : densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

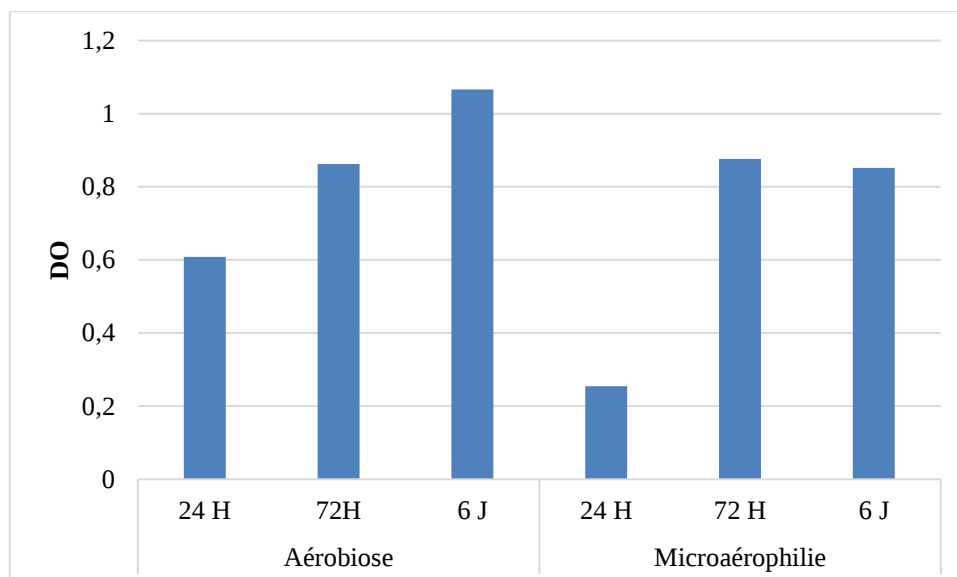


Figure N°24 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L.innocua* (suspension à 1McFarland).

II.5.1.2. Biofilm à *L. monocytogenes*

a) En aérobiose

Une adhésion moyenne à forte après 24h d'incubation a été observée suivie d'une formation moyenne à forte de biofilms à 72h et à 6j d'incubation. En fonction de la force de formation des biofilms, les résultats similaires ont été regroupés en trois catégories, ils sont résumés dans le tableau et Figure N° 25.

b) En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h d'incubation suivie d'une forte formation de biofilms à 72h et à 6j d'incubation (tableau et figure N°25).

Partie expérimentale

Tableau N°25 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L.monocytogenes*
(suspension à 1McFarland).

Groupe 1	Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
	Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
	Moyenne des DOs	1,936	0,641	0,34	1,812	1,65	1,78
	DOnc	0,046					
	Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F
Groupe 2	Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
	Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
	Moyenne des DOs	0,155	0,357	0,390	0,161	0,801	0,408
	DOnc	0,046					
	Formation du biofilm	M	F	F	M	F	F
Groupe 3	Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
	Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
	Moyenne des Dos	0,167	0,178	0,183	0,498	0,609	0,612
	DOnc	0,046					
	Formation du biofilm	M	M	M	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs : densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

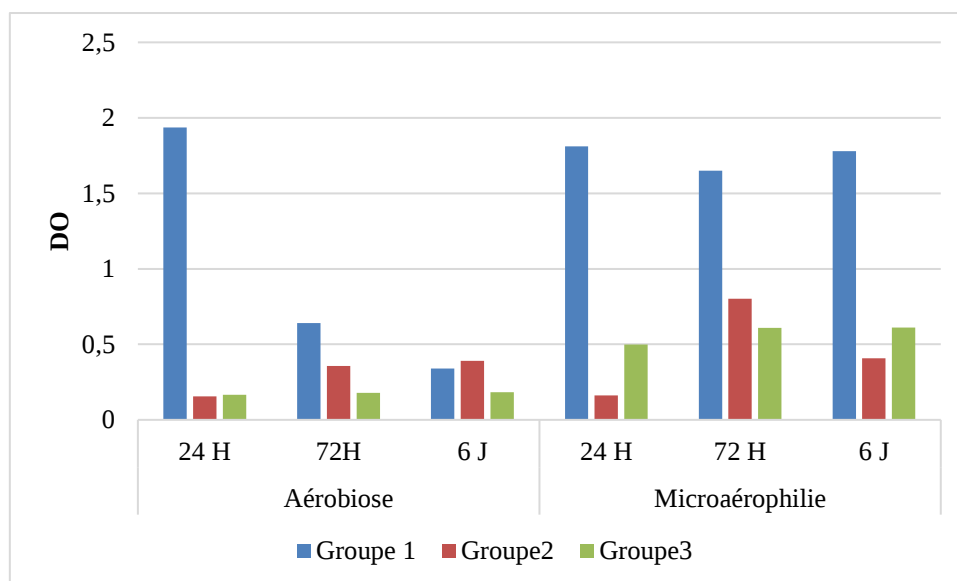


Figure N°25 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L.monocytogenes* (suspension à 1McFarland).

II.5.1.3. Biofilms à *E.coli*

a) En aérobiose

L'adhésion était forte après 24h d'incubation suivie d'une forte production de biofilm durant toute la durée d'incubation (Tableau et Figure N°26).

b) En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée après 24h d'incubation suivie d'une forte production de biofilms. Le développement d'*E. coli* était plus important en microaérophilie qu'en aérobiose $p < 0.05$ (Tableau et Figure N°26).

Tableau N°26 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E.coli* (suspension à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des DOs	0,4584	0,672	0,647	0,224	0,795	0,796
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

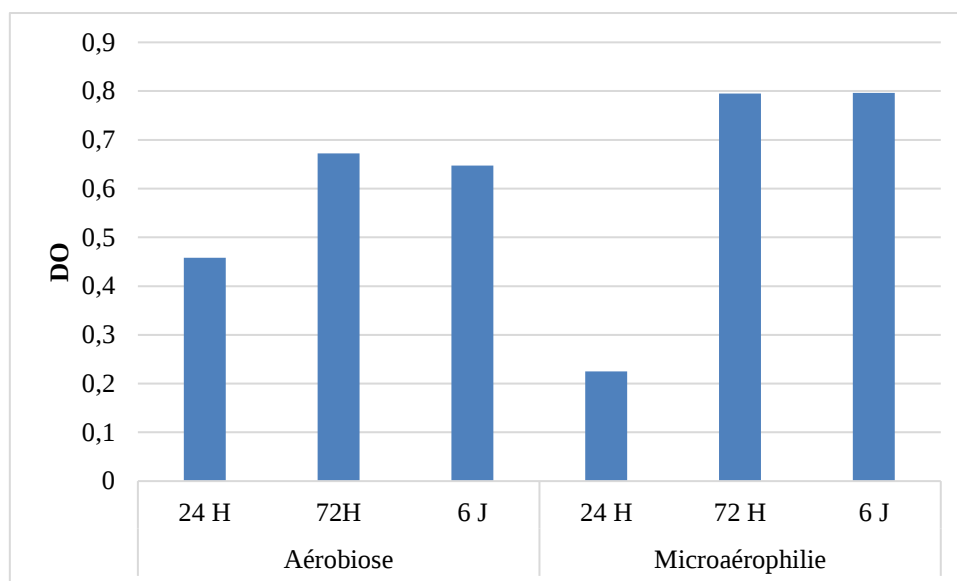


Figure N°26 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E.coli* (suspension à 1McFarland).

II.5.2. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne mono-espèce à concentration de 4 McFarland

À la concentration de 4 McFarland, toutes les suspensions bactériennes de *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *E.coli* ont montré une forte adhésion dès les premières 24h d'incubation, que ce soit en aérobiose ou en microaérophilie avec une forte formation des biofilms durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°27).

Partie expérimentale

Tableau N°27 : Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilm à *L.monocytogenes*, *L.innocua* et *E.coli* (suspensions à 4McFarland).

<i>L.m</i>	Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
	Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
	Moyenne des Dos	0,716	0,664	0,794	0,663	0,7195	0,859
	DOnc	0,046					
	Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F
<i>L.i</i>	Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
	Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
	Moyenne des DOs	0,7	0,8	1,086	0,6	0,7	0,8
	DOnc	0,046					
	Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F
<i>E.co</i> <i>li</i>	Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
	Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
	Moyenne des Dos	1,07	1,26	1,321	1,1	1,365	1,389
	DOnc	0,046					
	Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

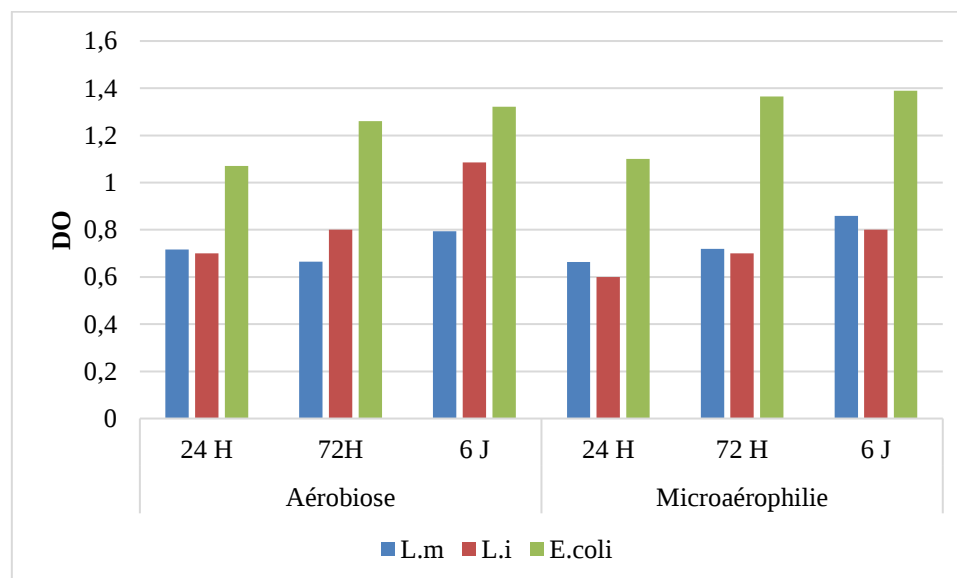


Figure N°27 : Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilm à *L.monocytogenes*, *L.innocua* et *E.coli* (suspensions à 4McFarland).

Partie expérimentale

II.5.3. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi-espèce à concentration de 1 McFarland

II.5.3.1. Association de bactéries de l'espèce *L. monocytogenes*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée dès les premières 24h d'incubation avec une forte formation de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°28).

b) En microaérophilie

L'adhésion était moyenne à 24h mais elle a évolué vers une forte formation de biofilms à 72h et à 6j d'incubation (Tableau et Figure N°28) .

Tableau N°28 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L.monocytogenes* (suspensions à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des Dos	0,309	0,536	0,730	0,183	0,294	0,476
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	M	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

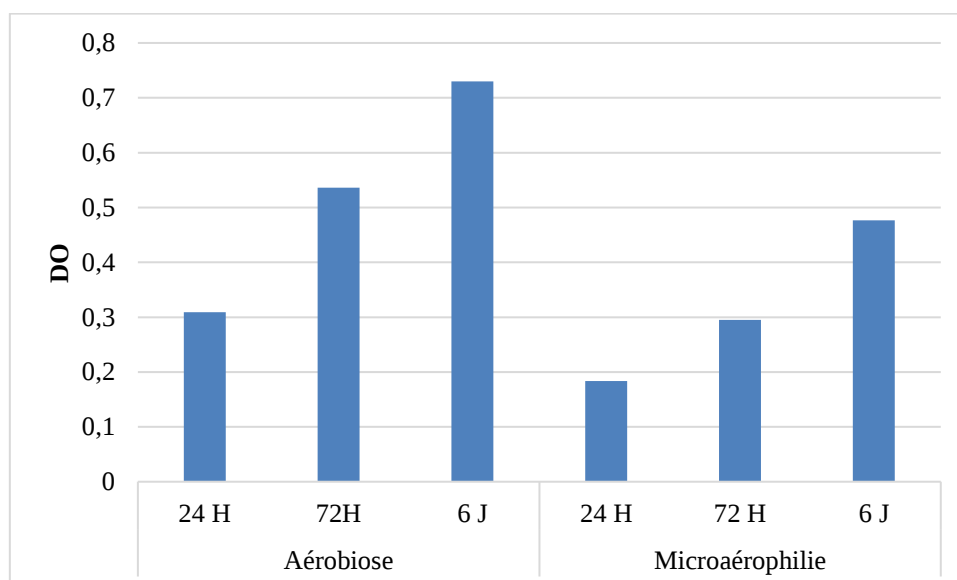


Figure N°28 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L.monocytogenes* (suspensions à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.5.3.2. Association *E. coli* + *L. monocytogenes*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée à 24h suivie d'une forte production de biofilms durant toute la durée d'incubation. (Tableau et Figure N°29).

b) En microaérophilie

Les mêmes résultats obtenus en aérobiose ont été observés en microaérophilie (Tableau et Figure N°29).

Tableau N°29 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E.coli*+
L.monocytogenes (suspensions à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des Dos	0,648	0,6775	0,898	0,493	0,495	0,471
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

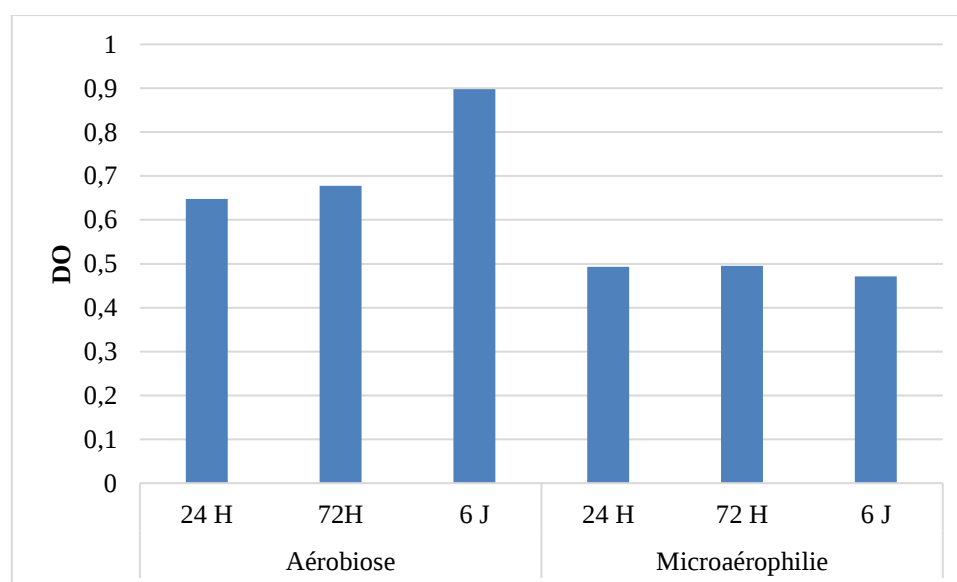


Figure N°29 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E.coli* + *L. monocytogenes* (suspensions à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.5.3.3. Association *E. coli* + *L. innocua*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée dès les premières 24h avec une formation importante de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°30).

b) En microaérophilie

L'adhésion était forte après 24h d'incubation, elle a conduit à une forte formation de biofilms durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°30).

Tableau N°30 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E.coli* + *L. innocua* (suspensions à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des DOs	0,543	0,72	0,945	0,254	0,868	0,829
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

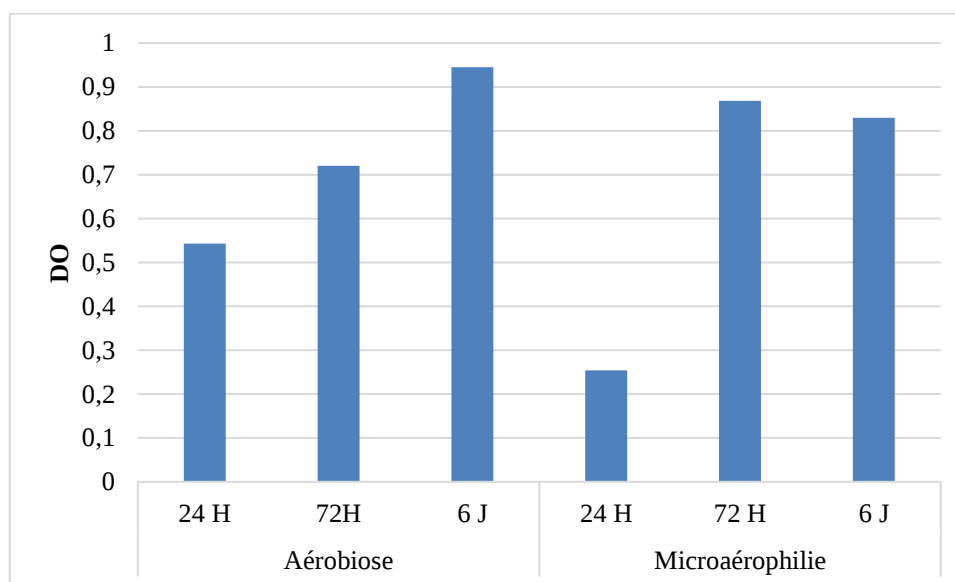


Figure N°30 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E.coli*+ *L.innocua* (suspensions à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.5.3.4. Association *E. coli* + *L. monocytogenes* + *L. innocua*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée dès les premières 24h avec une formation importante de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°31).

b) En microaérophilie

L'adhésion était forte après 24h d'incubation, elle a conduit à une forte formation de biofilms durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°31).

Tableau N°31 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E. coli* + *L. monocytogenes* + *L. innocua* (suspensions à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des Dos	0,617	0,794	0,984	0,33	0,666	0,633
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

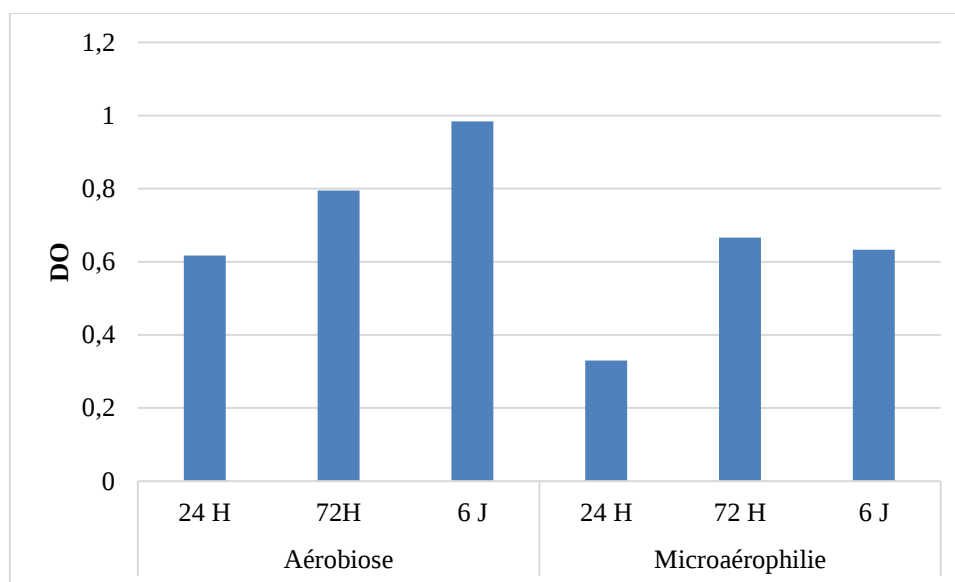


Figure N°31 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *E. coli* + *L. monocytogenes* + *L. innocua* (suspensions à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.5.3.5. Association *L. monocytogenes* + *L. innocua*

a) En aérobiose

Une forte adhésion a été observée dès les premières 24h avec une formation importante de biofilm durant toute la période d'incubation (Tableau et Figure N°32).

b) En microaérophilie

Une forte adhésion a été observée à 24 h suivi d'une production moyenne de biofilm à 72h et une forte production à 6j d'incubation (Tableau et Figure N°32).

Tableau N°32 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L. monocytogenes* + *L. innocua* (suspensions à 1McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des Dos	0,341	0,478	0,785	0,206	0,183	0,496
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	M	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

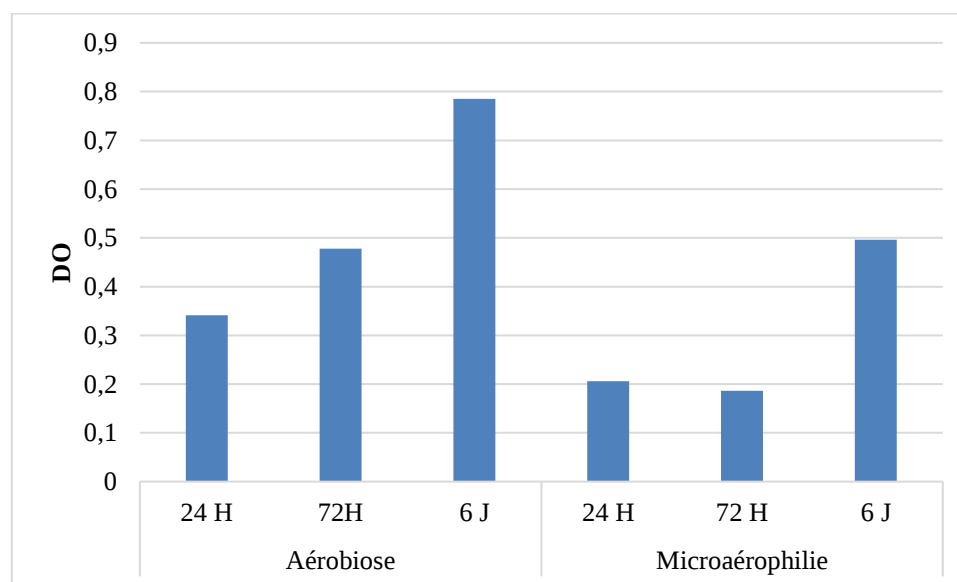


Figure N°32 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm à *L. monocytogenes* + *L. innocua* (suspensions à 1McFarland).

Partie expérimentale

II.5.4. Formation de biofilm à partir de suspension bactérienne multi espèces à concentration de 4 McFarland

Toutes les associations bactériennes testées à 4 McFarland ont montré une forte adhésion dès les premières 24h d'incubation avec une formation importante de biofilm en aérobiose et en microaérophilie (Tableau et Figure N°33, tableau N°27).

Tableau N°33 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi espèces
(suspensions à 4McFarland).

Conditions d'incubation	Aérobiose			Microaérophilie		
Durée d'incubation	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Moyenne des Dos						
<i>L.m + E.coli</i>	1,07	1,26	1,321	1,1	1,365	1,389
<i>L.i + E.coli</i>	1,127	0,963	1,316	0,823	0,869	0,873
DOnc	0,046					
Estimation de la formation du biofilm	F	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms, DOs :densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

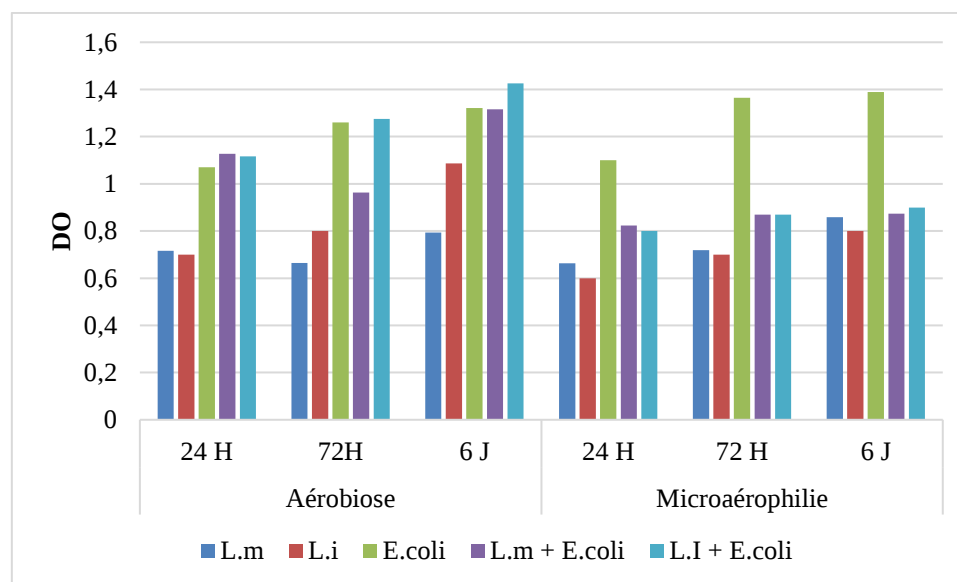


Figure N°33 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi espèces
(suspensions à 4McFarland).

Partie expérimentale

II.6. Effet du séro groupe sur la capacité de *L. monocytogenes* à former des biofilms

a) Formation des biofilms mono espèce

A la concentration de 1 McFarland et en aérobiose, toutes les souches de *L. monocytogenes* sérogroupées ont montré une forte adhésion après 24h d'incubation et une formation de biofilm à 72h, à l'exception de la souche *L.m* 038 (IIa) qui a montré une adhésion moyenne après 24h, puis une forte production de biofilm après 72h, et *L.m* 036 (IIb) qui a montré une adhésion moyenne après 24h et une production moyenne de biofilm à 72h et à 6 jours (Tableau et Figure N°34 et Tableau N°35).

En microaérophilie, toutes les souches de *L. monocytogenes* et de *L. innocua* testées ont montré une adhésion moyenne après 24 h d'incubation, suivie d'une forte production de biofilm après 72h, à l'exception de la souche *L.m* 036 (IIb) qui a montré une forte adhésion dès les premières 24h (Tableau et Figure N°34).

Tableau N°34 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm des souches sérogroupées de *L. monocytogenes* (suspensions à 1 McFarland).

Souche	Aérobiose			Microaérophilie		
	24h	72h	6 j	24h	72h	6 j
<i>L.m</i> 023	0,560	0,860	1,042	0,129	0,907	0,855
<i>L.m</i> 026	0,329	0,544	0,822	0,193	0,155	0,502
<i>L.m</i> 036	0,380	0,267	0,229	0,498	0,609	0,612
<i>L.m</i> 038	0,155	0,357	0,390	0,161	0,389	0,408
<i>L.m</i> 043	0,310	0,558	0,727	0,107	0,408	0,431
<i>L.m</i> 055	0,261	0,745	0,909	0,124	0,364	0,360
<i>L.i</i>	0,608	0,861	1,066	0,254	0,876	0,852
DOnc	0,046					

DOnc : densité optique du témoin.

Tableau N°35 : Estimation de la force d'adhésion et de formation des biofilms des souches sérogroupées de *L. monocytogenes* (suspensions à 1 Mcfarland).

	<i>L. monocytogenes</i>								
Souches	023 / 026 / 043 / 055			038			036		
Sérogroupe	IIa			IIa			IIb		
Durée d'incubation	24h	72h	6J	24h	72h	6J	24h	72h	6J
Incubation en aérobiose	F	F	F	M	F	F	M	M	M
Incubation en microaérophilie	M	F	F	M	F	F	F	F	F

F : forte formation des biofilms, M : moyenne formation des biofilms.

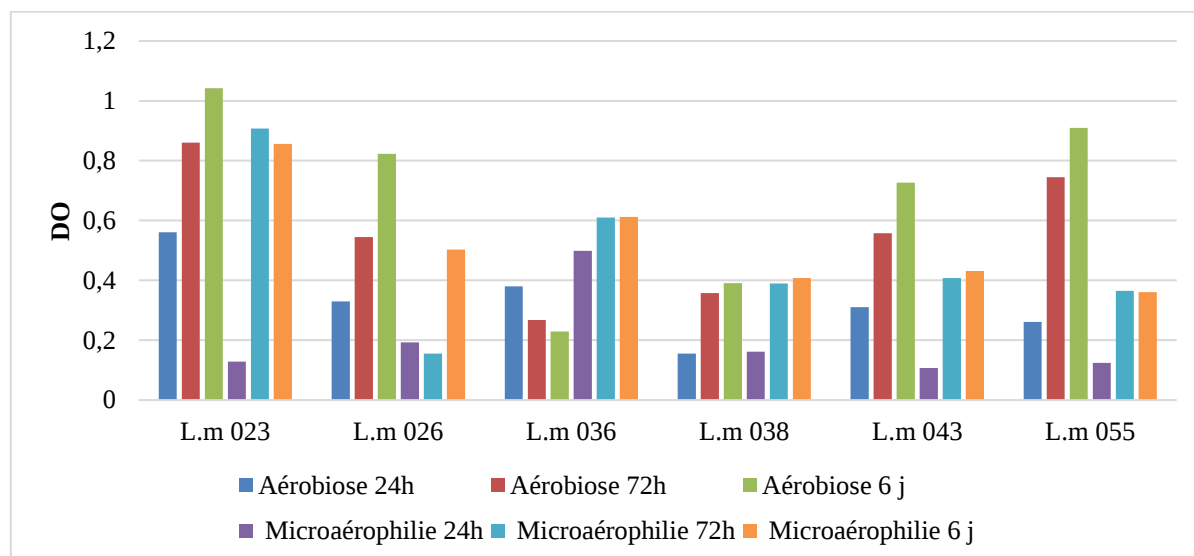


Figure N°34 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm des souches sérotypées de *L. monocytogenes* (suspensions à 1 McFarland).

b) Formation des biofilms multi souches et multi espèces

En aérobiose, toutes les associations de souches testées à 1 McFarland ont montré une forte adhésion dès les premières 24h d'incubation avec une formation importante de biofilm durant toute la période d'incubation.

En microaérophilie, l'adhésion était forte à 24h pour toutes les associations de souches à l'exception de l'association *L.m* 038+ *L.m* 026 +*L.m* 043 (*L.m*/IIa) qui a montré une adhésion moyenne après 24h d'incubation mais une forte production de biofilm durant toute la période d'incubation ; et l'association *L.m* 023 + *L.m* 026 + *L.i* (*L.m*/IIa + *L.i*) qui a montré une adhésion moyenne et une production moyenne de biofilm après 72h qui devient forte à 6j d'incubation.

Toutes les associations de souches bactériennes testées à 4 McFarland ont montré une forte adhésion dès les premières 24h d'incubation avec une formation importante de biofilm en aérobiose et en microaérophilie (Tableau N° 36 et Figure N°35).

Partie expérimentale

Tableau N°36 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi souches et multi espèces (suspensions à 1 et 4 McFarland)

Souche	Aérobiose			Microaérophilie		
	24 H	72H	6 J	24 H	72 H	6 J
Suspensions à 1 McFarland						
<i>L.m/ Ila</i>	0,298	0,591	0,772	0,161	0,436	0,451
<i>L.m/ Ila + L.i</i>	0,341	0,478	0,785	0,206	0,186	0,496
<i>L.m/ I Ib + L.i</i>	0,586	0,63	0,883	0,397	0,374	0,369
<i>L.m/ Ila + E.coli</i>	0,673	0,71	0,919	0,467	0,427	0,386
<i>L.m/ I Ib + E.coli</i>	0,623	0,645	0,877	0,519	0,563	0,556
<i>L.m/ Ila+L.i + E.coli</i>	0,596	0,79	1	0,281	0,948	0,898
<i>L.m/ I Ib+L.i + E.coli</i>	0,639	0,799	0,968	0,379	0,384	0,368
Suspensions à 4 McFarland						
<i>L.m/ Ila</i>	0,789	0,876	1,045	0,678	0,765	0,897
<i>L.m/ I Ib</i>	0,644	0,453	0,543	0,649	0,674	0,821
<i>L.m/ Ila + E.coli</i>	1,036	1,179	1,288	0,8	0,882	0,87
<i>L.m/ I Ib + E.coli</i>	1,218	0,7482	1,345	0,846	0,856	0,876
DOnc	0,046					

DOnc : densité optique du témoin.

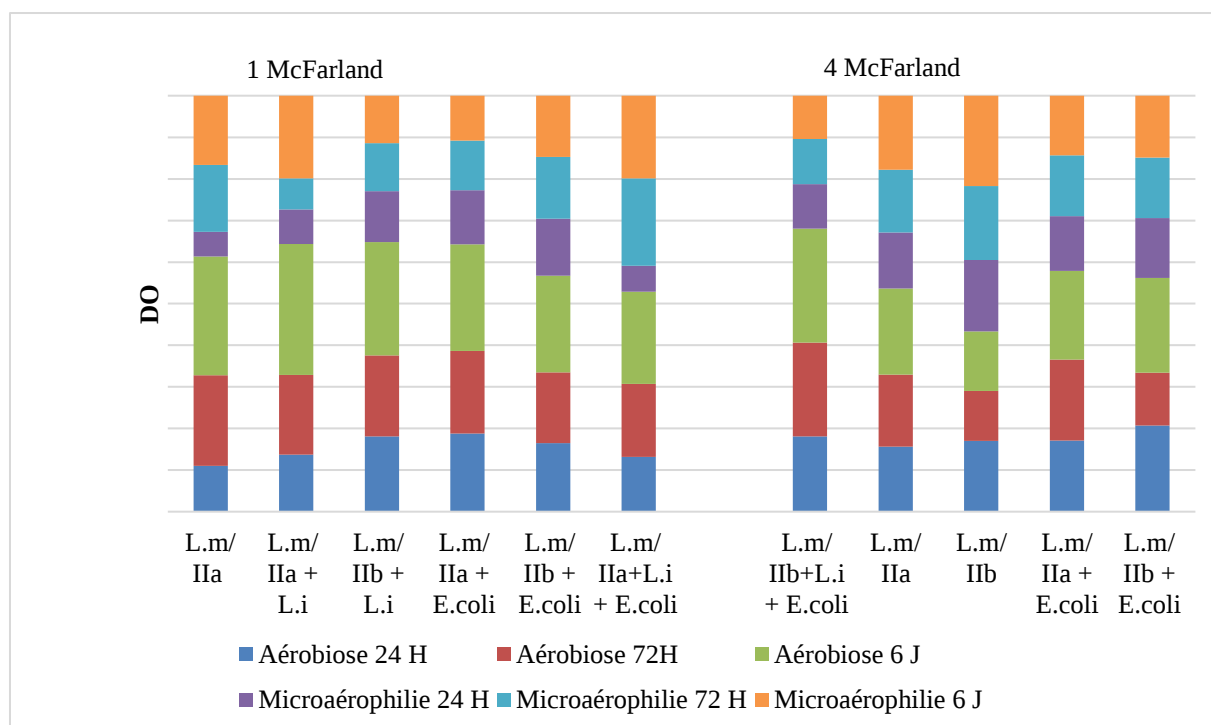


Figure N°35 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm multi souches et multi espèces (suspensions à 1 et 4 McFarland).

II.7. Effet du renouvellement du milieu de culture

Le renouvellement du milieu de culture a été réalisé uniquement sur le support en polystyrène et sur les suspensions à 1 McFarland de toutes les solutions testées. Il a engendré un développement plus important des biofilms que ce soit en aérobiose ou en microaérophilie.

Les mesures de la DO des suspensions à 72h d'incubation avec renouvellement du milieu de culture ont donné des résultats proches de ceux obtenus avec les mêmes suspensions au bout de 6 jours d'incubation sans renouvellement du milieu de culture (Tableau N°37 figure N°36).

Partie expérimentale

Tableau N°37 : Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilms après renouvellement du milieu de culture.

Aérobiose					Microaérophilie			
	24h	72h	72h+RM C	6 J	24h	72h	72h+RM C	6J
DOs biofilms mono espèce	0,285	0,651	1,052	0,818	0,115 9	0,386	0,774	0,3962
DOs des biofilms multi espèces	0,271	0,553	0,963	0,675	0,168 8	0,428	0,943	0,4334

RMC : renouvellement du milieu de culture, DOs : densité optique de la solution à tester, DOnc : densité optique du témoin.

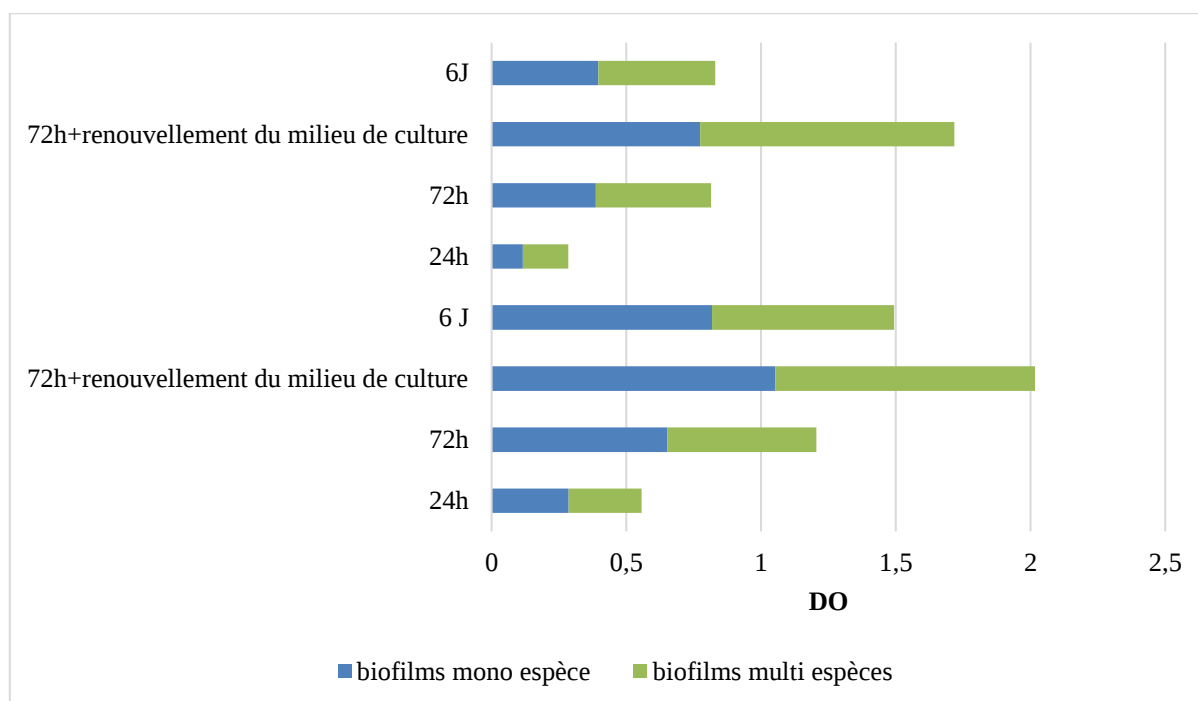


Figure N°36 : Résultats des tests d'adhésion et de formation des biofilms après renouvellement du milieu de culture

Partie expérimentale

II.8. Effet de la durée d'incubation

Les mesures de les DOs et des ABSs des isolats, souches et des différentes associations de *Listeria* testées à 24h, 72h et à 6jours ont permis de constater que le développement des biofilms augmentait durant les premières 72h, pour se stabiliser par la suite durant les 72h qui suivent. Les résultats des mesures de la DO après 6 jours d'incubation des autres solutions testées ont montré une différence significative par rapport à celles obtenues après 72h d'incubation pour ($p < 0,05$) (Figure N°37).

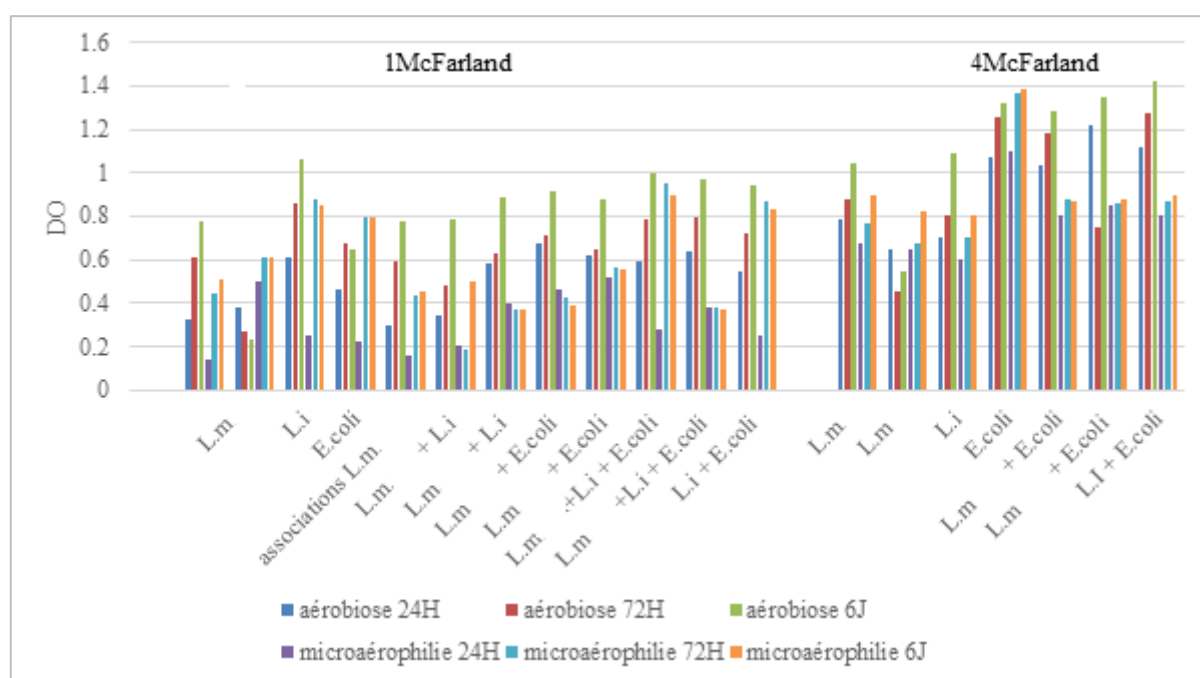


Figure N°37 : Effet de la durée d'incubation sur la formation des biofilms.

II.9. Sensibilité des bactéries formant les biofilms aux biocides

Les tests de sensibilité aux biocides ont été réalisés sur les biofilms formés par les souches et les associations de souches de *L.m*, les isolats de *L.i* et *E.coli* et différentes associations entre les souches et les isolats.

II.9.1. Tests réalisés sur les biofilms mono espèce

II.9.1.1. Biofilms à *L. monocytogenes*

Les souches phénotypiquement caractérisées ont été testées.

a) Souches appartenant au séro groupe IIa

- **Souche 023** : Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de la souche testée sont rapportés dans le tableau N°38 et la figure N°38.

Partie expérimentale

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 80 % de réduction des biofilms en utilisant les solutions de DA, DDAL et DDAC ;

✚ Plus de 60% de réduction des biofilms en utilisant le NaClO.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 60% de réduction des biofilms en utilisant les solutions de DDAL, DDAC et le NaClO ;

✚ Plus de 40% de des biofilms réduction en utilisant le DA.

Les résultats de l'étude montrent que cette souche est sensible aux biocides testés. Les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en condition d'aérobiose utilisant l'amine et le détergent alcalin couplé à l'AMQ. En microaérophilie, les détergents alcalins et acides couplés à l'AMQ étaient les plus efficaces suivis de l'eau de javel.

Remarque : toutes les figures qui suivent représentent à la fois les biofilms avant et après réduction obtenue par le biocide.

Tableau N°38 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 023 après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DA 1%	96,00%	DDAL2%	69,00%
DDAL 2%	93,90%	DDAC3%	64,80%
DA 0,5%	93,20%	NaClO 2%	64,20%
DDAC3%	89,60%	DDAL 1%	63,50%
DDAL1%	86,30%	DDAC1%	56,20%
DDAC1%	71,80%	NaClO 1%	54,40%
NaClO 2%	60,50%	DA1%	46,10%
NaClO 1%	45,60%	DA 0,5%	44,40%

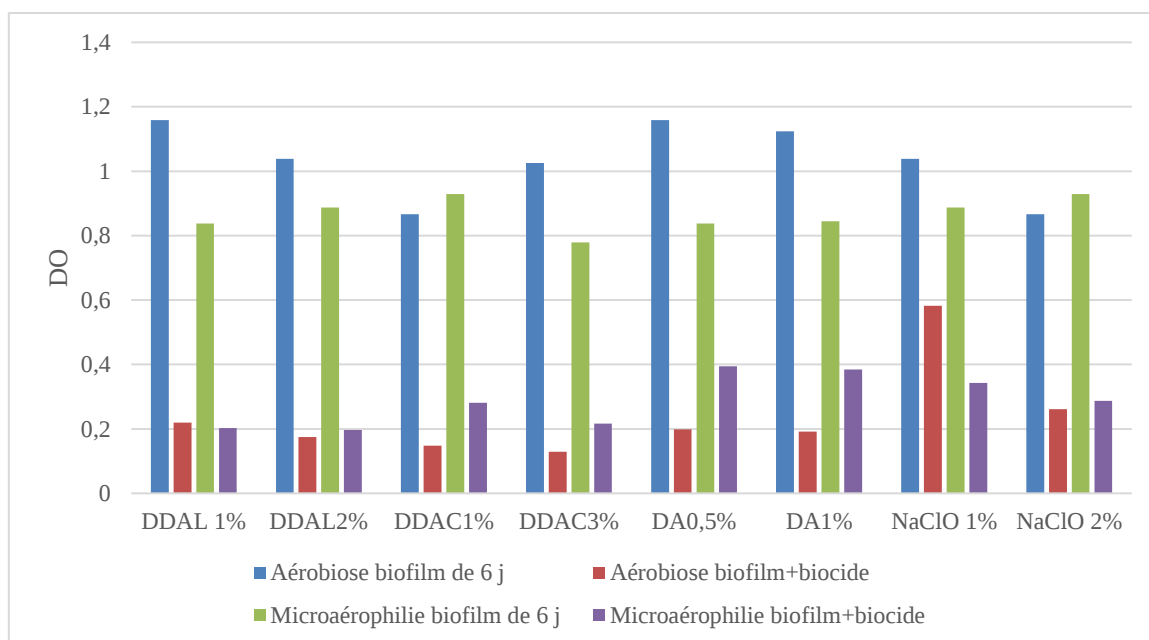


Figure N°38 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 023 après ajout des différents biocides.

- **Souche 026**

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de la souche testée sont rapportés dans le tableau N°39 et la figure N°39.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 60 % de réduction des biofilms en utilisant les solutions de DDAC, DA et NaClO ;

- ✚ Plus de 50% de réduction des biofilms en utilisant le DDAL.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 15% de réduction des biofilms en utilisant les solutions de DDAC, DA et le NaClO ;

- ✚ Plus de 10% de réduction des biofilms en utilisant le DDAL.

Les résultats obtenus montrent que cette souche est sensible aux biocides testés. Les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en condition d'aérobiose utilisant le détergent acide couplé à l'AMQ. En microaérophilie, les pourcentages de réduction des biofilms étaient faibles en comparaison avec les pourcentages obtenus en aérobiose. Le meilleur

Partie expérimentale

pourcentage de réduction ne dépasse pas le 26,2%, il a été obtenu en utilisant le détergent acide couplé à l'AMQ.

Tableau N°39 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 026 après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAC 3%	74,20%	DDAC 3%	26,20%
DA1%	73,50%	DA1%	18,60%
NaClO 2%	69,80%	NaClO 2%	16,90%
NaClO 1%	64,80%	DDAC 1%	16,50%
DDAL 2%	58,60%	DA0,5%	15,40%
DA 0,5%	55,70%	NaClO 1%	14,80%
DDAC 1%	53,00%	DDAL 2%	13,50%
DDAL 1%	49,30%	DDAL 1%	5,00%

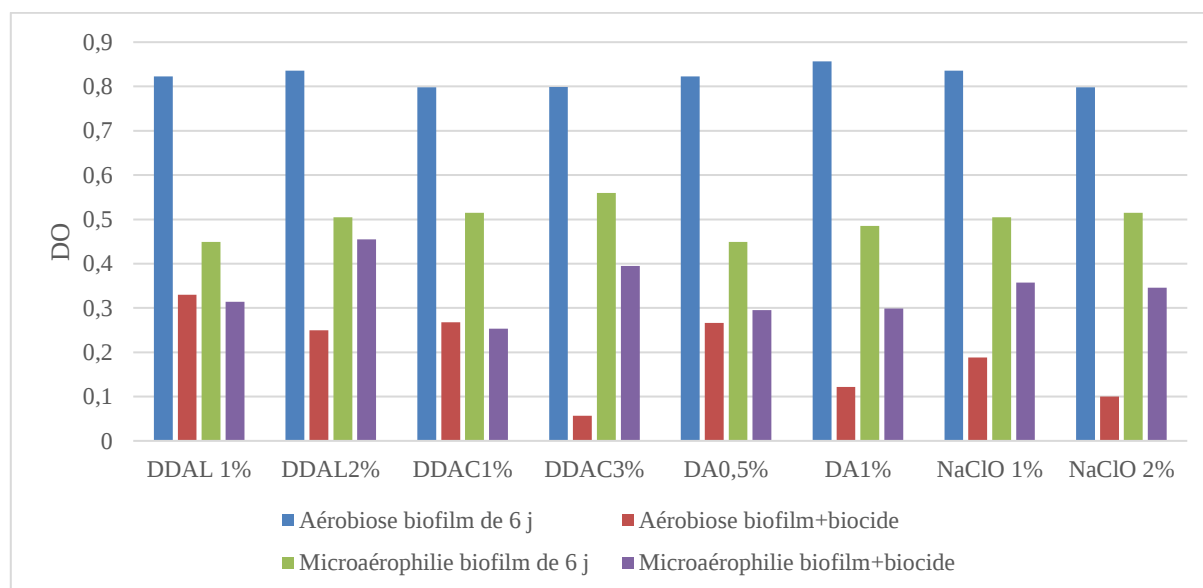


Figure N°39 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 026 après ajout des différents biocides.

Partie expérimentale

- **Souche 038**

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de la souche testée sont rapportés dans le tableau N°40 et la figure N°40.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 20 % de réduction des biofilms en utilisant les solutions de DDAL, NaClO et DA.

Le DDAC aux deux concentrations testées ainsi que le DDAL à 1% étaient inefficaces sur les biofilms.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 30% de réduction des biofilms en utilisant le NaClO et le DDAL ;

- ✚ Plus de 5% de réduction des biofilms en utilisant le DA et le DDAC.

Le DA à la concentration de 0,5% était inefficace sur les biofilms.

Les résultats montrent que la sensibilité de la souche dépend du biocide utilisé. Les pourcentages de réduction dans les deux conditions d'incubation étaient relativement faibles. Les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant le détergent alcalin couplé à l'AMQ et l'eau de javel. En condition d'aérobiose, les concentrations les plus faibles de l'amine et du DDAL ainsi que les deux concentrations testées du DDAC n'ont eu aucune efficacité sur les biofilms. En microaérophilie, les pourcentages de réduction des biofilms étaient encore plus faibles avec des pourcentages de réductions inférieurs à 10% pour le DDAC et l'amine qui était carrément inefficace à 0,5%.

Partie expérimentale

Tableau N°40 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 038 après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAL 2%	32,60%	NaClO 2%	34,30%
NaClO 2%	29,40%	DDAL 2%	31,40%
DA 1%	28,30%	NaClO 1%	16,90%
NaClO 1%	26,20%	DDAL 1%	12,00%
DA 0,5%	-0,80%	DDAC 3%	9,30%
DDAL 1%	-5,70%	DA 1%	6,20%
DDAC 3%	-6,40%	DDAC 1%	5,40%
DDAC 1%	-25,40%	DA 0,5%	-8,30%

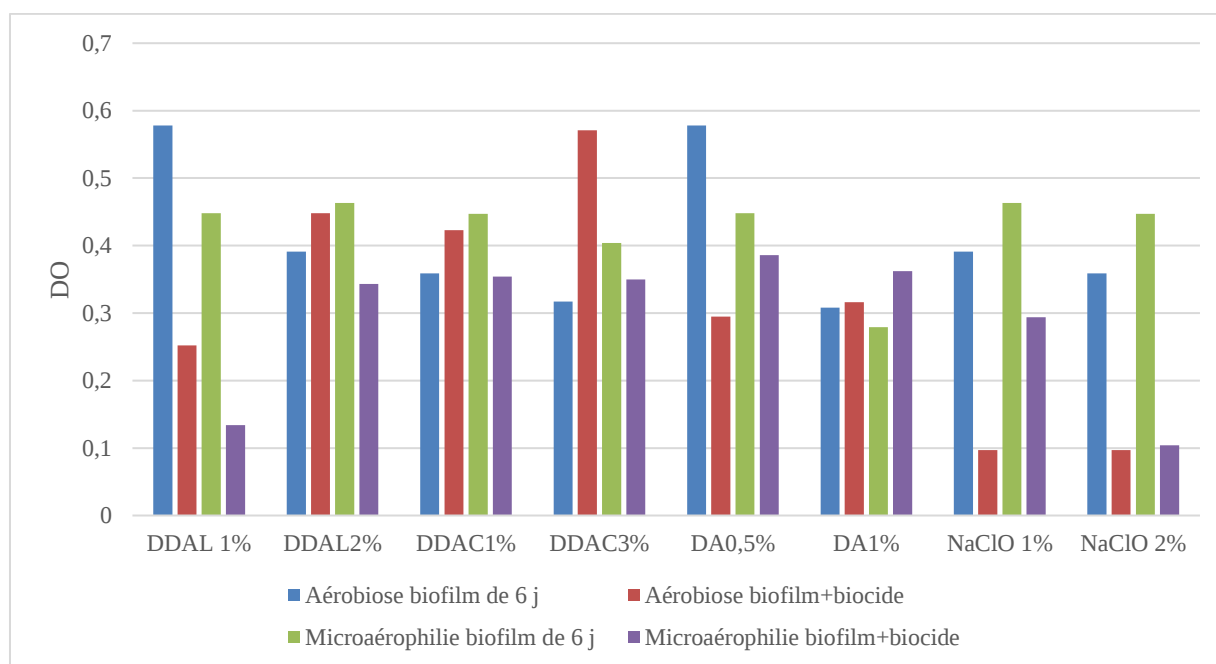


Figure N°40 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 038 après ajout des différents biocides.

- Souche 043**

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de la souche testée sont rapportés dans le tableau N°41 et la figure N°41.

Partie expérimentale

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 60 % de réduction en utilisant les solutions de NaClO, DDAC et DA ;
- ✚ Plus de 50% de réduction en utilisant le DDAL.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 30% de réduction en utilisant les solutions de DA, DDAL, DDAC ; et le;
- ✚ Plus de 5% de réduction en utilisant le NaClO.

Le DDAL à la concentration de 1% et le NaClO à la concentration de 1% ont été inefficaces sur les biofilms.

Les résultats montrent que la sensibilité de la souche dépend du biocide utilisé et des conditions d'incubation. Les pourcentages de réduction dans les conditions d'aérobiose ont dépassé les 59% pour tous les biocides testés. En microaérophilie, le pourcentage de réduction était moyen. Les concentrations les plus basses du DDAL et de l'eau de javel n'ont eu aucun effet sur les biofilms.

Tableau N°41 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 043 après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
NaClO 2%	77,20%	DA 1%	40,20%
DDAC 3%	64,30%	DDAL 2%	31,70%
DA 1%	64,20%	DDAC 3%	23,30%
DA 0,5%	63,00%	DA 0,5%	17,30%
DDAC 1%	60,80%	NaClO 2%	5,60%
DDAL 2%	60,50%	DDAC1%	0,30%
DDAL 1%	59,70%	NaClO 1%	-2,90%
NaClO 1%	59,50%	DDAL1%	-22,80%

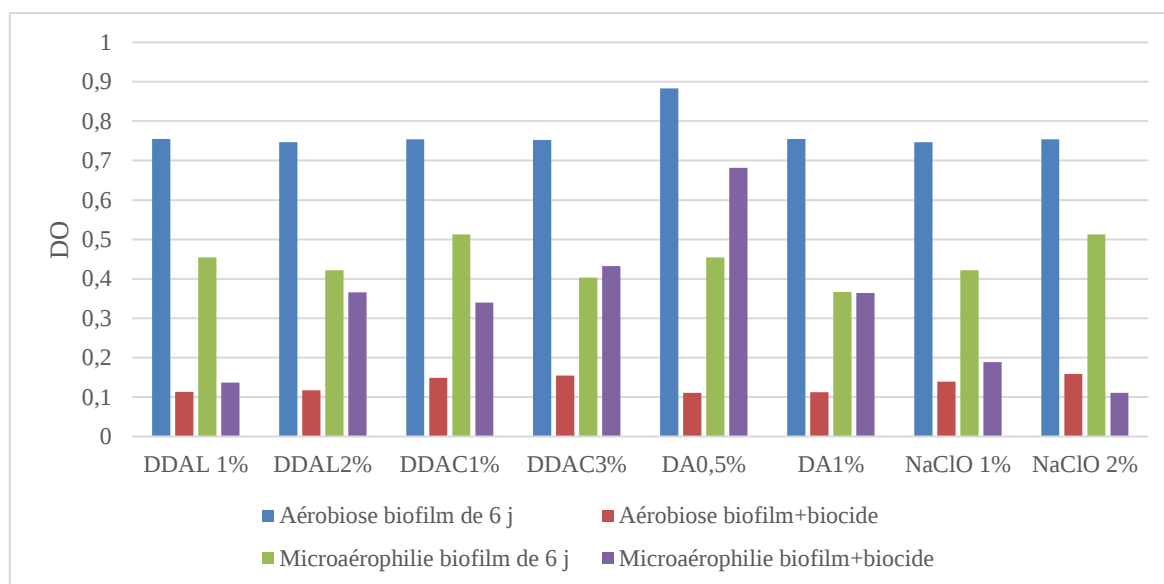


Figure N°41 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 043 après ajout des différents biocides.

• Souche 055

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de la souche testée sont rapportés dans le tableau N°42 et la figure N°42.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- + 100% de réduction en utilisant : DA ;
- + Plus de 60% de réduction en utilisant le NaClO et le DDAC ;
- + Plus de 50% de réduction en utilisant le DDAL.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- + Plus de 20% de réduction en utilisant les solutions de NaClO, DA, DDAL et DDAC.

Les résultats montrent que la sensibilité de la souche dépend du biocide utilisé et des conditions d'incubation. Les pourcentages de réduction en aérobiose variaient entre très forts (100% de réduction) à moyen (44,6% de réduction). Les molécules les plus efficaces étaient l'amine et l'eau de javel suivies par le DDAL. Dans les conditions de microaérophilie, le pourcentage de réduction des biofilms était faible (entre 18 à 28%) dans les deux conditions d'incubation étaient relativement faibles. Les molécules les plus efficaces étaient les même que celles observées en aérobiose, à savoir, l'amine et l'eau de javel.

Partie expérimentale

Tableau N° 42: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 055 après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DA1%	100%	NaClO 2%	27,50%
NaClO 2%	76,90%	DA 1%	27,30%
DDAC 3%	75,10%	NaClO 1%	26,70%
DA 0,5%	64,50%	DDAL 2%	26,20%
NaClO 1%	62,80%	DDAC 3%	26,00%
DDAC 1%	61,60%	DDAL 1%	23,20%
DDAL 2%	50,20%	DA 0,5%	21,10%
DDAL 1%	44,60%	DDAC 1%	18,50%

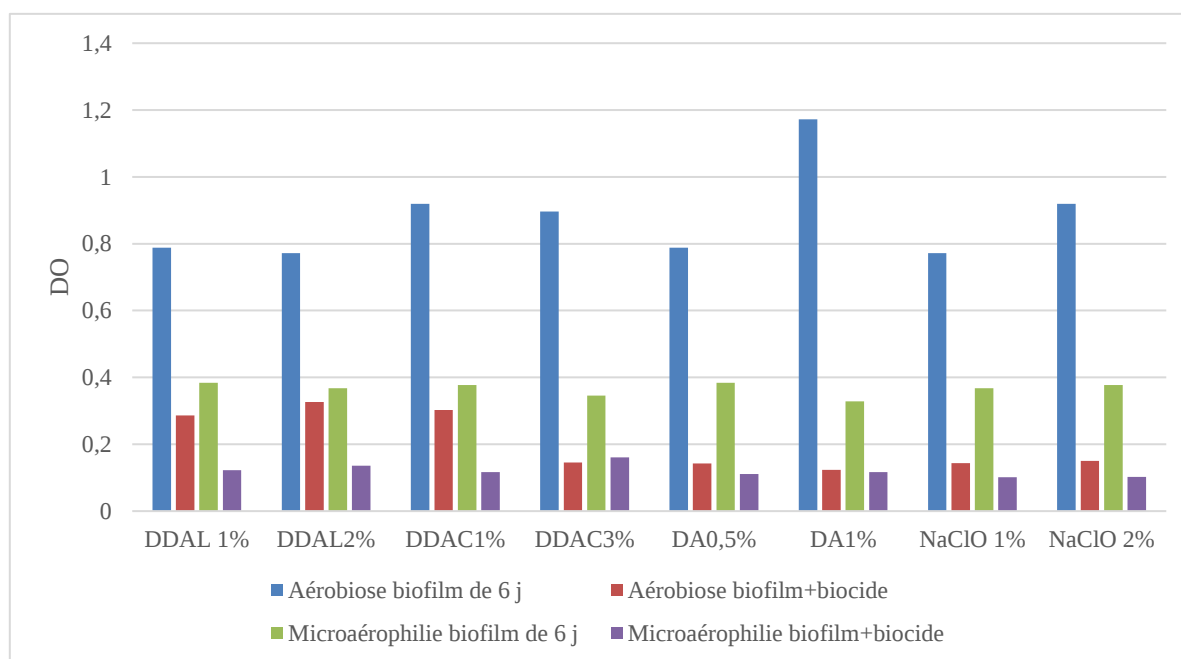


Figure N°42 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 055 après ajout des différents biocides.

b) Souche appartenant au sérogroupe IIb

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de la souche testée sont rapportés dans le tableau N°43 et la figure N°43.

Partie expérimentale

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- + Plus de 10 % de réduction en utilisant : DA et le NaClO ;
- + Plus de 5% de réduction en utilisant le DDAC et le DDAL.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- + Plus de 40% de réduction en utilisant les solutions de NaClO, DDAL et DA ;
- + Plus de 5% de réduction en utilisant le DDAC.

Les résultats montrent que la sensibilité de la souche I1b dépend plus des conditions d'incubation que du biocide utilisé.

Les pourcentages de réduction variaient entre moyens (microaérophilie) et faibles (aérobiose) avec l'amine et l'eau de javel comme molécules les plus efficaces.

Tableau N° 43: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 036 après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DA1%	22,20%	NaClO 2%	50,90%
NaClO 2%	10,20%	DDAL 2%	48,90%
NaClO 1%	8,10%	DA 1%	40,90%
DDAC 3%	7,80%	NaClO 1%	39,80%
DDAC 1%	7,60%	DDAC 3%	36,80%
DDAL2%	5,60%	DDAL 1%	34,80%
DA 0,5%	1,20%	DDAC1%	30,50%
DDAL 1%	-1,50%	DA 0,5%	23,30%

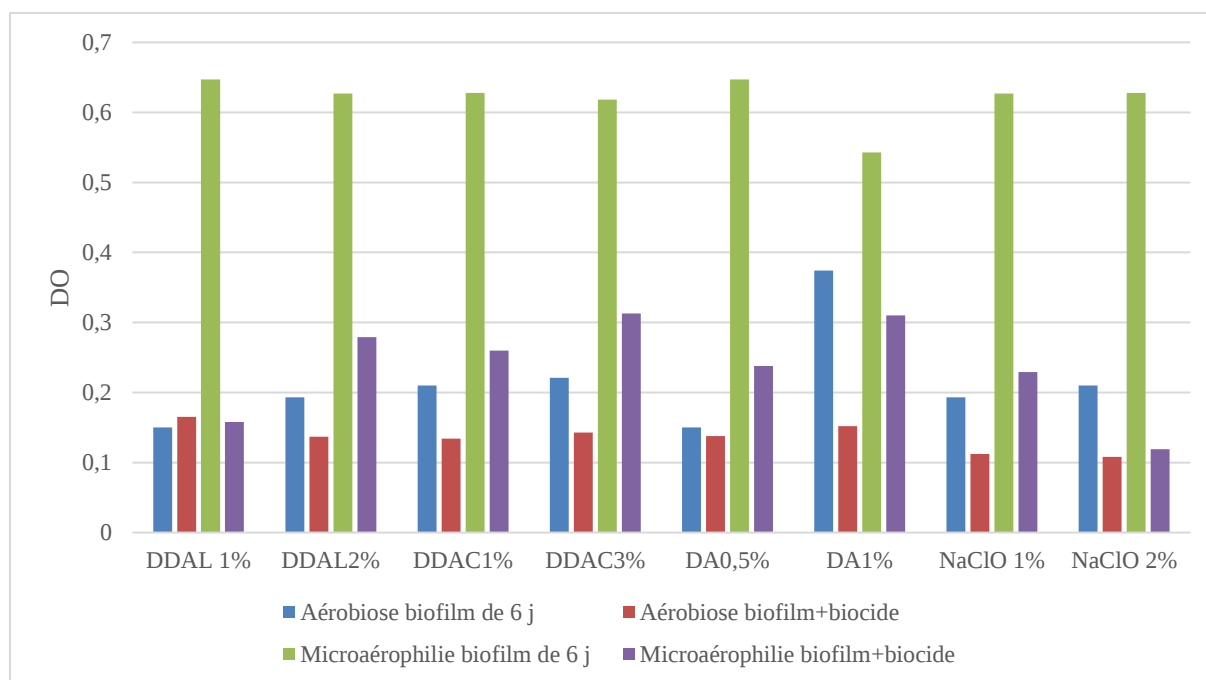


Figure N°43 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par la souche 036 après ajout des différents biocides.

II.9.1.2. Biofilms à *L. innocua*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'isolat testé sont rapportés dans le tableau N°44 et la figure N°44.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 90 % de réduction en utilisant les solutions de DDAL, DDAC et DA ;
- ✚ Plus de 80% de réduction en utilisant le NaClO.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 50% de réduction en utilisant les solutions DDAL et NaClO ;
- ✚ Plus de 40% de réduction en utilisant le DDAC et le DA.

Les résultats montrent que *L.i* était particulièrement sensible aux biocides avec des pourcentages de réduction supérieurs à 80% pour toutes les molécules testées en aérobiose et des pourcentages dépassant les 40% en microaérophilie. La molécule la plus efficace dans les deux conditions d'incubation est l'eau de javel.

Partie expérimentale

Tableau N°44 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par *L.innocua* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAL 2%	99,70%	DDAL 2%	61,80%
DD AC3%	94,40%	NaClO 2%	61,80%
DA 1%	90,80%	NaClO 1%	52,30%
NaClO 2%	87,10%	DDAC 3%	49,00%
DDAL 1%	84,40%	DDAC 1%	48,40%
DDAC 1%	83,80%	DDAL 1%	47,60%
NaClO 1%	82,20%	DA 1%	45,40%
DA 0,5%	71,90%	DA 0,5%	44,00%

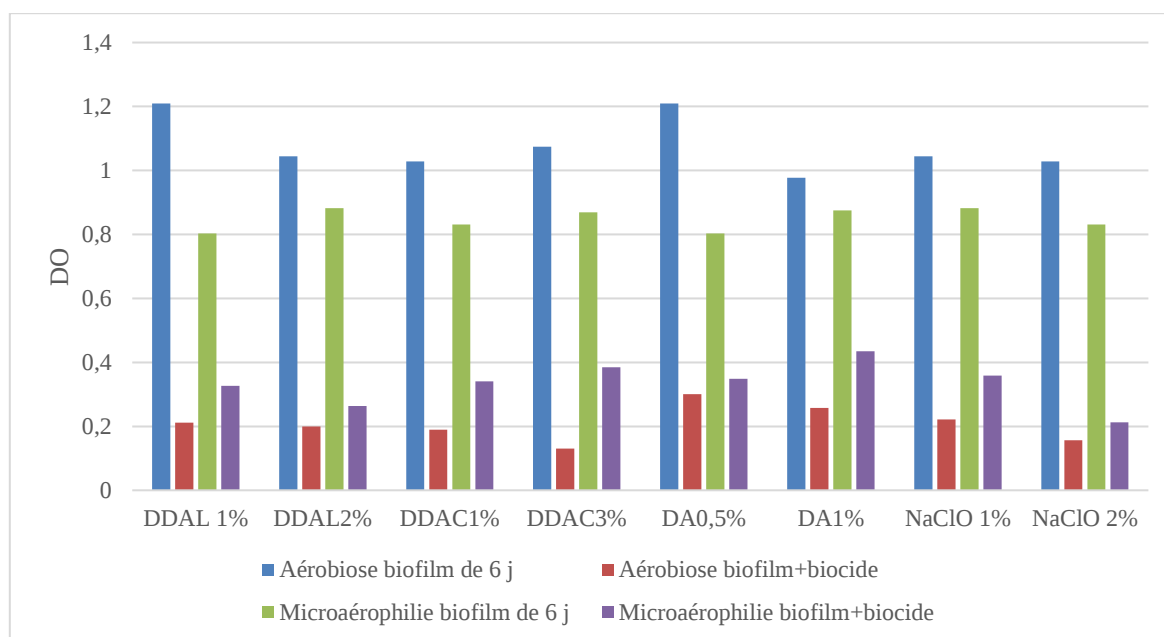


Figure N°44 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par *L.innocua* après ajout des différents biocides.

II.9.1.3. Biofilms à *E.coli*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'isolat testé sont rapportés dans le tableau N°45 et la figure N°45.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

Partie expérimentale

- ✚ Plus de 50 % de réduction en utilisant les solutions de NaClO, DA et DDAC ;
- ✚ Plus de 40% de réduction en utilisant le DDAL.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 60% de réduction en utilisant les solutions de DDAC, DDAL et NaClO ;
- ✚ Plus de 50% de réduction en utilisant le DA.

Les résultats montrent que la sensibilité d'*E.coli* dépend des conditions d'incubation et des biocides utilisés.

Les pourcentages de réduction variaient entre moyens en aérobiose à relativement fort pour les solutions de biocides les plus concentré en microaérophilie. Les molécules les plus efficaces dans les deux conditions l'eau de javel et le DDAC.

Tableau N° 45: Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par *E.coli* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
NaClO 2%	55,40%	DDAC 3%	69,40%
DA 1%	54,30%	DDAL 2%	62,20%
NaClO 1%	53,30%	NaClO 2%	61,20%
DDAC 3%	51,80%	DDAL 1%	60,30%
DDAC 1%	51,10%	DA 1%	50,40%
DDAL 2%	50,50%	DDAC 1%	48,40%
DDAL 1%	49,90%	DA 0,5%	46,10%
DA0,5%	42,00%	NaClO 1%	39,30%

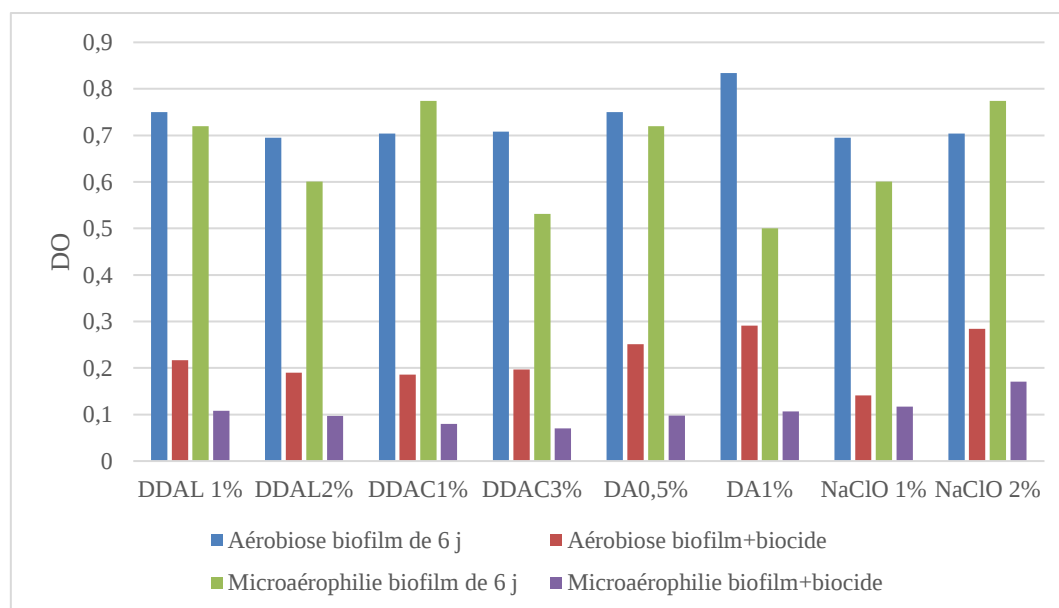


Figure N° 45 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par *E.coli* après ajout des différents biocides.

II.9.2. Tests réalisés sur les biofilms multi espèces

a) Association *L.m/IIa*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°46 et la figure N°46.

En aérobiose, un pourcentage de réduction très faible (1,40%) a été observé en utilisant le NaClO à une concentration de 2%. Les biocides DDAL, DDAC et DA ont été inefficaces sur les biofilms.

En microaérophilie, un pourcentage de réduction des biofilms de 15,3% a été observé en utilisant le NaClO à une concentration de 2% et ; un pourcentage de réduction très faible (2,6%) a été observé en utilisant le DA à une concentration de 1%.

Le DDAL et le DDAC ont été inefficace sur les biofilms.

Les résultats montrent que les différents biocides testés n'ont eu pratiquement aucun effet sur les biofilms formés par l'association des souches *L.m/IIa* dans les deux conditions d'incubation. Les seuls pourcentages de réduction observés étaient obtenus en utilisant l'eau de javel (pourcentage de réduction négligeable en aérobiose 1,40% et faible en microaérophilie 15,30%) et l'amine en microaérophilie (pourcentages de réduction négligeable 2,60%).

Partie expérimentale

Tableau N°46 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *L.m/IIa* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
NaClO 2%	1,40%	NaClO 2%	15,30%
DDAL 2%	-3,40%	DA 1%	2,60%
DDAC 3%	-26,40%	DDAC 3%	-4,10%
DDAC 1%	-26,50%	DA 0,5%	-4,20%
DDAL 1%	-27,20%	DDAL 2%	-6,70%
DA1%	-39,00%	NaClO 1%	-13,70%
NaClO 1%	-42,80%	DDAC1%	-27,30%
DA 0,5%	-43,40%	DDAL1%	-38,60%

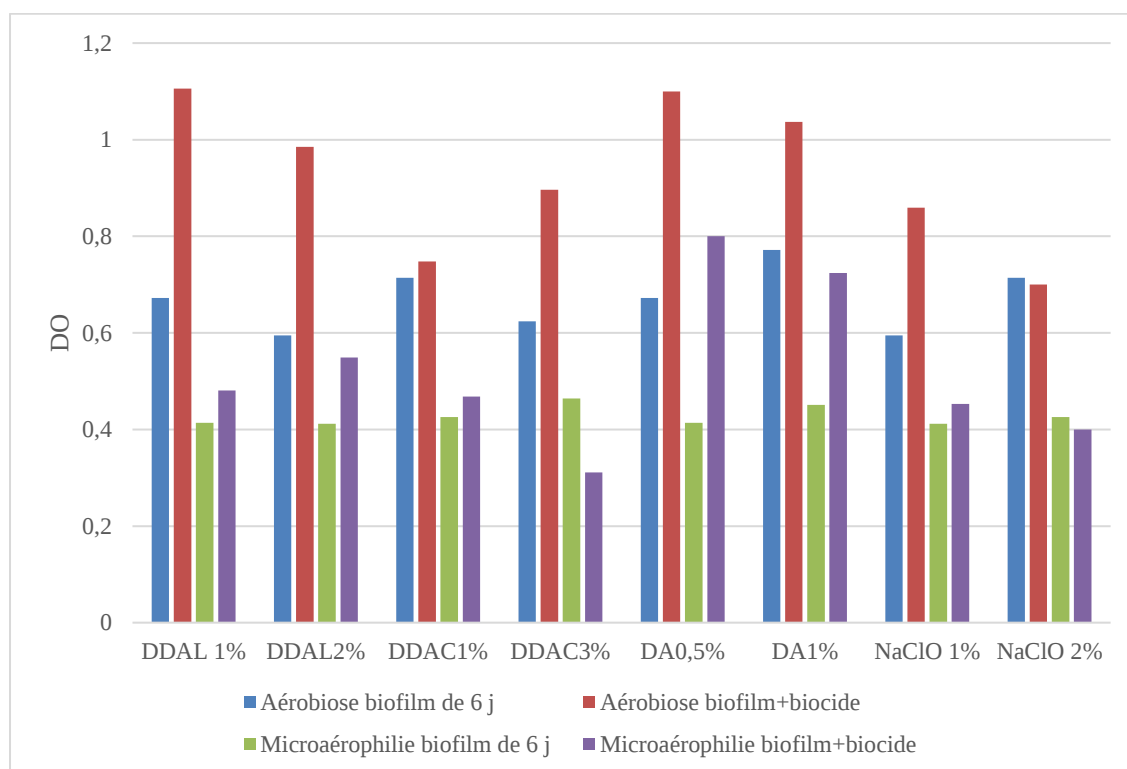


Figure N°46 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *L.m/IIa* après ajout des différents biocides.

Partie expérimentale

b) Association *L.m/IIa* + *L.i*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°47 et la figure N°47.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 50 % de réduction en utilisant les solutions de DDAL, DA, NaClO et DDAC.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 20% de réduction en utilisant les solutions de DDAL et NaClO ;

✚ Plus de 10% de réduction en utilisant le DDAC

Le DA a été inefficace sur les biofilms.

Les résultats montrent que la sensibilité des associations testées dépend plus des conditions d'incubation que du biocide utilisé.

Les pourcentages de réduction variaient entre moyens (aérobiose) à faibles (microaérophilie) aérobiose) avec le DDAL et l'eau de javel comme molécules les plus efficaces.

L'amine à 1% n'a eu aucun effet sur les biofilms formés.

Tableau N°47 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *L.m/IIa* + *L.i* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAL 2%	54,50%	DDAL 2%	31,00%
DA 1%	53,70%	NaClO 2%	25,60%
DDAL 1%	53,40%	DDAL 1%	21,10%
NaClO 2%	53,00%	DDAC 3%	12,00%
DDAC 3%	51,80%	DDAC 1%	8,90%
NaClO 1%	50,80%	NaClO 1%	2,30%
DA0,5%	49,70%	DA1%	0,70%
DDAC 1%	48,10%	DA0,5%	0,00%

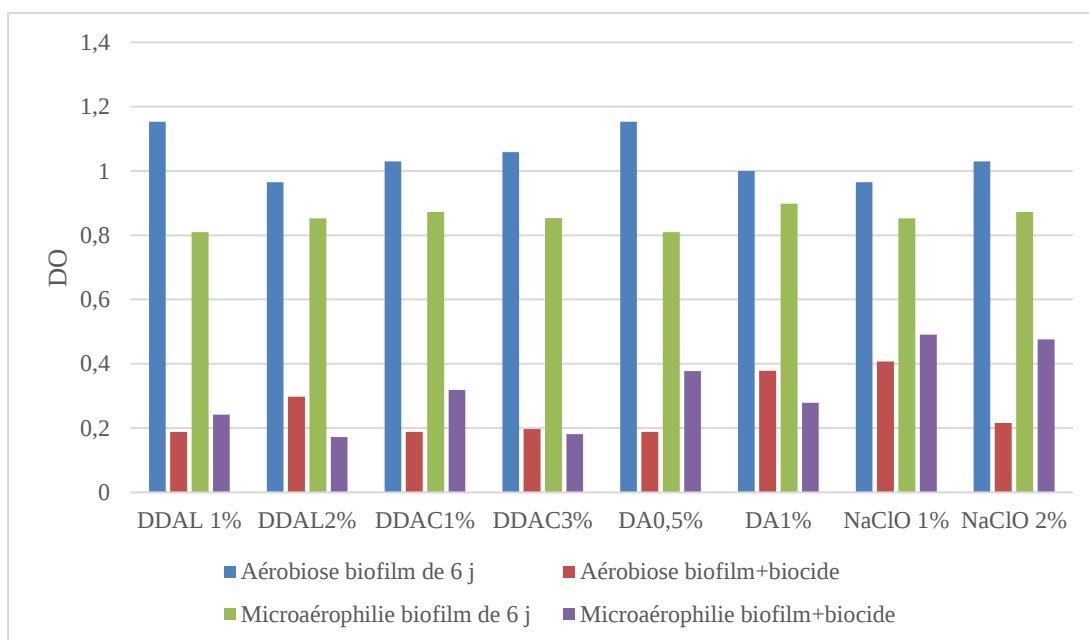


Figure N°47 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *L.m/IIa + L.i* après ajout des différents biocides.

c) Association *L.m/IIb + L.i*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°48 et la figure N°48.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 60 % de réduction en utilisant les solutions de DA, DDAL, NaClO et DDAC.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 30% de réduction en utilisant les solutions de DDAL et NaClO ;

✚ Plus de 10% de réduction en utilisant le DDAC.

Le DA a été inefficace sur les biofilms.

Les résultats montrent que la sensibilité des associations testées dépend plus des conditions d'incubation que du biocide utilisé.

Les pourcentages de réduction variaient entre moyens (aérobiose) à faibles (microaérophilie) aérobiose) avec le DDAL et l'eau de javel comme molécules les plus efficaces.

L'amine n'a eu aucune efficacité sur les biofilms formés à 0.5%.

Partie expérimentale

Tableau N°48 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *L.m/IIb* + *L.i* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DA 1%	77,20%	DDAL 2%	38,60%
DA 0,5%	64,30%	NaClO 2%	36,50%
DDAL 2%	64,20%	DA 1%	18,30%
DDAL1%	63,00%	NaClO 1%	16,80%
NaClO 2%	60,80%	DDAL 1%	13,80%
DDAC 3%	60,50%	DDAC 3%	12,60%
DDAC 1%	59,70%	DDAC 1%	5,70%
NaClO 1%	59,50%	DA 0,5%	-1,80%

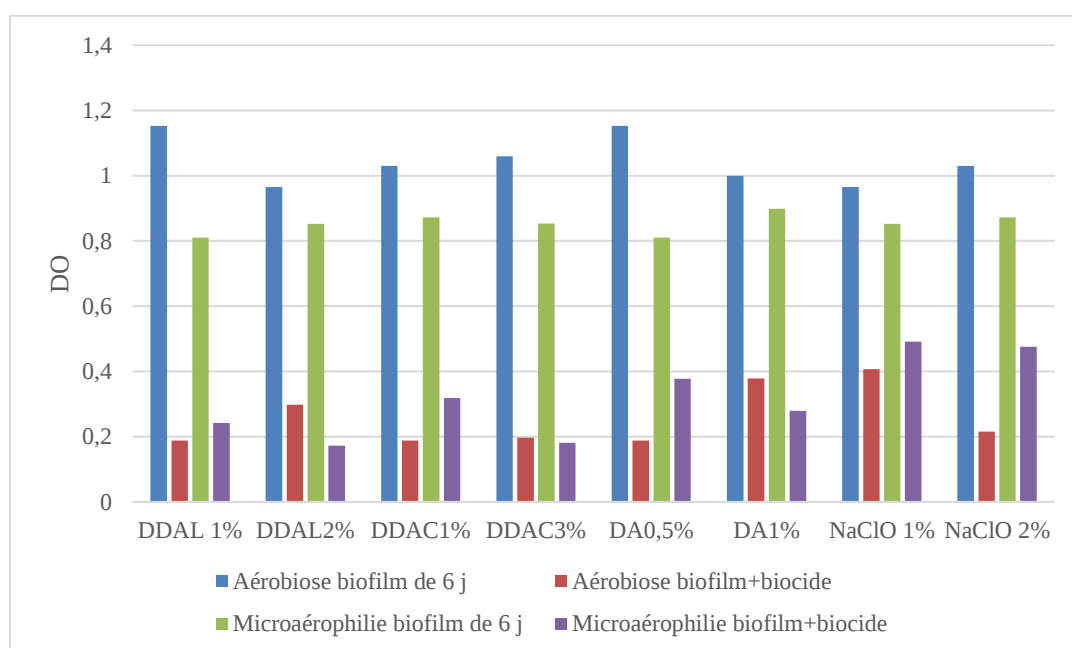


Figure N°48 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *L.m/IIb* + *L.i* après ajout des différents biocides.

d) Association *E.coli* + *L.m/IIa*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°49 et la figure N°49.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

Partie expérimentale

- ✚ Plus de 60 % de réduction en utilisant les solutions de DA, DDAL ;
- ✚ Plus de 50% de réduction en utilisant le DDAC ;
- ✚ Plus de 30% de réduction en utilisant le NaClO

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 30% de réduction en utilisant : DDAC ;
- ✚ Plus de 10% de réduction en utilisant les solutions de NaClO et DA.

Les résultats montrent que la sensibilité des associations testées aux biocides dépend des conditions d'incubation et des biocides utilisés.

Les pourcentages de réduction variaient entre moyens à forts en aérobiose et faibles en microaérophilie. Les molécules les plus efficaces sont le DDAL en aérobiose et le DDAC en microaérophilie.

Tableau N°49 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIa* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DA 1%	71,70%	DDAC 3%	35,70%
DDAL 2%	65,60%	DDAL 2%	19,30%
DDAC 3%	55,60%	DDAC 1%	19,20%
DDAL 1%	51,90%	NaClO 2%	16,50%
NaClO 2%	37,90%	DA1%	15,60%
DA 0,5%	33,50%	NaClO 1%	14,40%
NaClO 1%	31,80%	DDAL 1%	11,50%
DDAC 1%	17,40%	DA 0,5%	3,30%

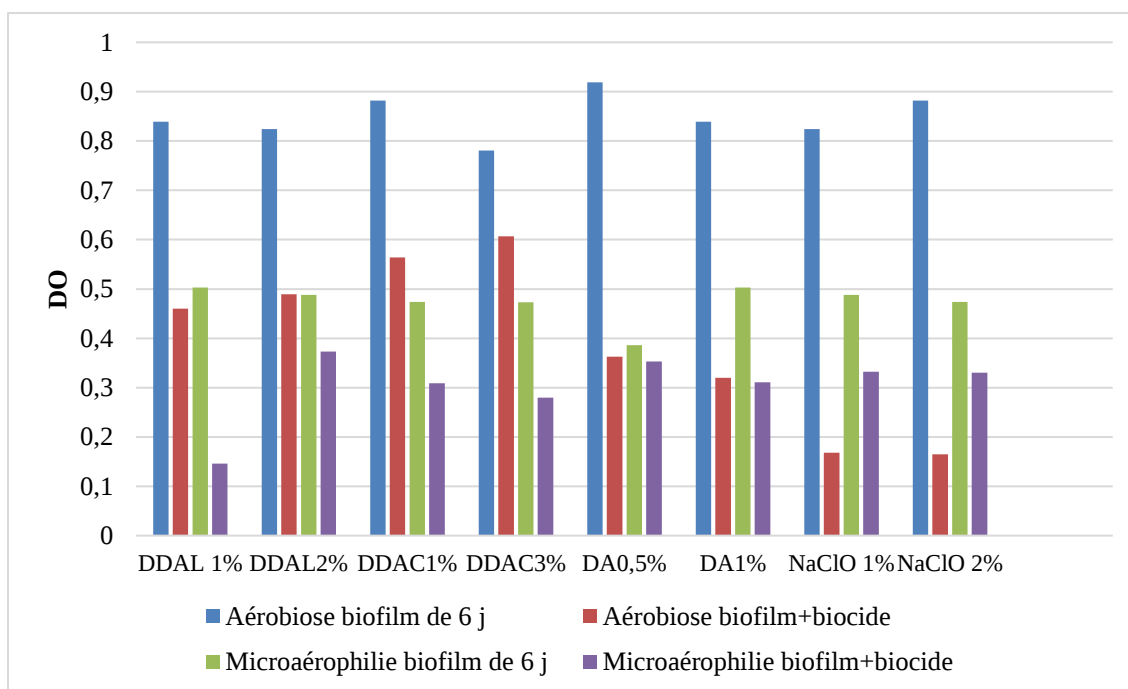


Figure N°49 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIa* après ajout des différents biocides.

e) Association *E.coli* + *L.m/IIb*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°50 et la figure N°50.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- + Plus de 70 % de réduction en utilisant les solutions de : DDAL et NaClO ;
- + Plus de 50% de réduction en utilisant les solutions de : DA et DDAC.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- + Plus de 60% de réduction en utilisant les solutions de DDAC, DA, DDAL et NaClO.

Les résultats montrent que la sensibilité des associations testées aux biocides dépend des conditions d'incubation et des biocides utilisés.

Les pourcentages de réduction variaient entre moyens à forts en aérobiose et moyens en microaérophilie. Les molécules les plus efficaces sont le DDAL en aérobiose et le DDAC en microaérophilie.

Partie expérimentale

Tableau N°50 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIb* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAL 2%	80,10%	DDAC 3%	69,40%
NaClO 2%	70,30%	DA 1%	62,20%
DDAL 1%	69,90%	DDAL 2%	61,20%
NaClO 1%	53,30%	NaClO 2%	60,30%
DA1%	52,10%	DDAL 1%	50,40%
DDAC 3%	51,60%	NaClO 1%	48,40%
DDAC 1%	49,10%	DDAC 1%	46,10%
DA 0,5%	21,70%	DA 0,5%	39,30%

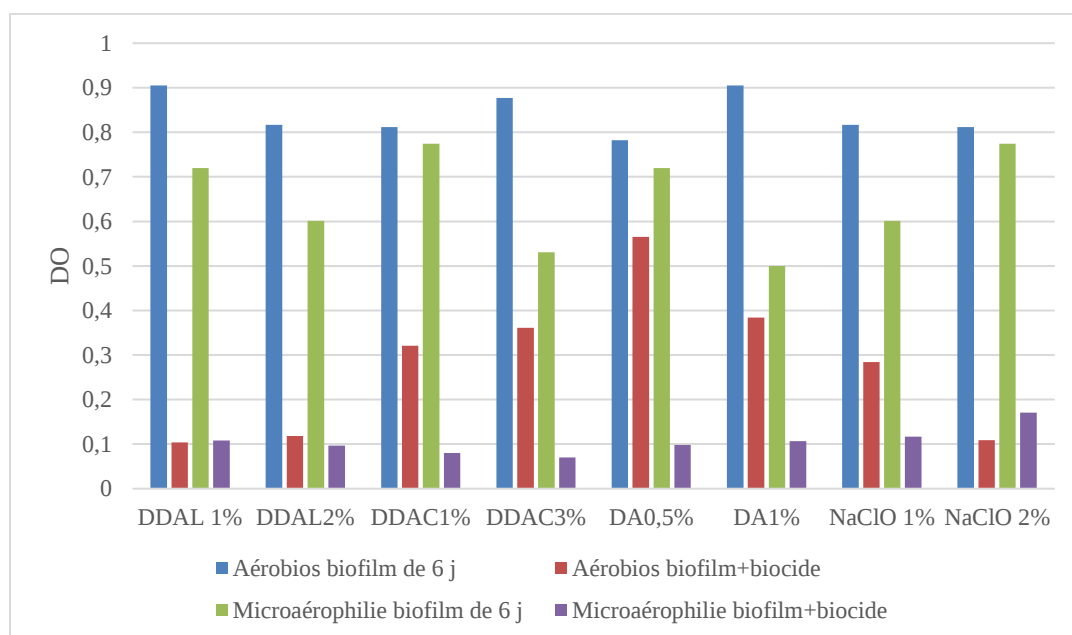


Figure N°50 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIb* après ajout des différents biocides.

f) Association *E.coli* + *L.m/IIa* + *L.i*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°51 et la figure N°51.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

Partie expérimentale

✚ Plus de 60% de réduction en utilisant les solutions de DDAL, DA, DDAC et NaClO.
En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 60% de réduction en utilisant les solutions de DDAL, DDAC et DA ;

✚ Plus de 30% de réduction en utilisant le NaClO.

Tableau N°51 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIa* + *L.i* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAL 2%	96,50%	DDAL 2%	68,00%
DA 1%	96,50%	DDAC 3%	67,20%
DDAC 3%	86,20%	DA 1%	61,90%
DDAC 1%	84,20%	DDAL 1%	56,80%
NaClO 2%	81,40%	DDAC 1%	55,30%
DDAL 1%	66,70%	DA 0,5%	43,30%
DA 0,5%	62,20%	NaClO 2%	39,60%
NaClO 1%	55,80%	NaClO 1%	36,10%

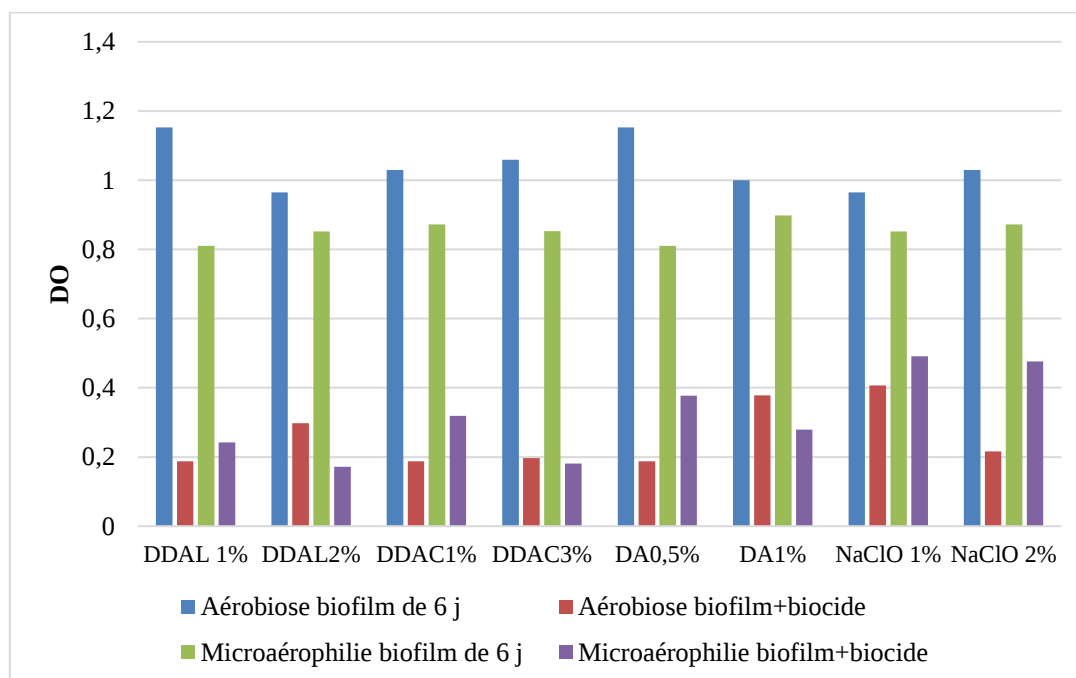


Figure N°51 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIa* + *L.i* après ajout des différents biocides.

Partie expérimentale

g) Association *E.coli* + *L.m/IIb* + *L.i*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°52 et la figure N°52.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 70 % de réduction en utilisant les solutions de DA, DDAL, DDAC et NaClO.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

✚ Plus de 30% de réduction en utilisant les solutions de NaClO, DDAC et DA ;

✚ Plus de 20% de réduction en utilisant le DDAL.

Les résultats montrent que la sensibilité des associations *E.coli* + *L.m/IIa* + *L.i* et *E.coli* + *L.m/IIb* + *L.i* aux biocides dépend des conditions d'incubation et des biocides utilisés.

Les pourcentages de réduction variaient en aérobiose entre moyens, très forts (l'association *E.coli* + *L.m/IIa* + *L.i*) et fort (l'association *E.coli* + *L.m/IIb* + *L.i*) avec l'amine et le DDAL comme biocides les plus efficace. En microaérophilie, les réductions observées étaient moyennes. Avec le DDAL et l'eau de javel comme biocides les plus efficaces respectivement sur l'association *E.coli* + *L.m/IIa* + *L.i* et l'association *E.coli* + *L.m/IIb* + *L.i*.

Tableau N°52 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/IIb* + *L.i* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DA 1%	83,60%	NaClO 2%	35,50%
DDAL 2%	79,90%	DDAC 3%	34,10%
DA 0,5%	79,00%	DA 1%	30,20%
DDAC 3%	78,20%	NaClO 1%	29,00%
NaClO 2%	78,00%	DDAL2%	28,60%
DDAL 1%	77,90%	DDAL 1%	27,70%
NaClO 1%	77,60%	DDAC 1%	27,40%
DDAC 1%	77,30%	DA 0,5%	24,20%

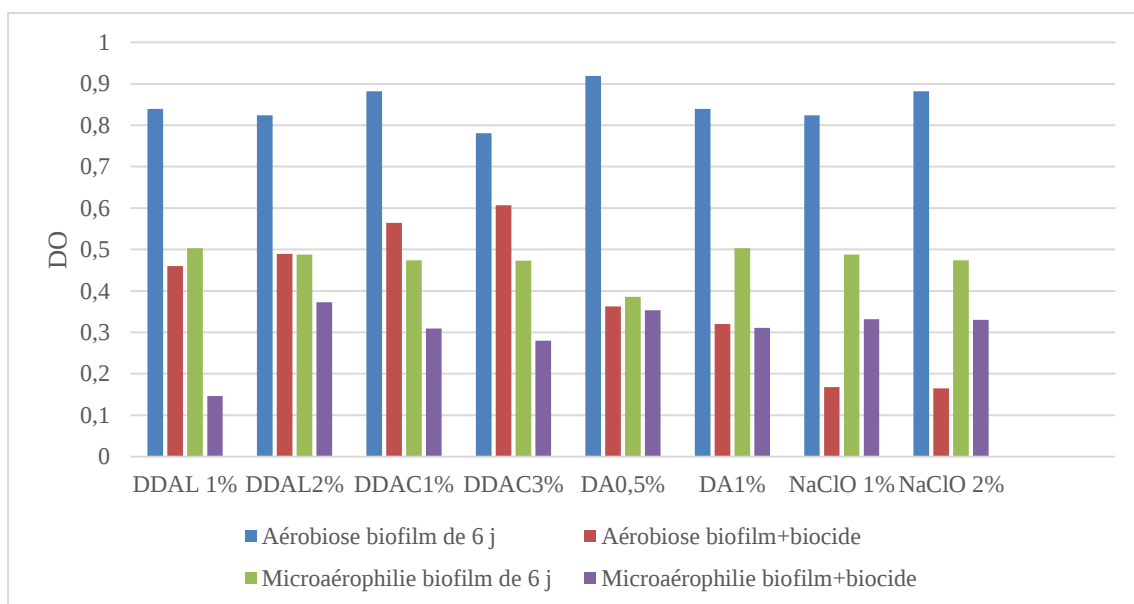


Figure N°52 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.m/Iib* + *L.i* après ajout des différents biocides.

h) Association *E.coli* + *L.i*

Les résultats des tests de sensibilité aux biocides de l'association testée sont rapportés dans le tableau N°53 et la figure N°53.

En aérobiose, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 70 % de réduction en utilisant les solutions de DDAL, DDAC et NaClO ;
- ✚ Plus de 60% de réduction en utilisant le DA.

En microaérophilie, les meilleurs pourcentages de réduction des biofilms ont été obtenus en utilisant les solutions de biocides les plus concentrées :

- ✚ Plus de 50% de réduction en utilisant les solutions de DDAL, DDAC et NaClO ;
- ✚ Plus de 40% de réduction en utilisant le DA.

Les résultats montrent que la sensibilité de l'association testée aux biocides dépend uniquement des conditions d'incubation.

Les pourcentages de réduction variaient en aérobiose entre moyens et très forts et en microaérophilie entre moyen et fort avec les DDAL, DDAC et eau de javel comme biocides les plus efficaces.

Partie expérimentale

Tableau N°53 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.i* après ajout des différents biocides.

Aérobiose		Microaérophilie	
Biocide	% de réduction	Biocide	% de réduction
DDAL 2%	92,30%	DDAL 2%	71,00%
DDAC 3%	82,00%	DDAC 3%	63,40%
NaClO 2%	74,40%	DDAL 1%	60,10%
DDAC 1%	72,10%	NaClO 2%	54,30%
DA 1%	67,35%	DDAC 1%	51,50%
DDAL 1%	61,80%	DA 1%	49,23%
NaClO 2%	58,70%	DA 0,5%	42,10%
DA 0,5%	58,30%	NaClO 1%	41,40%

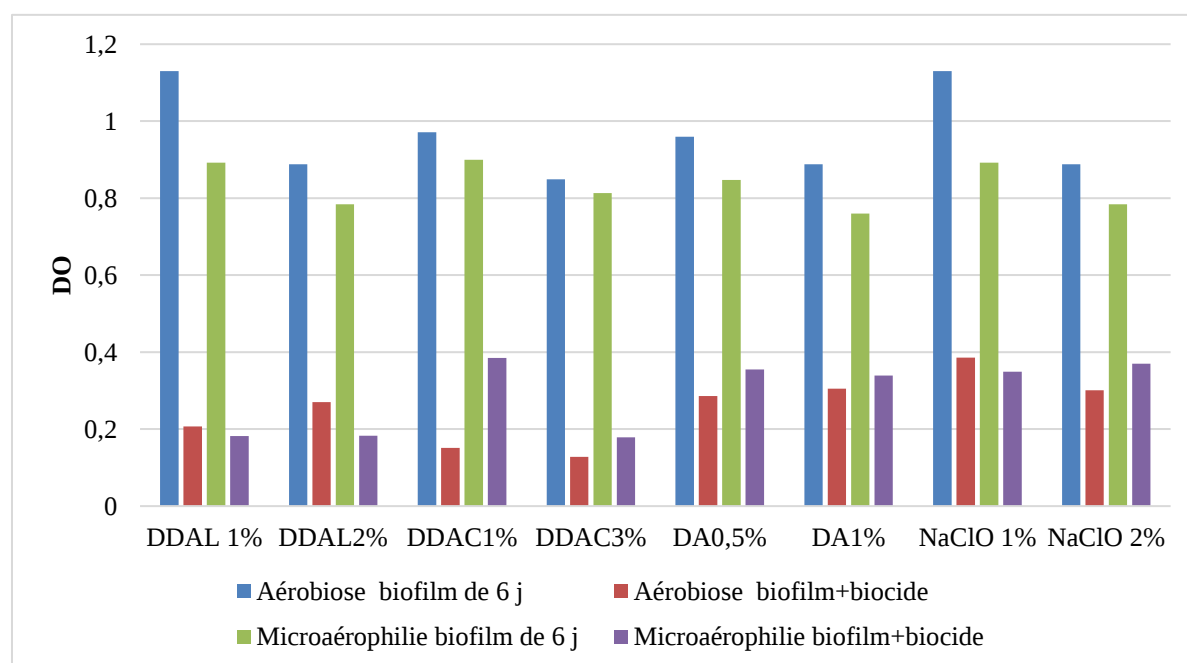


Figure N°53 : Résultats des pourcentages de réduction des biofilms formés par l'association *E.coli* + *L.i* après ajout des différents biocides.

III. Discussion

La formation et le développement des biofilms sont des phénomènes très complexes qui peuvent être influencés par plusieurs facteurs parmi lesquels figurent les propriétés de la surface, la disponibilité des éléments nutritifs, la composition de la communauté microbienne, les interactions interspécifiques entre les espèces etc. (**Chmielewski et Frank, 2003**).

Plusieurs études ont démontré que les espèces du genre *Listeria* ainsi que *E.coli* ont la capacité de former des biofilms (**Auger, 2012 ; Kadam et al., 2013 ; Reis-Teixeira et al., 2017**) sur différents types de surfaces.

Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que les bactéries testées, *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *E.coli* ont la capacité d'adhérer aussi bien sur le support en plastique que celui en polystyrène. Ces mêmes bactéries ont la capacité à former des biofilms dans des conditions d'aérobiose et de microaérophilie, seules ou en associations avec les autres espèces et aux deux concentrations testées c'est-à-dire à 1 et à 4 McFarland. L'étude montre également que la force de formation des biofilms variait en fonction des divers paramètres testés.

Tests d'adhésion et de formation de biofilms sur le support en plastique

L'étude de la formation des biofilms sur un support en plastique à partir de suspensions bactériennes **mono-espèce** à la concentration de 1 McFarland a montré la capacité de *L. innocua* à former des biofilms, comme il a été déjà rapportée par plusieurs auteurs (**Hood et Zottola, 1997a, 1997b ; Robitaille et al., 2014**).

En milieu aérobie, nos résultats confirment cette capacité que possède *L. innocua* a formé des biofilms sur un support en plastique. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Kalmokoff et al. (2001) et Robitaille et al. (2014)** qui ont observé cette capacité à adhérer à plusieurs types de surfaces parmi elles, le plastique.

Nos résultats montrent également que la microaérophilie peut influencer la formation des biofilms en induisant une diminution de sa force à partir du 5^{ème} jour d'incubation ($p < 0,05$).

L. innocua est un germe aéro anaérobie facultatif, la diminution de la croissance en microaérophilie au bout de 5j d'incubation serait probablement due à la nature du support lui-même ou encore à la diminution des nutriments disponibles au sein du biofilm.

Pour *L. monocytogenes*, nos résultats confirment sa capacité d'adhérer et à former un biofilm sur un support en plastique. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Borucki et al. (2003) et Pan (2009)** qui ont constaté que l'espèce *L. monocytogenes* avait une grande capacité à former des biofilms.

Partie expérimentale

Nos résultats montrent aussi que l'incubation en microaérophilie n'a pas d'influence sur l'indice de formation de biofilm durant toute la période d'incubation en comparaison avec l'incubation en aérobiose ($p < 0,05$). Cela serait probablement dû à la capacité de *Listeria* à se développer dans des atmosphères à tension légèrement abaissée en oxygène et augmentée en gaz carbonique par rapport à celle de l'air (**Rocourt, 1998**).

L'étude a montré également, que les deux espèces de *Listeria*, *L. monocytogenes* et *L. innocua* avaient globalement les mêmes pouvoirs d'adhésion. Ces caractéristiques ont été rapportées par **Kalmokoff et al. (2001)** et **Robitaille et al. (2014)** ainsi que **Jeon et al. (2018)** qui ont observé la grande ressemblance entre les deux espèces par rapport à leurs pouvoirs d'adhésion aux surfaces.

Les résultats obtenus au cours de cette étude confirment que l'espèce ***E. coli*** a la capacité d'adhérer et de former des biofilms sur les supports en plastique. Ces résultats corroborent ceux des études antérieures qui ont rapporté cette capacité d'*E. coli* à former des biofilms sur différents supports sous différentes conditions (**Azam et al., 2018**).

L'étude de l'influence de la teneur en oxygène du milieu sur la capacité d'*E. coli* à former des biofilms sur le support en plastique à la concentration bactérienne de 1 McFarland a montré que l'incubation en microaérophilie n'a pas eu d'influence. En début d'incubation, la formation de biofilms était forte, puis elle est devenue moyenne après 5 et 6j. Cette diminution serait probablement due à une adaptation moyenne de cette bactérie à ce milieu, qui serait causée soit par les conditions de microaérophilie ou bien liée à la nature du support. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Auger (2012)**, lequel a noté que les bactéries peu productrices de biofilms en aérobiose, ne décroissent pas leur production de biofilms en anaérobiose et que les bactéries modérément ou fortement productrices de biofilms en aérobiose, produisent des biofilms en anaérobiose de la même force mais avec un indice plus faible.

Des tests ont été réalisés pour étudier la capacité des suspensions bactériennes **mono espèces** à former des biofilms dans les conditions d'augmentation de la concentration bactérienne à **4 McFarland**. Certains auteurs tels que **Kjelleberg et Molin (2002)** et **Li et Tian (2012)** suggèrent que l'augmentation de la densité cellulaire favorise les signaux chimiques de cellule à cellule impliqués dans les interactions sociales au sein d'un biofilm. Cependant, plusieurs paramètres peuvent aussi intervenir rendant ainsi l'augmentation de cette densité favorable ou pas au développement des biofilms.

Partie expérimentale

En augmentant la charge bactérienne, *L. innocua* a eu un comportement différent de celui observé en utilisant des suspensions à 1 McFarland, indiquant que la charge microbienne associée à la modification de la teneur en oxygène et en gaz carbonique ont induit une modification de la formation du biofilm. A la concentration de 4 McFarland, après une forte formation de biofilm en début d'incubation, *L. innocua* a formé des biofilms moyens en fin d'incubation en aérobiose contrairement aux résultats obtenus à la concentration de 1 McFarland où une forte production du biofilm a été maintenue jusqu'à la fin de l'incubation, indiquant que la charge microbienne a eu un effet négatif sur la formation des biofilms. En microaérophilie, l'inverse s'est produit : la charge bactérienne a eu un effet positif sur la formation du biofilm et cela en donnant un biofilm fort qui s'est maintenu durant toute la période d'incubation contrairement à ce qui a été constaté en aérobiose.

Les résultats obtenus pour *L. monocytogenes* montrent qu'en aérobiose, cette dernière adopte un comportement presque identique à celui observé avec les suspensions à 1 McFarland ; les absorbances de ces dernières aux deux concentrations testées, observées à 5 et 6j sont presque similaires ($p > 0.05$).

La microaérophilie associée à une charge bactérienne élevée a favorisé le maintien d'une forte formation de biofilms. Cette dernière est supérieure à celle obtenue à 1 McFarland ($p < 0.05$).

Ces résultats laissent croire que l'augmentation de la charge bactérienne favorise le maintien de la formation des biofilms en aérobiose (contrairement à *L. innocua*) et augmente la force de sa formation dans les conditions de microaérophilie.

Pour *E. coli*, les résultats montrent qu'en aérobiose, l'évolution de la formation des biofilms durant les 5 premiers jours était identique à celle obtenue avec la concentration de 1 McFarland ($p > 0,05$). La différence a été observée au 6^{ème} jour d'incubation avec une forte formation des biofilms à partir des solutions à 4 McFarland ($p < 0,05$).

Le développement des biofilms à *E. coli* en microaérophilie était plus important qu'en aérobiose. Il était également plus important que celui observé avec la concentration de 1 McFarland ($p < 0,05$). Cela serait probablement dû à l'augmentation du nombre de bactéries mis initialement en contact avec le support ainsi qu'une adaptation aux conditions de microaérophilie.

Il semble donc que *E. coli* a eu un comportement différent en augmentant la charge bactérienne à 4 McFarland avec une meilleure croissance en microaérophilie.

Les suspensions bactériennes **multi-espèces** ont également fait objet de notre étude.

Partie expérimentale

A la concentration de 1 McFarland, les résultats obtenus montrent que toutes les associations testées ont abouti à une formation moyenne à forte de biofilms, ce qui confirme que ces espèces peuvent coexister au sein d'un même biofilm.

Les bactéries existent dans le milieu naturel sous forme de biofilms multi-espèces. Plusieurs auteurs accordent une grande importance à l'étude de la coexistence d'espèces différentes au sein d'un même biofilm. La capacité d'une bactérie à coexister dans des biofilms multi-espèces peut être importante pour sa persistance dans l'environnement (**Jeong et Frank, 1994**). La compétition et la coopération sont les principales interactions bactériennes observées dans ces communautés de biofilms (**Yang et al., 2011**). Des interactions métaboliques coopératives sont également suggérées, certaines espèces bactériennes peuvent modifier le microenvironnement local, le rendant plus apte à la croissance d'autres organismes, par exemple en modifiant le pH ou la concentration en oxygène. Ainsi, les organismes capables de métaboliser l'oxygène pourraient favoriser la croissance d'organismes anaérobies à proximité (**Stewart et Franklin, 2008**).

Les résultats de l'étude de l'**association** de bactéries de l'espèce **L. monocytogenes** montrent qu'en aérobiose, il y a eu un ralentissement du processus d'adhésion. Ce ralentissement était suivi par la suite d'une forte production de biofilms. A partir de 48h d'incubation, il n'y a pas eu de différences entre production de biofilms en aérobiose ou en microaérophilie.

Le ralentissement observé en début d'incubation laisse penser que les bactéries ont eu besoin d'un temps d'adaptation pour adhérer à la surface. Ce comportement pourrait être dû soit à la nature du support ou bien au facteur séro groupe des souches de *L. monocytogenes* présentes au sein du biofilm. Ce dernier peut avoir un effet significatif sur la formation des biofilms selon **Kadam et al. (2013)**.

De nombreux auteurs ont rapporté que les effets sur les densités de *L. monocytogenes* par les interactions avec les souches vont de l'absence d'effet à des effets positifs et antagonistes (**Røder et al., 2015 ; Rodriguez-Lopez et al., 2015; Papaioannou et al., 2018**). Dans notre étude, le ralentissement pourrait être dû à un effet d'antagonismes entre les différentes bactéries en début d'incubation qui a fini par basculer vers un effet positif par la suite.

Les résultats de l'association **E. coli et L. monocytogenes** montrent qu'il y a eu un effet de synergie entre les deux espèces. La force de formation des biofilms formés par *E. coli* seule, avait tendance à devenir moyenne à 5j et 6j d'incubation. Avec la présence simultanée de *L. monocytogenes*, la force de formation des biofilms a été maintenue constante durant toute la période d'incubation.

Partie expérimentale

La capacité de *L. monocytogenes* à se développer au sein d'un biofilm multi-espèces a été rapportée par **Buchanan *et al.* (2017)**. La capacité d'*E. coli* à former des biofilms multi-espèces a quant à elle été rapportée par **Giaouris *et al.* (2013)** et **Larsen *et al.* (2014)**. Ces derniers auteurs ont décrit l'effet de synergie entre différentes espèces bactériennes composant un biofilm multi-espèces parmi les quelles *L. monocytogenes* et *E. coli*.

Les résultats de l'association d'**E. coli et L. innocua** montrent que les espèces testées seules se sont comportées différemment une fois associées au sein des mêmes biofilms. La croissance du biofilm crée par l'association des deux espèces en aérobiose a été ralentie. Ceci serait probablement liée à la présence de *E. coli* qui au sein de biofilms mono espèce avait montré une formation de biofilms moyenne à la fin de la période d'incubation.

Par contre, en microaérophilie, contrairement aux conditions d'aérobiose, l'association testée a induit une forte formation de biofilms durant toute la période d'incubation ce qui suggère que la synergie entre les deux espèces est favorisée par les conditions de microaérophilie.

Nous remarquons que l'association *E. coli* + *L. monocytogenes* a conduit à une formation plus importante de biofilms que l'association *E. coli* + *L. innocua* ($p < 0.05$). Cela laisse penser que l'effet de synergie est plus important en présence de *L. monocytogenes* qui agit toujours en faveur de la formation d'un biofilm fort quand elle est présente au sein d'une association.

Les résultats obtenus avec l'association des deux espèces de *Listeria*, ***L. monocytogenes* et *L. innocua*** montrent que cette association a induit une forte production de biofilms durant toute la période d'incubation, que ce soit en aérobiose ou en microaérophilie ; cela est probablement dû à un effet de synergie entre les deux espèces.

Rappelons que *L. innocua* était moyennement productrice de biofilms au sein des biofilms mono espèces dans les conditions de microaérophilie, ainsi, nous constatons que le comportement d'une espèce bactérienne au sein d'un biofilm peut être différent d'une association à une autre.

Les résultats obtenus lors de l'association des trois espèces **E. coli ; L. monocytogenes et L. innocua**, montrent que cette association a favorisé la croissance du biofilm que ce soit en aérobiose ou en microaérophilie. En comparant les résultats obtenus lors de cette association avec celles des associations *L. monocytogenes* et *E. coli* ; *L. innocua* et *E. coli* ; et *L. monocytogenes* et *L. innocua*, nous remarquons que la présence de *L. monocytogenes* au sein de l'association des trois espèces a favorisé une forte formation de biofilm qui s'est maintenue durant toute la période d'incubation.

Partie expérimentale

Les interactions spatiales et métaboliques entre les espèces contribuent à l'organisation de biofilms multi spécifiques et à la production d'un environnement local dynamique (**Nadell et al., 2009; Tolker-Nielsen et Molin, 2000**). Des modèles complexes d'interactions bactériennes et d'inhibition de *L. monocytogenes* dans les cultures multi bactériennes ont été constatés par **Heven et al. (2018)** qui ne dépendent que partiellement du contact cellulaire et impliquent probablement divers mécanismes.

La formation de biofilms à partir de suspensions bactériennes **multi-espèces** à la concentration de **4 McFarland** a aussi été étudiée. Les résultats obtenus avec l'association des deux espèces *E. coli* et *L. innocua* montrent que les deux bactéries se sont comportées pratiquement de la même manière que lors de leur présence dans le biofilm mono espèce respectif.

En milieu aérobie, la production de biofilms est devenue moyenne à 5j et 6j. Nous supposons que c'est la présence de *E. coli* qui a causé cette diminution puisque dans le biofilm mono espèce, *E.coli* avait montré un ralentissement à 5j et 6j .

En microaérophilie par contre, le développement était très important ($p < 0,05$), cela serait probablement du, d'une part à la charge bactérienne initiale élevée (4 McFarland) et d'autre part, à la présence simultanée de deux espèces fortement productrices de biofilms dans ces conditions.

Les résultats obtenus avec l'association d'*E. coli* et *L. monocytogenes* montrent que les espèces bactériennes testées, se sont comportées pratiquement de la même manière que lors de leur présence dans un biofilm mono espèce à 4 McFarland, et aussi dans l'association *E.coli* + *L. monocytogenes* à 1 McFarland. En aérobiose, la formation de biofilms était élevée, cela serait probablement dû à la charge initiale mise en contact avec la surface. Cette forte formation a baissé avec le temps, cela pourrait être dû au fait que les bactéries seules à 4McFarland avaient donné une production moyenne de biofilms à 5 j et à 6j d'incubation ou encore à la diminution des nutriments dans le milieu.

En microaérophilie, le développement était très important, cela serait probablement dû, d'une part à la charge bactérienne initiale élevée et aussi, à la présence simultanée des deux espèces fortement productrices de biofilms dans ces conditions.

D'importantes variations de compétitivité entre *L. monocytogenes* et d'autres bactéries dans des conditions de culture multibactériennes ont été rapportées par **Heir et al. (2018)**.

Partie expérimentale

Il conviendrait de prendre en compte ces variations, principalement la nature des bactéries présentes, dans les études ultérieures visant à mieux comprendre la persistance de *L. monocytogenes* sur les surfaces.

Tests d'adhésion et formation de biofilms sur le support en polystyrène :

La formation de biofilms **mono-espèce** à partir de suspensions bactériennes à concentration de **1 McFarland** a été étudiée

Nos résultats montrent que ***L. innocua*** a la capacité de former des biofilms sur un support en polystyrène. Ils montrent aussi que cette bactérie est fortement productrice de biofilms dans les conditions d'aérobiose et de microaérophilie sur ce support.

La capacité de *L. innocua* à former des biofilms dans des conditions de microaérophilie serait dû à sa tendance à la microaérophilie caractéristique du genre *Listeria* qui lui a probablement permis de s'adapter à ces conditions.

L. innocua avait tendance à former des biofilms plus fort sur le polystyrène par rapport au plastique surtout en microaérophilie.

En aérobiose, les résultats obtenus montrent que ***L. monocytogenes*** a adopté plusieurs comportements en formant les biofilms. Une adhésion moyenne à forte a été observée suivie par une production moyenne à forte de biofilms.

Ces variations inter-espèce seraient probablement dues à l'hétérogénéité des bactéries présentes dans les biofilms. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Wang et al. (2015)** qui avaient constaté qu'une souche de *L. monocytogenes* pouvait présenter des variations considérables en matière d'adhésion et de capacité de formation de biofilms, ce qui peut être considéré comme un mécanisme adaptatif (**Lundén et al., 2003**), la variation intra-souche peut être supposée, car elle a déjà été décrite précédemment (**Afzal Ghauri et al., 2007; Adriaño et al., 2008**).

Une autre hypothèse peut aussi être émise. La nature du support a probablement eu une influence sur la capacité des bactéries à former des biofilms. Cette influence peut varier éventuellement en fonction des souches présentes dans le biofilm.

Les ***E. coli*** testés ont montré une capacité à adhérer sur le polystyrène et de former des biofilms dans des conditions d'aérobiose et de microaérophilie. Le développement était statistiquement meilleur dans les conditions de microaérophilie ($p < 0,05$). Ces résultats corroborent ceux des études antérieures, qui ont rapporté la capacité d'*E. coli* à former des biofilms sur du polystyrène sous différentes conditions (**Azam et al., 2018**). Ils sont par contre différents de ceux obtenus par **Auger (2012)**, lequel a observé que l'incubation en anaérobiose

Partie expérimentale

pouvait ralentir le développement des biofilms à *E.coli*. Cette différence est certainement liée au fait que nos tests ont été réalisés en microaérophilie et non en anaérobiose.

Les résultats montrent que *E. coli* a la capacité d'adhérer et de former un biofilm sur un support en polystyrène. Cette bactérie est fortement productrice de biofilms dans les deux conditions d'aérobiose et de microaérophilie et cela durant toute la période d'incubation contrairement à ce qui a été constaté sur le support en plastique (biofilms moyens en fin d'incubation dans les deux conditions).

Ces résultats corroborent ceux des études antérieures qui ont rapporté la capacité d'*E. coli* à former de forts biofilms sur un support en polystyrène (**Hassan et al., 2011**).

Ces résultats concordent également avec ceux d'**Auger (2012)**, qui a constaté qu'une souche productrice de biofilms en aérobiose conserve un indice de formation élevé en cas de manque d'oxygène.

Concernant la formation de biofilms à partir de suspension bactérienne **mono-espèce** à la concentration de **4 McFarland**, les résultats obtenus ont montré que l'adhésion de *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *E.coli* était encore plus forte et plus précoce. Ce qui suggère que le nombre initial très important de cellules bactériennes en contact avec la surface a favorisé l'adhésion et la formation des biofilms.

La microaérophilie a permis une meilleure adhésion et formation des biofilms pour les isolats d'*E.coli* ($p < 0.05$). Cela pourrait être lié à la possibilité d'adaptation de cette bactérie aux conditions de microaérophilie et à son pouvoir de maintenir ou augmenter sa capacité à former des biofilms (**Stewart et Franklin, 2008**). Les souches d'*E. coli* répondent différemment aux changements de conditions de croissance. Elles utilisent probablement différentes stratégies et expriment différents gènes impliqués dans la formation des biofilms en fonction des conditions environnementales (**Hancock et al., 2011**) et aussi de leur groupe phylogénétique (**Reisner et al., 2006 ; Skyberg et al., 2007**).

Globalement, le support en polystyrène a permis une meilleure formation des biofilms que le support en plastique.

La formation de biofilms à partir de suspensions bactériennes **multi-espèces** à la concentration de **1 McFarland** a aussi été étudiée. Les résultats montrent que toutes les associations testées ont abouti à une forte formation de biofilms. Par ailleurs, les associations de *L. monocytogenes* ont montré particulièrement une formation moindre sur le support en plastique par rapport au support en polystyrène. Pour les autres associations, les résultats étaient pratiquement similaires.

Partie expérimentale

La capacité des bactéries à coexister au sein d'un même biofilm a été étudiée par plusieurs auteurs. Les biofilms multi-espèces sont généralement plus stables que les biofilms mono-espèces. Il a été démontré que les interactions entre cellules jouent un rôle clé dans la formation et la structuration des biofilms (**Burmølle et al., 2006; Remis et al., 2010 ; van der Veen et Abee, 2011**). Dans une véritable cohabitation coopérative, toutes les espèces profitent en quelque sorte de la présence des autres espèces, conduisant à une meilleure forme générale du consortium de biofilms. Ceci peut être réalisé en fournissant à la communauté une capacité de formation de biofilms, en produisant des substances pouvant servir d'éléments nutritifs aux espèces qui cohabitent, en éliminant les métabolites ralentissant la croissance, ou par une combinaison de tous ces facteurs (**Giaouris et al., 2015**).

Les résultats de l'**association de bactéries de l'espèce *L. monocytogenes*** montrent qu'il y a eu une forte formation de biofilms durant toute la période d'incubation sans qu'il y ait une différence entre l'aérobiose et la microaérophilie.

Rappelons qu'au sein des biofilms mono-espèces, les bactéries avaient donné des formations très variées en termes de capacité de production de biofilms. Malgré l'hétérogénéité supposée des suspensions, il y a eu une probable synergie entre ces différentes bactéries qui a abouti à une forte formation de biofilms.

Les résultats de l'association ***E. coli* et *L. monocytogenes*** montrent qu'il y a eu un effet de synergie entre les deux espèces. Les biofilms formés par *L. monocytogenes* seule avaient tendance à varier entre fort et moyen. Avec la présence d'*E.coli*, l'indice de formation des biofilms a été maintenu durant toute la période d'incubation.

Cette effet de synergie entre différentes souches bactériennes composant un biofilm multi-espèces dont *L. monocytogenes* et *E. coli* a été décrit par plusieurs auteurs (**Giaouris et al., 2013. ; Larsen et al., 2014 ;Buchanan et al., 2017**).

Les résultats de l'association de ***E. coli* et *L. innocua*** montrent que les espèces testées se sont comportées de la même manière que lorsqu'elles avaient été testées seules. Elles ont conduit à la formation et le maintien de forts biofilms durant toute la période d'incubation, que ce soit dans les conditions d'aérobiose ou de microaérophilie. Un effet de synergie entre les deux bactéries s'est probablement produit. Cet effet entre *L. innocua* et des bactéries à Gram négatif a été supposé aussi par **Heir et al. (2018)**. Par contre, Cette synergie n'a été observée que sur le support en polystyrène par opposition à celui en plastique avec une production moyenne de biofilms issus de cette association notamment dans les conditions d'aérobiose.

Partie expérimentale

Les résultats de l'association des trois espèces bactériennes, *E. coli* ; *L. monocytogenes* et *L. innocua*, montrent que cette association a induit une forte production de biofilms durant toute la période d'incubation que ce soit en aérobiose ou en microaérophilie ; ce qui suggère un effet de synergie entre les trois bactéries. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Heir et al. (2018)** qui a constaté que dans des cultures multi-espèces et multi-bactériennes formés par *L. monocytogenes*, *L. innocua* et des bactéries *Gram -*, les effets de croissance compétitifs conduisent à la domination d'une souche concurrente forte de *L. monocytogenes* qui n'a été que légèrement inhibée par *L. innocua* et a montré de fortes capacités compétitives dans des cultures mixtes avec des bactéries Gram-négatives résidentes. Cet effet avait été attribué à la compétition pour les nutriments entre les différents espèces (**Cornu et al., 2002; Delignette-Muller et al., 2006; Guillier et al., 2008**). Dans notre étude, l'effet de synergie observé peut être relié à la nature du support, le phénomène de compétitivité s'est probablement produit dans l'étude de **Heir et al. (2018)** à cause aussi, de la nature du support (inox). En changeant de support (polystyrène) l'effet inverse s'est produit.

Les résultats obtenus lors de l'association *L. monocytogenes* et *L. innocua* montrent que cette association a favorisé la croissance du biofilm en aérobiose.

En microaérophilie, un ralentissement de la croissance des biofilms a été observé après 72h d'incubation. Ce ralentissement a été suivi par la suite par une forte production de biofilms à 6j d'incubation. Cette fluctuation dans la formation du biofilm peut être expliquée soit par un phénomène d'adaptation et ou cohabitation des deux bactéries qui a nécessité un peu de temps afin d'arriver à un stade d'équilibre entre les deux bactéries et une stabilité dans la formation du biofilm. Une explication complètement différente peut aussi être supposée, il s'agirait d'un phénomène de compétition et ou d'inhibition exercé par l'une des deux bactéries sur la deuxième ; favorisant ainsi le développement de l'une des deux bactéries au dépend de l'autre comme l'avait rapporté **Heir et al., (2018)**. Cette situation peut aussi aboutir à la fin à une forte production de biofilm.

L'étude de la formation de biofilms à partir de suspensions bactériennes **multi-espèces** à la concentration de **4 McFarland** a montré que l'adhésion de *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *E.coli* était encore plus forte et plus précocée. Cela pourrait être dû au nombre initial de cellules bactériennes en contact avec la surface qui est plus important, ce qui a favorisé l'adhésion et la formation des biofilms ainsi qu'un probable effet de synergie entre les différentes espèces. Il a été constaté par plusieurs auteurs que l'augmentation de la densité cellulaire favoriserait

Partie expérimentale

l'émission de signaux chimiques de cellule à cellule impliqués dans les interactions entre les espèces formant les biofilms (**Kjelleberg et Molin, 2002; Li et Tian, 2012**).

Cette synergie était moins importante dans les conditions d'aérobiose sur le support en plastique et plus importante dans les conditions de microaérophilie par rapport aux biofilms formés sur le polystyrène. Cela laisse penser que la nature du support influence la formation et le maintien des biofilms.

Effet du séroroupe sur la capacité *L. monocytogenes* à former des biofilms

Dans les biofilms **mono espèce**, les résultats obtenus montrent que toutes les souches de *L. monocytogenes* appartenant au séroroupe IIa ont montré pratiquement le même pouvoir d'adhésion, lequel a conduit à la formation de biofilms, à l'exception de la souche *L.m* 038 qui a montré une adhésion moyenne après 24h d'incubation, et qui a conduit à une forte production de biofilms après 72h d'incubation. Cela laisse suggérer qu'au sein du même séroroupe, la bactérie peut se comporter de manière différente par rapport à sa force d'adhésion et de formation de biofilms dans les premiers jours d'incubation sous différentes conditions.

Nous avons également observé que la souche *L.m* 036 qui appartient au séroroupe IIb a eu un comportement différent, en se développant plus en microaérophilie qu'en aérobiose avec un pouvoir d'adhésion moindre et une formation moyenne de biofilms ($p < 0,05$) par rapport aux autres souches.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par **Borucki et al. (2003) et Pan (2009)**, qui ont constaté que les souches de *L. monocytogenes* appartenant au séroroupe IIa avaient particulièrement une grande capacité à former des biofilms. D'autres auteurs, tels que **Kalmokoff et al. (2001)** et **Kadam et al. (2013)** ont également montré que sous certaines conditions, la capacité de *L. monocytogenes* à adhérer aux surfaces pouvait être liée au facteur séroroupe.

Certains travaux impliquant un plus grand nombre d'isolats ont suggéré qu'il existe des différences significatives dans la capacité des souches à s'attacher sur les surfaces avec des pouvoirs d'adhésion plus élevés de certains sérogroupe par rapport à d'autres (**Norwood et Gilmour, 1999; Lundén et al., 2000**).

Partie expérimentale

Dans les biofilms **multi souches et multi-espèces**, les résultats de notre étude montrent qu'en aérobiose, toutes les associations de souches testées à 1 McFarland ont montré une forte adhésion dès les premières 24h d'incubation avec une formation importante de biofilms durant toute la période d'incubation.

En microaérophilie, quelques exceptions ont été remarquées : L'association *L.m* 038+ *L.m* 026 +*L.m* 043 (*L.m*/IIa) a montré une adhésion moyenne après 24h d'incubation. Ce ralentissement du processus d'adhésion pourrait être lié à la présence de la souche *L.m* 038 laquelle a montré une adhésion moyenne à 24h une fois testée seule (biofilms mono espèce).

L'association *L.m* 023 + *L.m* 026 + *L.i* (*L.m*/IIa + *L.i*) a montré une adhésion moyenne après 72h d'incubation, sachant que testées seules, chaque souche avait montré une forte adhésion à 24h. Cela laisse supposer que les souches bactériennes peuvent avoir un comportement différent lors de leur présence simultanée au sein d'un biofilm multi-espèces, soit en augmentant ou en diminuant la capacité d'adhésion. Un effet d'antagonisme et de force de persistance peut aussi être supposé. Cette différence de comportement de *L. monocytogenes* a été déjà rapportée par **Giaouris et al. (2015)**, **Jay et al. (2005)** et **Borucki et al. (2003)**. Des études ont identifié aussi *L. innocua* comme inhibiteur spécifique de la croissance de certaines souches de *L. monocytogenes*, tandis que d'autres *L. monocytogenes* ont résisté à cet effet compétitif (**Heir et al., 2018**).

Une partie de ces résultats confirme l'hypothèse que nous avons émise lors de l'étude des biofilms relatifs aux associations de *L. monocytogenes* sur le support en plastique (bactéries non sérotypées) qui supposait l'influence du facteur séro groupe sur la force de formation des biofilms.

Effet du renouvellement du milieu de culture sur les biofilms

Le renouvellement du milieu de culture a permis un développement encore plus important des biofilms en aérobiose et en microaérophilie. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Auger (2012)**, qui a noté qu'une supplémentation en glucose favorisait le développement des biofilms. De par sa composition, le TSB a permis un apport supplémentaire en nutriments, ce qui a vraisemblablement amélioré les conditions de développement des bactéries. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Stepanovic et al. (2004)** qui ont constaté que *L. monocytogenes* formait des biofilms plus importants en présence d'un milieu riche en nutriments. **Zeraik et Nitschke (2012)** ainsi que **Azam et al. (2018)** qui ont montré que la supplémentation du milieu de culture avec diverses substances influençait significativement la capacité de *L. monocytogenes* à former des biofilms.

Partie expérimentale

Effet de la durée d'incubation

Le temps d'incubation est un facteur important dans le processus de formation du biofilm (**Bonsaglia et al., 2014**). L'adhérence des souches testées a été observée après 24h d'incubation. Ces résultats confirment les résultats de **Lundén et al. (2000)** qui ont démontré que la souche la plus répandue de *L. monocytogenes* trouvée dans les usines de transformation des aliments avait une bonne capacité d'adhérence et ne nécessitait qu'un court temps de contact pour la fixation.

La formation des biofilms était de plus en plus importante durant les premières 72h d'incubation pour donner par la suite un biofilm qui avait tendance à se stabiliser pendant les dernières 72h. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Wang et al. (2015)** qui ont observé que *L. monocytogenes* a montré une densité cellulaire significativement supérieure au 3^{ème} jour d'incubation par rapport au 1^{er} jour, mais une densité cellulaire similaire entre le jour 1 et le jour 5, et les jours 3 et 5 d'incubation. Des études antérieures sur les biofilms de *L. monocytogenes* ont démontré qu'après une adhésion initiale rapide aux surfaces, les populations bactériennes n'augmentent pas de manière très importante (**Barbosa et al., 2017**).

Jay et al. (2005) ont rapporté que les biofilms de *L. monocytogenes* pouvaient atteindre leur maximum de développement après 72h d'incubation.

Nos résultats se rapprochent aussi de ceux obtenus par **Han et al. (2014 ; 2017)** qui ont montré que la masse des biofilms formée par *E. coli* sur la surface de polystyrène augmente avec le temps d'incubation.

Effet de la nature du support sur la formation des biofilms

La formation des biofilms a été testée sur les deux supports : le polystyrène et le plastique. Les résultats ont montré une différence significative dans la capacité des bactéries testées à former des biofilms sur les deux types de supports.

D'ordre général, *L. innocua* était fortement formatrice de biofilms sur les deux supports en aérobiose et en microaérophilie, à 1 et à 4 McFarland. Un ralentissement dans la formation des biofilms sur le plastique a été tout de même remarqué en fin d'incubation en microaérophilie à 1 McFarland et en aérobiose à 4 McFarland. En association avec les autres espèces, tous les biofilms formés étaient forts à l'exception de l'association *L. innocua* et *E.coli* qui a conduit à la formation de biofilms moyens à partir de 48h d'incubation.

L. monocytogenes a adopté un comportement différent par rapport à la nature du support, elle était fortement productrice de biofilms sur le support en plastique aux deux concentrations testées. Un léger ralentissement a été remarqué vers la fin de l'incubation dans les conditions d'aérobiose. Sur le support en polystyrène, elle a montré une capacité hétérogène à former des

Partie expérimentale

biofilms en aérobiose et à 1 McFarland. En microaérophilie, sur le même support (polystyrène) elle a été globalement fortement formatrice de biofilms. A la concentration de 4 McFarland, elle a formé de forts biofilms dans les deux conditions d'incubation avec un léger ralentissement en fin d'incubation en aérobiose sur le support en plastique.

Quand elle était en association avec les autres espèces, tous les biofilms formés étaient forts dans toutes les conditions testées sur les deux supports.

Sur le support en polystyrène, *E.coli* a été fortement productrice de biofilms dans toutes les conditions testées. Sur le support en plastique la force de formation des biofilms formés à partir des suspensions à 1 McFarland diminuait aboutissant ainsi à une formation moyenne de biofilms vers la fin de l'incubation.

En association avec les autres espèces, tous les biofilms formés étaient forts à l'exception de l'association *E.coli* et *L.innocua*, testée sur le support en plastique dans les conditions d'aérobiose, qui a conduit à la formation de biofilms moyens vers la fin de la période d'incubation à partir (à 1 et 4 McFarland).

Blackman et Frank (1996) ont observé que les supports en polystyrène favorisent une formation plus rapide et plus étendue des biofilms par rapport à ceux en plastique.

La formation de biofilms comprend une première étape lorsque les microorganismes planctoniques commencent à se fixer à la surface où des facteurs tels que les caractéristiques physico-chimiques de la matière pourraient avoir une influence (**Cappitelli et al., 2014**). Par exemple, l'acier inoxydable et le verre, sont plus hydrophiles. Ces surfaces permettent généralement une plus grande fixation bactérienne et formation de biofilms que les surfaces hydrophobes telles que le téflon, le nylon, le caoutchouc et les polymères fluorés. Dans la plupart des cas, les bactéries s'attachent davantage aux surfaces hydrophiles qu'aux surfaces hydrophobes, mais les différences d'attachement n'ont pas nécessairement une importance pratique (**Mafu et al., 1990, Blackman et Frank 1996, Hyde et al., 1997, Snide et Carballo 2000**).

L'adhérence des cellules bactériennes est influencée aussi par les propriétés physicochimiques de la surface des cellules, lesquelles sont également influencées par des facteurs tels que le taux de croissance microbien, le milieu de croissance et les conditions de culture (durée et température). Les bactéries ont une charge de surface négative et se comportent généralement comme des particules hydrophobes, mais le degré d'hydrophobie peut changer avec la phase de croissance. L'hydrophobicité diminue généralement à mesure que le taux de croissance augmente (**Boulange-Peterman, 1996 et Boulange-Peterman et al., 1997**). **Herald et Zottola (1988), Hood et Zottola (1997) et Smoot et Pierson (1998)** ont démontré que

Partie expérimentale

Listeria et *Yersinia* manifestaient un attachement accru lorsque les micro-organismes atteignaient leur activité métabolique la plus élevée. L'adhérence d'*E.coli* quant à elle, est inversement proportionnelle au degré de charge de surface négative mais n'est pas influencée par l'hydrophobie (Gilbert *et al.*, 1991 ; Carpentier et Cerf, 1993).

Des études antérieures ont relié la formation des biofilms multi-espèces à la nature de la liaison entre le support et les premières bactéries qui adhèrent, ainsi, la séquence d'attachement de plusieurs espèces peuvent influencer la composition en espèces du biofilm résultant. La population initiale qui se fixe peut modifier la surface afin que les espèces suivantes puissent se lier via une association de cellule à cellule. Dans certains cas, la fixation d'une deuxième espèce peut accroître la stabilité de la population de biofilms (McEldowney et Fletcher, 1987).

Sensibilité des bactéries formant les biofilms aux biocides

À l'intérieur de la structure tridimensionnelle des biofilms, les microorganismes sont protégés de la dessiccation mais également de l'action des biocides (Hoiby *et al.*, 2010 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les cellules du biofilm présentent des résistances aux agents antimicrobiens beaucoup plus élevées que leurs équivalents planctoniques (Mah *et al.*, 2001).

L'élimination des cellules attachées de manière irréversible est difficile et nécessite l'application d'actions mécaniques ou l'utilisation d'agents chimiques tels que les enzymes, les détergents, les tensioactifs et les désinfectants (Gelinas *et al.*, 1994 ; Oh et Marshall 1995 ; Bower *et al.*, 1996 ; Richards, 1999 ; Sinde et Carballo, 2000). Il faut savoir que la nature des produits avec lesquels les surfaces sont nettoyées peut influencer la capacité des bactéries à adhérer sur ces surfaces et leur sensibilité aux biocides. Notre choix de produits s'est porté sur des solutions de détergents désinfectants acides *et* alcalins. Ces deux types de détergents fréquemment utilisés en industrie agroalimentaire sont combinés à l'ammonium quaternaire (AMQ) qui est une molécule désinfectante largement utilisée dans le traitement des surfaces ouvertes en raison de son pouvoir moussant et détersif. Nous avons sélectionné aussi l'amine comme molécule désinfectante en raison de sa fréquente utilisation pour le traitement des surfaces et des circuits, seule ou en association avec des détergents alcalins ou acides. La dernière molécule que nous avons sélectionnée pour réaliser nos tests est l'eau de javel qui est un désinfectant oxydant de moins en moins utilisé en industrie agroalimentaire en raison de ses effets corrosifs et de son instabilité, mais qui reste validé dans les protocoles de désinfection de grands groupes industriels en raison de son faible coût.

Partie expérimentale

La sensibilité des biofilms mono espèce formés par *Listeria monocytogenes* a été testée.

Plusieurs études sur la résistance des biofilms de *L. monocytogenes* aux biocides ont montré que les biofilms étaient sensibles aux biocides et que la densité cellulaire pouvait diminuer de manière significative suite à l'utilisation de ces derniers (**Pan et al., 2006**).

Les biofilms formés par les souches appartenant aux sérogroupes IIa ont montré des sensibilités différentes aux biocides testés en fonction de la nature du principe actif et des conditions d'incubation. En général, ces biofilms étaient plus faciles à éliminer quand ils se développaient dans les conditions d'aérobiose. Ils ont montré tous des pourcentages de réduction des biofilms relativement réguliers lors de l'utilisation de l'amine et l'eau de javel.

Concernant les biofilms formés par la souche appartenant au séro groupe IIb, les molécules les plus efficaces étaient aussi l'amine et l'eau de javel. Ces résultats laissent supposer que le séro groupe des souches n'a pas d'impact sur l'action des biocides. Cependant, l'élimination d'un biofilm de force moyenne formé par la souche L.m/IIb dans des conditions d'aérobiose était plus difficile que l'élimination d'un biofilm fort formé par la même souche en condition de microaérophilie. Ainsi, l'efficacité du biocide serait probablement liée plus aux conditions du développement du biofilm qu'au sérotype de la souche.

Il est à noter que les travaux de recherche réalisés sur l'efficacité des désinfectants sur les biofilms à *L. monocytogenes* se sont intéressés beaucoup plus à la nature du désinfectant et aux conditions de son utilisation qu'au sérotype de la souche responsable du biofilm.

L'efficacité des détergents désinfectants acides -à titre d'exemple- sur les biofilms de *L. monocytogenes* a été discutée par plusieurs auteurs tels que **Frank et Koffi (1990)**, qui ont constaté que les désinfectants anioniques acides étaient inefficaces contre les biofilms de *L. monocytogenes*. Plusieurs auteurs ont rapporté que *L. monocytogenes* peut s'adapter aux conditions acides, ces résultats sont tous axés sur le maintien de l'homéostasie intracellulaire (**Cotter et al., 2001**). Nos résultats ont montré que le DDAC testé était efficace contre les biofilms de la plupart des souches de *L. monocytogenes* avec des pourcentages de réduction dépassant parfois les 85%, mais il a été d'une efficacité moindre sur la souche 026 et inefficace contre la souche 038 dans les conditions de microaérophilie. Ce résultat confirme celui obtenu par **Ibusquiza et al. (2011)** qui ont affirmé que la tolérance à l'acide chez *L. monocytogenes* semble dépendre de la souche en question.

Concernant la résistance aux AQ, certains auteurs affirment que chez *L. monocytogenes*, la formation de biofilm est elle-même une cause de tolérance accrue à ces derniers en raison des modifications de la fluidité membranaire de la cellule. Ces modifications sont principalement dues à une diminution de la proportion d'acides gras à chaîne ramifiée, ainsi qu'une

Partie expérimentale

augmentation significative de la quantité d'acides gras saturés. Par conséquent, l'hydrophobicité de la membrane est accrue, ce qui favorise une adhérence amplifiée aux surfaces (**Miladi et al., 2013 ; Yoon et al., 2015**). Plusieurs travaux affirment que différents sérotypes de *L. monocytogenes* sont sensibles aux AQ à quelques exceptions près (**Ren et Frank, 1993 ; Dhowlaghar et al., 2017 ; Henriques et Fraqueza, 2017; Piercey et al., 2017**). La tolérance aux AQ a été aussi rapportée par plusieurs auteurs (**Dutta et al., 2013 ; Elhanafi et al., 2010; Müller et al., 2013; Müller et al., 2014**). Ces résultats sont à discuter car les concentrations testées sont en général inférieures à celles utilisées dans la pratique (**Elhanafi et al., 2010; Müller et al., 2014 ; Gerba, 2015; Kastbjerg et Gram, 2012**). Les résultats d'une étude réalisée par **Henriques et Fraqueza (2017)** utilisant des concentrations qui se rapprochent de celles utilisées en pratique, indiquent qu'il existe effectivement des conditions dans lesquelles *L. monocytogenes* pourrait persister sur des surfaces de l'industrie alimentaire, notamment lorsque des désinfectants contenant du AQ sont utilisés surtout si l'opération de rinçage est mal réalisée.

Le développement de la tolérance vis-à-vis des désinfectants à base de chlore quant à elle, a été décrit comme étant peu probable sur des suspensions cellulaires de *L. monocytogenes*.

Cependant, il a été démontré que le traitement de cultures bactériennes avec des concentrations croissantes d'hypochlorite de sodium pouvaient favoriser l'augmentation de la CMI de ce désinfectant (**Brackett, 1987; Lundén et al., 2003**). Des travaux réalisés sur les biofilms ont démontré que la sensibilité de *L. monocytogenes* aux produits chlorés dépendait des conditions de culture, entre autre, la nature du support et cela indépendamment du sous-type, de la densité cellulaire du biofilm et de sa morphologie (**Folsom et Frank, 2006**).

Concernant les biofilms à *L. innocua*, cette dernière a été particulièrement sensible aux biocides avec des pourcentages de réduction supérieurs à 80% pour toutes les molécules testées en aérobiose et des pourcentages dépassant les 40% en microaérophilie. Ces résultats peuvent être expliqués par l'hypothèse suivante : la non pathogénicité de cette bactérie la rend plus sensibles aux biocides. Nous pouvons penser à l'implication des facteurs de virulences dans les phénomènes de résistance.

Sur les biofilms à *E.coli*, l'eau de javel et le DDAC ont été les deux molécules les plus efficaces sur les biofilms formés par *E.coli* avec les pourcentages de réduction des biofilms les plus élevés. Pour l'eau de javel, ce résultat peut être expliqué par la nature oxydante du produit qui lui a permis une meilleure efficacité. Quant au DDAC, le pH du produit, la présence de matière détergente ainsi que le pouvoir détersif propre aux AQ laisse supposer que l'élimination

Partie expérimentale

des exo polysaccharides était encore plus facile permettant ainsi une meilleure diffusion au désinfectant.

Des études réalisées sur l'efficacité des désinfectants oxydants sur les biofilms formés par *E.coli* ont clairement indiqué que ces produits fonctionnent efficacement sur une seule cellule attachée ou petit agrégat de cellules attachées, mais beaucoup moins sur les biofilms couvrant de grandes surfaces. La résistance des biofilms aux biocides aurait tendance à augmenter avec la maturation, elle est en corrélation positive avec la production de la matrice et négative avec l'augmentation du temps de contact avec le biocide (**Kirby et al., 2012; Bas et al., 2017**).

Des Tests ont aussi été réalisés sur les biofilms multi-espèces. Le rôle de ces derniers dans la persistance des bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* n'est pas encore très clair.

Des études réalisées avec des souches persistantes ou pas, et leur capacité à survivre dans un biofilm multi-espèces devraient être réalisées afin de fournir des informations complémentaires (**Larsen et al., 2014**). Plusieurs auteurs ont rapporté que la tolérance de *L. monocytogenes* aux désinfectants augmentait dans les cultures doubles des biofilms (**Van der Veen et Abee, 2011**). D'autres auteurs ont signalé une augmentation de la tolérance aux désinfectants de *L. monocytogenes* dans des biofilms d'espèces mélangées (**Fatemi et Frank, 1999; Norwood et Gilmour, 2000**). Notre étude a démontré que l'association des souches L.m/IIa a agi par exemple en faveur de la persistance des biofilms après traitement avec les différents biocides, et cela sous différentes conditions et en utilisant différentes molécules. En comparant les sérotypes des souches, aucune relation n'a pu être établie entre ces derniers et la capacité des biofilms formés à partir de ces associations à persister et résister aux biocides.

Pour les autres associations, les résultats des pourcentages de réduction des biocides étaient très hétérogènes. Cela laisse supposer que la sensibilité des bactéries formant le biofilm aux biocides varie en fonction de la composition du biofilm. Quelques hypothèses peuvent être avancées : La matrice d'un biofilm formé par des *L. monocytogenes* seules serait complètement différente d'une matrice formée par une association de différentes espèces bactériennes (*L.monocytogenes*, *L.innocua* et *E.coli*). Aussi, la possibilité de mutations ou de transfert de gènes de résistance pourraient être mise en cause ainsi que des modifications probables dans les comportements de chacune des espèces ou souches bactériennes au sein des différentes associations.

Quelques travaux de recherches ont traité l'action des désinfectants sur les biofilms multi espèces. Par exemple, l'efficacité des AMQ sur les biofilms formés par une association de souches de *E. coli* et *L.m* a été décrite par **Chen et al. (2014)**. **Rossoni et Gaylarde (2000)** ont

Partie expérimentale

montré que l'hypochlorite était plus efficace que d'autres désinfectants oxydants pour inactiver une culture mixte d'*E.coli* en association avec d'autres bactéries.

Notre étude sur la sensibilité des biofilms aux biocides a montré dans sa globalité que les produits testés étaient plus ou moins efficaces en fonction de la nature du biofilm et des conditions d'incubation.

Les pourcentages de réduction des biofilms formés en condition d'aérobiose étaient beaucoup plus importants que ceux obtenus en conditions de microaérophilie, cela laisse supposer que la microaérophilie a agi en faveur de la persistance des biofilms formés.

Nous avons remarqué également que les pourcentages de réduction des biofilms multi-espèces étaient moins importants que ceux obtenus sur les biofilms formés par une seule espèce bactérienne. Cela laisse supposer que les biofilms composés par plusieurs espèces seraient plus difficiles à éliminer en raison d'un effet probable de synergie et de protection inter bactérienne associés à une complexité plus importante de la matrice.

Les pourcentages de réduction les plus élevés ont été observés en utilisant l'amine et le DDAL.

Nous avons constaté aussi que l'eau de javel et l'amine ont montré une efficacité assez régulière sur l'ensemble des biofilms testés. L'effet oxydant de l'eau de javel a probablement favorisé la réduction des biofilms en agissant non seulement sur les bactéries mais aussi sur la matrice composant le biofilm (les EPS entre autres). L'amine en raison de son caractère amphiphile a eu probablement plus de facilité à pénétrer à l'intérieur des biofilms et causer d'importants pourcentages de réduction.

Les ammoniums quaternaires restent des désinfectants efficaces, leur pouvoir détersif ainsi que leur utilisation avec des solutions nettoyantes leur ont probablement permis de donner des pourcentages de réduction assez importants sur certaines souches, espèces et associations bactériennes.

Ronner et Wong (1993) ont constaté que les désinfectants au chlore et les désinfectants anioniques étaient plus efficaces pour éliminer l'EPS de *Listeria* par rapport aux ammoniums quaternaires et l'iode. **Gelinas et al. (1984)** ont suggéré qu'une augmentation du temps de contact des désinfectants au chlore de 5 à 30 min améliorerait considérablement l'efficacité du chlore.

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer quels types de désinfectants sont les plus efficaces contre les biofilms. Les résultats de ces études sont contradictoires, probablement en raison des différences dans la composition des biofilms, les méthodes et

Partie expérimentale

les désinfectants testés (**Belessi et al., 2011**; **Cruz et Fletcher, 2012**). Des bactéries résistantes à plusieurs désinfectants ont été isolées (**Bore et Langsrud, 2005**), mais dans la plupart des cas, l'échec de la désinfection n'était pas dû à la résistance (**Meyer, 2006** ; **Carpentier et Cerf, 2011**). Certains auteurs suggèrent que les protocoles de désinfection doivent inclure une alternance entre des désinfectants chimiques ayant des propriétés et des mécanismes d'action différents, ou entre une désinfection chimique et physique telle que la chaleur ou les UV (**Larsen et al., 2014**).

La nature du détergent joue aussi un rôle important dans la capacité des bactéries à adhérer et former des biofilms. Le nettoyage avec un acide ou un alcalin fort rendrait la surface hydrophile, alors que la nettoyer avec un acide faible produit un effet hydrophobe (**Verran et al., 2000**) pouvant ainsi influencer le pouvoir d'adhérence des bactéries. Ce nettoyage peut éliminer 90% ou plus des micro-organismes associés à la surface, mais on ne peut pas compter sur cette procédure pour les tuer. Les bactéries peuvent se déposer à d'autres endroits et, avec le temps, l'eau et les nutriments peuvent former un biofilm. Par conséquent, la désinfection en plus du nettoyage doit être mise en œuvre (**Gibson et al., 1999**).

La réduction de la sensibilité aux biocides des microorganismes présents dans les biofilms est multifactorielle. La matrice extracellulaire empêche la diffusion des biocides dans le biofilm par simple effet barrière et/ou par interactions électrostatiques en séquestrant certaines molécules à la surface de la structure. De même, le métabolisme cellulaire est fortement réduit à l'intérieur du biofilm en raison de la raréfaction en nutriments et la faible teneur en oxygène. Dans cet état physiologique proche de la dormance, les cellules deviennent réfractaires à de nombreux agents antimicrobiens (**Lewis, 2007** ; **Ganeshnarayan, 2009**). Par ailleurs, la croissance du biofilm est corrélée avec l'adaptation phénotypique des cellules dont il a été montré qu'elle pouvait conduire à une augmentation importante de la résistance aux biocides (**Bridier et al., 2011**). En particulier, le système de communication intercellulaire (QS) présent chez certaines bactéries est impliqué, au moins partiellement, dans l'induction d'un phénotype spécifique du biofilm et permet, entre autres, l'activation de certains gènes qui codent pour des enzymes protectrices des stress oxydants (ex. : catalase) (**Parsek et Greenberg, 2005**).

Il convient de noter aussi que dans la plupart des études traitant de l'efficacité des biocides sur les biofilms, les biofilms sont désinfectés sans étape de nettoyage préalable. Le nettoyage est supposé éliminer la majorité du biofilm. En règle générale, les biofilms épais ne se forment pas sur les surfaces lisses en contact avec les aliments, soumises à un nettoyage quotidien et à la désinfection, mais sont plus susceptibles de se former dans des zones pas aussi bien nettoyées

Partie expérimentale

(comme les sols et les murs où il peut y avoir des crevasses ou des fissures), ou sur du matériel difficile à nettoyer (**Holah et Gibson, 2000**).

La présence de concentrations élevées de bactéries et l'interférence avec les matières organiques due à un nettoyage insuffisant avant la désinfection diminue l'activité et donc l'efficacité des désinfectants couramment utilisés dans l'industrie (**Gaulin et al., 2011**). Cela ne signifie pas nécessairement que la concentration utilisée est inférieure, mais que son efficacité est amoindrie par rapport aux prévisions de la quantité initialement déployée. Cependant, d'autres facteurs tels que l'échec du dosage ou un rinçage inadéquat sont également responsables de la génération de tolérances due à la formation de zones dans lesquelles des concentrations sublétales de désinfectants sont présentes (**Rodriguez-Lopez et al., 2018**).

Les propriétés des biofilms offrant une protection contre les stress environnementaux et une résistance accrue aux agents antimicrobiens constituent un défi majeur (**Coenye, 2010; Bridier et al., 2015**). De plus, la résistance est généralement accrue lorsque plusieurs espèces bactériennes coexistent dans des biofilms.

Ces effets synergiques protecteurs sont très importants dans de nombreux aspects de l'évaluation des risques et doivent être pris en compte dans la sélection et l'évaluation des procédures de nettoyage et désinfection. Les biofilms bactériens peuvent supporter des concentrations élevées de biocides et de nouvelles stratégies pour les contrôler doivent donc remplacer ou compléter l'utilisation de désinfectants classiques, par exemple en ciblant la matrice extracellulaire de manière à provoquer une dispersion ou à augmenter la sensibilité aux antimicrobiens (**Giaouris et al., 2015**).

Conclusion

Conclusion

Depuis plusieurs années le biofilm est reconnu comme la forme de développement majoritaire des bactéries dans la nature. Ce mode de développement confère aux bactéries de nombreuses protections vis-à-vis des différents stress environnementaux.

La formation des biofilms sur les surfaces dans les établissements agroalimentaires pose de réels problèmes, car elle cause la persistance des bactéries dans l'environnement. Ce qui pourrait être à l'origine de contaminations croisées des denrées alimentaires.

L'étude de la contamination des surfaces est un des moyens qui permet l'évaluation de la persistance des bactéries dans les structures fabriquant ou traitant les denrées alimentaires.

Les résultats de notre étude ont révélé que les surfaces prélevées étaient contaminées par les trois espèces recherchées : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Escherichia coli*.

Leur isolement, identification et confirmation ont été réalisés dans le but de tester dans un premier temps leur capacité à adhérer et à former des biofilms sur deux supports différents, l'un en plastique et l'autre en polystyrène, puis de tester leur sensibilité aux biocides au sein de biofilms mono et multi espèces.

Nous avons également testé des souches de *Listeria monocytogenes* caractérisées phénotypiquement lors d'une étude antérieure afin d'évaluer l'influence des sérotypes sur la formation des biofilms et sur leur sensibilité aux biocides.

Les tests d'adhésion et de formation de biofilm ont été réalisés sur des microplaques en polystyrènes et des cuves en plastiques. La force de la formation des biofilm des bactéries et de différentes associations bactériennes a été estimée après une incubation de 6 j sous différentes conditions (aérobiose, microaérophilie, renouvellement du milieu de culture, concentrations bactérienne) en réalisant une coloration au CV suivie d'une mesure de la DO ou de l'ABS. Les résultats ont révélé que les espèces testées pouvaient adhérer et former des biofilms sur les deux supports, plastique et polystyrène. La force de formation des biofilms variait en fonction des différents facteurs testés. Elle a été plus importante en augmentant la concentration bactérienne et en renouvelant le milieu de culture. L'espèce *L. monocytogenes* a montré particulièrement une grande capacité à former des biofilms sous les différentes conditions. Sa présence au sein d'un biofilm multi espèces favorisait sa formation. Parmi les bactéries sérogroupées, les L.m/IIa ont présenté une meilleure capacité à former les biofilms par rapport aux L.m/IIb.

Conclusion

L. innocua et *E. coli* ont montré des capacités moyennes à grandes à former des biofilms. Leur présence au sein des biofilms multi espèces diminuait sous certaines conditions la force de formation des biofilms.

Les résultats obtenus ont montré que le support en polystyrène était globalement plus favorable au développement des biofilms que le support en plastique

L'étude de la sensibilité aux biocides a été réalisée en calculant les pourcentages de réduction des biofilm en utilisant 04 biocides différents : DDAC, DDAL, DA et eau de javel à différentes concentrations.

Les résultats ont révélé que les désinfectants étaient plus ou moins efficaces en fonction de la nature du biofilm et des conditions d'incubation. Les pourcentages de réduction les plus élevés ont été observés en utilisant l'amine et le DDAL.

L. innocua a présenté une sensibilité particulière aux désinfectants testés.

Les taux de réduction des biofilms formés en condition d'aérobiose étaient beaucoup plus importants que ceux obtenus en conditions de microaérophilie. Globalement, le pourcentage de réduction des biofilms variait de 100% sur certains biofilms à 0% pour d'autres. Aussi, les pourcentages de réduction des biofilms multi-espèces étaient moins importants que ceux obtenus sur les biofilms formés par une seule espèce bactérienne.

Les derniers progrès réalisés dans la compréhension du cycle de développement du biofilm ont indiqué que, dans la plupart des cas, il s'agit d'un processus dynamique dans lequel des facteurs tels que les conditions nutritionnelles, la température, la tension d'oxygène et l'osmolarité peuvent avoir de fortes influences sur la formation des biofilms et leur sensibilité aux biocides.

Des travaux de recherche sont encore nécessaires pour une meilleure compréhension des phénomènes intervenants dans la formation des biofilms sous différentes conditions et leurs effets sur la sensibilité aux biocides. Ces informations permettraient aux industriels de mieux adapter leurs protocoles de nettoyage et désinfection afin de prévenir la formation des biofilms, évitant ainsi les problèmes de contaminations croisées que peuvent générer les bactéries hébergées au sein des biofilms.

Recommandations et perspectives

Recommandations et perspectives

La réalisation de cette étude nous a permis de constater la complexité du monde bactérien.

Les processus permettant aux bactéries de s'adapter au milieu dans lequel elles se trouvent reste énigmatique. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans les phénomènes de persistance des bactéries dans l'environnement et de résistance de celle-ci aux différents protocoles visant à minimiser leur présence ainsi que le risque généré par cette dernière sur la santé publique. Pour cela, nous pouvons suggérer ce qui suit :

- Multiplier les travaux de recherches sur la formation des biofilms par différentes bactéries pathogènes ou pas et sous différentes conditions afin de permettre une meilleure compréhension de ce mode de vie bactérien dans différents secteurs. Des solutions efficaces et bien adaptées pour lutter contre la persistance des bactéries pourront être suggérées.
- Collaborer avec les acteurs principaux de l'industrie agroalimentaire dans le but de les accompagner dans la lutte contre la contamination par les bactéries pathogènes, en mettant à leur disposition les résultats des travaux de recherches et en les aidants à mettre en pratique les solutions proposées.
- Impliquer les vétérinaires chargés du suivi et du contrôle des industriels dans les procédures visant à sélectionner et valider les biocides utilisables dans ce secteur. Les autorités compétentes doivent leur fournir des outils nécessaires afin de maîtriser ce domaine et pouvoir aider au mieux les industriels.
- Attirer l'attention des autorités sur la nécessité de l'élaboration de textes législatifs qui préciseront les modalités d'utilisation des biocides dans différents secteurs d'activité (élevage, agroalimentaire, médical etc.) afin d'assurer une bonne utilisation de ces produits et une meilleure lutte contre l'émergence des problèmes de résistance.
- Inclure un chapitre traitant des biofilms dans le programme de formation des étudiants concernés par la technologie alimentaire (Vétérinaires).

Productions scientifiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adrião, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R.P., Chambel, L., Barata, B., Zilhao, I., Shama, G. and Perni, S., 2008. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. *International journal of food microbiology*, 123(1-2), pp.142-150.
- AFNOR, 1999. "Hygiène et sécurité des produits alimentaires. Glossaire hygiène" Fascicule de documentation, FD V 01-002."
- AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
- 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 (Doctoral dissertation).188p
- Allison D. G. and Gilbert P., 1992. Bacterial biofilms. *Science Progress*. 76: 305–321
- Allerberger F, Wagner M., Schweiger P, Rammer Hp, Resch A, Dierich Mp,. 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk.Euro Surveill.
- Alnnasouri, M., Dagot, C., and Pons, M. N., 2011. Comparison of four methods to assess biofilm development. *Water Science and Technology*, 63(3), 432-439.
- Alnnasouri, M., Lemaitre, C., Gentric, C., Dagot, C., and Pons, M. N., 2011. Influence of surface topography on biofilm development: experiment and modeling. *Biochemical engineering journal*, 57, 38-45.
- Alonso AN, Perry KJ, Regeimbal JM and Regan PM., 2014. Higgins DE Identification des déterminants de *Listeria monocytogenes* requis pour la formation de biofilm. *PLoS ONE*. 9 : 22 doi: 10.1371 / journal.pone.0113696.
- Amgar, A. 1998. Nettoyage et désinfection dans les entreprises alimentaires. ASEPT.
- Annous B., Fratamico P. and Smith, J. L., 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.
- Anonyme . 2007. Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus* 215 *Gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal*(96): 1-46.
- Anses (a) 2011. Caractéristiques et sources de *Listeria monocytogenes*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0171Fi.pdf>
- Anses. (b) 2011. *Listeria monocytogenes* : Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.

Références bibliographiques

<http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC2011sa0171Fi.pdf>.

Archibald, A. R., Hancock, I. C. and Harwood, C. R., 1993. Cell wall structure, synthesis, and turnover. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria* (pp. 381-410). American Society of Microbiology.

Auger M. 2012. Formation de biofilm in vitro par des souches d'*Escherichia coli* : impacts de la modification des conditions expérimentales. 90 pages.

Avril J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H., 2000. Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition. p171-211.

Azam M., Jan A.T., Kumar A., Siddiqui K., Mondal A. H., Mohd Q. and Rizwanul Haq., 2018. Study of pandrug and heavy metal resistance among *E. coli* from anthropogenically influenced Delhi stretch of river Yamuna. *Brazilian Journal of Microbiology*.

B

Barak, J. D., Jahn, C. E., Gibson, D. L. and Charkowski, A. O., 2007. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(9), 1083-1091.

Baranyi J, Roberts Ta., 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* ; 26 :199-218.

Bas, S., Kramer, M., & Stopar, D., 2017. Biofilm surface density determines biocide effectiveness. *Frontiers in microbiology*, 8, 2443.

Beauclair, J., Dumait, c., Gardia, C., Heye, P., Metay, M., gauter, J., and Vandevyver, B. (2011). "Fiche pratique de sécurité - ED106 - Usines agro-alimentaires, intégrer le nettoyage et la désinfection à la conception des locaux." INRS, France.

Beumer, R., Bloomfield, S. F., Exner, M., Fara, G. M., Nath, K. J., & Scott, E., 2000. Microbial resistance and biocides. In *International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH)*.

Behlau, I. et Gilmore, M. S., 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126, 1572-1581.

Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N. and Skandamis, P. N., 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S46eS52.

Belloin, J. C., 1993. L'hygiène dans l'industrie alimentaire: les produits et l'application de l'hygiène (No. 615.944 F3f). FAO.

Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J. M., 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 249-289.

Références bibliographiques

- Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K. and Zehnder A. J., 2003.** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. **59**(11): 3973-3977.
- Bénézech, T., Lelièvre, C., Membré, J.M., Viet, A.F. and Faille, C., 2002.** A new test method for in-place cleanability of food processing equipment. *Journal of Food Engineering*, **54**, 7- 15.
- Beumer, R. R., Bloomfield, S. F., Exner, M., Fara, G. M., Nath, K. J. and Scott, E., 2000.** Microbial resistance and biocides: A review by the International Forum on Home Hygiene (IFH). International Scientific Forum on Home Hygiene.
- Beutin, L. 1999.** *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res* **30**:285-298
- Bielaszewska M, Janda J, Blahova K, Minarikova H, Jikova E and Karmali M.,1997.** Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect* **119**: 299-305.
- Bird M.R and Fryer P. J., 1991.** An experimental study of the cleaning of surfaces fouled by whey proteins. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers* **69** 13–21
- Black J. G., 1993** .Microbiology, Principles and Applications, 2nd Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Blackman I.C and Frank J., 1996.** Growth of *Listeria Monocytogenes* as a biofilm on various food processing surfaces. *J Food Prot* **59**(8):827-39.
- Blel, W. Legentilhomme, P., Legrand, J., Bénézech, T., and Le Gentil-Lelièvre, C., 2008.** Hygienic design: effect of hydrodynamics on the cleanability of a food processing line. *AIChE Journal*, **54**, 2553-2566.
- Blenkinsopp SA and Costerton, JW., 1991.** Understanding bacterial biofilms, *Trends Biotechnol.* **9**: 138.
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M. H. and Rall, V. L. M., 2014.** Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food control*, **35**(1), 386-391.
- Borucki M. K., Peppin J. D., White D., Loge F. and Call D. R.,2003.** Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, *Appl Environ Microbiol*, **69**, 7336-7342.
- Bouayad L. , Hamdi T.M. , Naim M. , Leclercq A., and Lecuit M. 2015.** Prevalence of *Listeria spp.* and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from Broilers at the Abattoir Foodborne Pathogens and Disease VOL. **12**, NO. **7**.
- Bougle C. and Leroyer R. 2003.** Anti-infective coated central venous catheters: technical aspects and clinical studies. *J. Pharm. Clinique* , , **22** (3), 159-167.

Références bibliographiques

- Bore, E. and Langsrud, S. 2005.** Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 96-105.
- Boulange-Peterman L., Barroux B. and Bellon-Fontaine M.N. 1993.** The influence of metallic wettability on bacterial adhesion. *J Adhesion Sci Technol* 7(3):221-30.
- Boulange-Peterman, L. 1996.** Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling* 10(4):275- 300.
- Boulange-Petermann L., Rault J. and Bellon-Fontaine M.N., 1997.** Adhesion of *streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* 11(3):201-16.
- Boulange-Petermann L., Jullien C., Dubois P. E., Benezech T., Faille C., 2004.** Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. *Biofouling*, 20:25– 33.
- Boutaleb N., 2007.** Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
- Bouteleux C., 2005.** Survie d'Entérobactéries dans les eaux de distribution : Rôle de la matière organique d'origine algale. Thèse de Doctorat. Université Henri-Poincaré- Nancy I. 275p.
- Bower CK, McGuire J, Daeschel MA., 1996.** The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. *Trends Food Sci Technol* 7:152-7.
- Brackett, R. E., 1987.** Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 50(12), 999-1003.
- Brauge T., Sadovskaia I., Faille C., Benezech T., Maes E., Guerardel Y. and Midelet-Bourdin G., 2016.** L'acide téichoïque est le principal polysaccharide présent dans la matrice de biofilm de *Listeria monocytogenes* . *FEMS Microbiol. Lett.* **363** doi: 10.1093 / femsle / fnv229.
- Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J., 2006.** Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 254–262.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. and Dubois-Brissonnet, F., 2011.** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), pp.1017-1032.
- Brooks, J., Daneshvar, M., Malcolm, G., Pine, L., 1989.** Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian Journal of Microbiology*. Volume:35.p.245-54.

Références bibliographiques

Brown MRW, Collier PJ and Gilbert P., 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 1623-1628.

Brown MRW and Barker J., 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends in Microbiology* 7, 45-50.

Buchanan R. L., Gorris L. G.M., Hayman M. M., Jackson T.C. and Whiting R.C. 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* .Vol 75. 2017. Pages 1-13.

Bunt, C. R., Jones, D. S., & Tucker, I. G., 1995. The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BATH and HIC methods. *International journal of pharmaceutics*, 113(2), 257-261. **Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S., 2006.** Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916–3923.

Buchrieser, C., Cossart, P., Kunst, F. Glaser, P. and Rusniok, C., 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Volume 35. p. 207-13.

Buttiaux R, LE Minor L, Gaudier B, Le Minor S, et Nicolle P., 1956. Epidemiologie research on gastroenteritis due to *Escherichia coli* in a Hospital in Northern France. Dans *Arch Mal Appar Dig Mal Nutr* ; 45 : 225-247.

C

Camilli, A., Tilney, L.G., Portnoy, D.A., 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol*. 8 : 143-157.

Cappello, S., & Guglielmino, S. P., 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 205-207.

CAPP-INFO,. 2007. Bulletin d'information du CAPP (Contact Avis Pharmacologique et Pharmaceutique), HUG (Hôpitaux universitaires de Genève) . n°46, juin.

Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F., 2014. Biofilm Formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, 6(1-2), 29-42.

Carpentier B, Cerf O., 1993. Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75:499-511.

Références bibliographiques

- Carpentier, B., & Cerf, O., 2011.** Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1e8.
- Catteau M., 1991.** Le Genre *Listeria*. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires., **3**, 315-323.
- Chae M S et Schraft H., 2000.** Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *Int J Food Microbiol*, **62**, 103-111.
- Chapman, J. S., 2003.** Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeter & Biodegrad* **51**: 271-276.
- Characklis, W. G., 1973.** Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, 7(9), 1249-1258.
- Chang, H. T., & Rittmann, B. E., 1986.** Biofilm loss during sample preparation for scanning electron microscopy. *Water Research*, 20(11), 1451-1456.
- Changani S. D., Belmar-Beiny M. T., Fryer P. J., 1997.** Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Exp. Therm. Fluid Sci.* **14**: 392– 406.
- Characklis WG, Marshall K.C., 1990.** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Chmielewski R.A.N. and Frank J.F., 2003.** Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities comprehensive reviews in *food science and food safety* Vol. **2**, p 22-32.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. et Beachey, E. H., 1985.** Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**, 996-1006.
- Chylkova T., Cadena M., Ferreira A.,and Pitesky M. 2017.** Susceptibility of Salmonella Biofilm and Planktonic Bacteria to Common Disinfectant Agents Used in Poultry Processing. *Journal of Food Protection*, Vol. **80**, N° 7, Pages 1072–1079.
- Cloete T. E., Jacobs L., Brozel V. S., 1998.** The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*. **9**: 23–37.
- Cloete, T. E., 2003.** Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **51**: 277-282.
- Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., Percival S. L., 2007.** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, **121**(1), 1-17.

Références bibliographiques

- Codex Alimentarius, C., SESSION, R., DU COMITE, D. C., & TRAITES, S., 2003.** comisión del codex alimentarius. Organización Mundial para la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Segunda edición, Roma, Italia.
- Coenye, T., 2010.** Response of sessile cells to stress: from changes in gene expression to phenotypic adaptation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 239-252.
- Cornu, M., Kalmokoff, M., Flandrois, J.P., 2002.** Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 261–274.
- Corrieu, G., Lalande, M., & Ferret, R., 1986.** Mesure en ligne de l'encrassement et du nettoyage d'un stérilisateur UHT industriel. *Journal of Food Engineering*, 5(3), 231-248.
- Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., Berche, P., 1989.** Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes* : direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* ; 57 : 3629-3636.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J., 1978.** How bacteria stick. *Sci Am*, 238(1), 86-95.
- Costerton, J. W., Irvin, R. T., & Cheng, K. J., 1981.** The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 35(1), 299-324.
- Côté, J. P., 2014.** Les autotransporteurs auto-associatifs d'*Escherichia coli*: de facteurs de virulence à déterminants sociaux.
- Cotter, P. D., O'REILLY, K. A. R. E. N., & Hill, C., 2001.** Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. *Journal of food protection*, 64(9), 1362-1368.
- Crémieux A. et Freney J., 1995.** Bases fondamentales de l'action antimicrobienne des antiseptiques et des désinfectants : les mécanismes d'action antimicrobienne. Dans : Antisepsie et désinfection, Fleurette J., Freney J. et Reverdy M.E., eds., Editions Eska, pp 23-37.
- CristianCarip., 2008.** Microbiologie hygiène-bases microbiologiques de la diététique. page 79.
- Cruz, C. D., & Fletcher, G. C., 2012.** Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 26(1), 194e199.

D

- Darfeuille-Michaud, A., 2002.** Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *International journal of medical microbiology*, 292(3-4), 185-193.

Références bibliographiques

- De Blackburn, C. W., 1989.** Use of ATP in microbial adhesion studies. *ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology*, 145-152.
- De Chalvet De Rochemonteix A., 2009.** Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.
- De Chastellier, C., Berche, P., 1994.** Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages : evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect Immun*; 62 : 543-553
- Delignette-Muller, M.L., Cornu, M., Pouillot, R. et Denis, J.B., 2006.** Use of Bayesian modelling in risk assessment: application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 195–208.
- Denyer, S. P. and Stewart G. S. A. B. 1998.** Mechanisms of action of disinfectants. *Int Biodeter & Biodegrad* **41**: 261-268.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., & Hebraud, M., 2006.** "Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure." *Fems Microbiology Letters* 256(1).
- Desvaux, M. and M. Hebraud. 2006.** "The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence." *FEMS Microbiol Rev* 30(5): 774-805.
- Desvaux, M. and M. Hébraud. 2008.** Chapter 12: analysis of cell envelope proteins. In: Liu, D. (ed.) CRC Press, Taylor and Francis Group. *Handbook of Listeria monocytogenes*, Boca Raton, Florida, USA, 359-393.
- Dhowlaghar, N., Abeyesundara, P. D. A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., Chang, S., Cheng, W. H. and Sharma, C. S. 2017.** Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in catfish mucus extract on four food contact surfaces at 22 and 10° C and their reduction by commercial disinfectants. *Journal of food protection*, 81(1), 59-67.
- Directive n° 98/8/CE du 16/02/98** concernant la mise sur le marché des produits biocides. https://aida.ineris.fr/consultation_document/1021.
- Djenane, D., Martinez, L., Sanchez-Escalante, A., Montanes, L., Blanco, D., Yangüela, J. et Roncalés, P. (2006).** Effect of lactic acid bacteria on beef steak microbial flora stored under modified atmosphere and on *Listeria monocytogenes* in broth cultures. *Food science and technology international*, 12(4), 287-295.
- Donlan RM., 2002.** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal*. **8** (9): 881-890.

Références bibliographiques

- Dosti B., Guzel-Seydim Z. and Greene A. K., 2005.** Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *Int. J. Dairy Technol.* 58: 19–24.
- Doyle M.P. 1988.** Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Technol.*, **42**, 169-171.
- Dumas C. 2007.** Catalyse électromicrobienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.
- Dunne, W. M. 2002.** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155-166.
- Dupont GA., 1997.** Understanding dental plaque; biofilm dynamics. *Journal of Veterinary Dentistry*. Vol **14**, n°3. Pages 91-94.
- Dupuis C., Tardif R., Verge J., Drapeau R. and Hébert J. 2003.** Ouvrage : Sciences et technologie du lait.
- Dutta, V., Elhanafi, D. and Kathariou, S..2013.** Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(19), 6067-6074.
- Dziva, F. and Stevens, M. P. 2008.** Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4), 355-366.

E

- EN NF ISO 11290. 2004.** Parties 1 et 2 – Amendement 1: Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria*.
- EN ISO 16140. 2003.** Microbiologie des aliments–Protocole pour la validation des méthodes alternatives. *Organisation internationale de Normalisation: Genève, 2003c*.
- EN NF ISO 4832. 2006.** Microbiologie des aliments–Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies.
- Elhanafi, D., Dutta, V. and Kathariou, S. 2010.** Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(24), 8231-8238.
- Euzèby J.P. and Tindall B.J., 2004 .** Valid publications of new names or new combinations: making use of the Validation Lists. *ASM News*, **70**, 258-259.

Références bibliographiques

Extremina, C. I., Costa, L., Aguiar, A. I., Peixe, L. and Fonseca, A. P., 2011. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods* **84**, 167-173.

F

Fabien S. 2017. Analyses en microbiologie- environnement microbien (air, surfaces,eau); v2, P3355.

Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G. and Fontana, C., 2014. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Reports*, 1(2).

Frank J and Koffi R. 1990. Surface-adherence growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J Food Prot* 53(7):550-4.

Frank J F., Gillett R. A.N., and Ware G.O.. 1990. Association of *Listeria spp.* Contamination in the Dairy Processing Plant Environment with the Presence of *Staphylococci*. *Journal of Food Protection*, Vol. 53, No. II, Pages 928-932.

Fatemi, P. and Frank, J. F. 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/Pseudomonas biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* 62, 761-765.

Flaudrois J.P. 2004. Bactério Géné /croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médicale DCEM1UFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de biométrie.P :1-3-10.

Fletcher M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*. **170**: 2027-2030.

Fleurette, J., Freney, J., & Reverdy, M. É., 1997. Guide pratique de l'antisepsie et de la désinfection.

Flint S. H., Van den Elzen H., Brooks J.D. and Bremer P. J. 1999. Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonising stainless steel. *Int. Dairy J.* **9**: 429–436.

Folkesson, A., Haagensen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S., 2008. Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11

Folsom, J. P. and Frank, J. F. 2006. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. *Journal of food protection*, 69(6), 1292-1296.

Références bibliographiques

Franciosa G., Maugliani A., Scalfaro C., Floridi F. and Aureli P., 2000. Expression de la formation interne et biofilm parmi les isolats cliniques de *Listeria monocytogenes* . *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 22 : 183-193.

G

Gaboriaud, F., Dague, E., Bailet, S., Jorand, F., Duval, J. and Thomas, F. 2006. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. *colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52(2), 108-116.

Gaillard, J.L., Berche, P., Fréhel, C., Gouin, E. and Cossart, P., 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigen from Grampositive cocci. *Cell* ; 65 : 1127-1141.

Ganeshnarayan, K., Shah, S.M., Libera, M.R., Santostefano, A. and Kaplan, J.B. 2009. Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(5), pp.1308-1314.

Garmyn, D., Gal, L., Lemaitre, J. P., Hartmann, A. and Piveteau, P. 2009. Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: A central role for the agr system. *Communicative & integrative biology*, 2(4), 371-374.

Garrrity, G.M., Holt, J.G., Garrrity, G.M., Boone, D.R. and Castenholz, R.W., 2001. The road map to the manual. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, pp.119-166.

Gaulin, C., Lê, M. L., Shum, M. and Fong, D., 2011. Disinfectants and sanitizers for use on food contact surfaces. National Centre for Environmental Health Canada. Available online at: http://www.ncceh.ca/sites/default/files/Food_Contact_Surface_Sanitizers_Aug_2011.pdf.

Gelinas P., Goulet. J, Tastayre G.M. and Picard G.A. 1984. Effect of temperature and contact time on the activity of 8 disinfectants- a classification. *J Food Prot* 47(11):841-7.

Génin, G., 1935. Les agents de nettoyage employés dans l'industrie laitière. *Le Lait*, 15(148), 868-870.

Giaouris E. , Heir E. , Hébraud M. , Chorianopoulos N., Langsrud S. , Møretrø T., Habimana O., Desvaux M. , Renier S. and Nychas G.J. 2013. Attachment and biofilm formation by foodborne *bacteria* in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science. Pages* 298-309.

Références bibliographiques

- Giaouris E., Heir E. , Desvaux M., Hébraud M. , Møretrø T., Langsrud S., Doulgeraki A., Nychas G.J., Kačániová M., Czaczyk K., Ölmez H. and Simões M. 2015. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, p.841.
- Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E. and Holah J.T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol* 87:41-8.
- Gilbert, P. and A. J. McBain. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 16(2): 189-208.
- Gilbert P., Evans D.J., Evans E., Duguid I.G. and Brown M.R.W. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol* 71:72-7.
- Guillier L., Stahl V., Hezard B., Notz E. and Briandet R., 2008. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 51–57.
- Ghuri M. A., Okibe N. and Johnson D. B. 2007. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations. *Hydrometallurgy*, 85(2-4), 72-80.
- Gióon J. A., Jones T., Millan-Velasco F., Castro-Munoz E., Zarate L., Fry J. and Schoolnik G. K. 1991. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 163(3), 507-513.
- Gilbert P, Collier PJ and Brown MRW., 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: Biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 1865-1868.
- Girardin H., Paris S., Rault J., Bellon-Fontaine M. N. and Latgé J. P., 1999. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus conidia*. *Letters in applied microbiology*, 29(6), 364-369.
- Grimont P., 1987. Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*, 6-10
- Glaser P., Frangeul L., Buchrieser C., Rusniok C., Amend A., Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T. and Charbit A., 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294(5543), pp.849-852.
- Goddard D. T., Weaver W., Steele A. and Harron H., 1993. Imaging soft and delicate materials. *Materials world*, 1(11), 616-17.
- Goller C.C. et Romeo T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 37- 66.

Références bibliographiques

- Gominet M., Compain F., Beloin C. and Lebeaux D., 2017.** Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017?. *Apmis*, 125(4), 365-375.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Suzuki K.I., Ludwig W. and Whitman W.B. 2012.** Bergey's manual® of systematic bacteriology: volume five the actinobacteria, part A. *Springer New York. Bergey's manual*.
- Gottenbos B., Busscher H. J., Van Der Mei H. C. and Nieuwenhuis P. 2002.** Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(8), 717-722.
- Gordon D., Christensen W., Simpson A. , Janara J., Younger L. M. Baddour F., Barrett F., Melton D.M and Beachey E.H. 1985.** Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *Journal of clinical microbiology*, Dec. Vol. 22, No. 6, p. 996-1006.
- Grasshoff A. 1989.** Environmental impact of the use of alkaline cleaning solutions. In Fouling and Cleaning in Food Processing, pp 107–114. Kessler H G and Lund D B, eds. University of Munich, Germany.
- Greatorex J .S. and Thorene G .M., 1994 .**Humoral immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects .*J clin microbial* 2000; P 32:1172-1178.
- Grif K., Orth D., Lederer I., Berghold C., Roedl S., Mache C. J., Dierich M. P. and Wurznner R. 2005.** Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 24 (4):268-271.
- Gueriri, I., Cyncynatus, C., Dubrac, S., Arana, A. T., Dussurget, O., & Msadek, T., 2008.** The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. *Microbiology*, 154(8), 2251-2264.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M. K., Scortti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., et Lecuit, M., 2010.** Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases* 16, 136-138.

H

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P., 2004.** Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95e108.

Références bibliographiques

- Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrrouki M. and Kouider N. 2004.** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. **54**: 213-225.
- Hancock V., Witsø, I. L. and Klemm, P. 2011.** Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology*, **301**(7), 570-576.
- Harmsen M., Lappann M., Knochel S. and Molin S. 2010.** Le rôle de l'ADN extra-cellulaire au cours de la formation de biofilm de *Listeria monocytogenes* . *Appl. Environ. Microbiol.***76** : 3625-3636.
- Harrison J. J., Ceri H., Yerly J., Rabiei M., Hu Y., Martinuzzi R. and Turner R. J. 2007.** Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(15), 4940-4949.
- Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A. and Iqbal M. 2011.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **15**(4), 305-311.
- Hefford M. A., D'aoust S., Cyr T. D., Austin J. W., Sanders G., Kheradpir E. and Kalmokoff M. L., 2005.** Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568. *Canadian journal of microbiology*, **51**(3), 197-208.
- Heinzel M. 1998.** Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *Int Biodeter & Biodegrad* **41**:225-234.
- Heir, E., Sundheim, G., & Holck, A. L. , 1995.** Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *J Appl Bacteriol* **79**(2): 149-56.
- Heir, E., Sundheim, G., & Holck, A. L., 1999.** Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant *staphylococci* from the food industry. *Int J Food Microbiol***48**(3):211-9.
- Heir E., Møretrø T., Simensen A. and Langsrud S. 2018.** *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. *International journal of food microbiology*, **275**, 46-55.

Références bibliographiques

- Helke D. M., Somers E. B. And Wong A.C.L. 1993.** Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components, *J Food Prot*, **56**, 479-484.
- Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R. C. and Ala'Aldeen D. 2004.** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- Henrici, A. T. 1933.** Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of bacteriology*, **25**(3), 277.
- Henriques A. R. and Fraqueza M. J., 2017.** Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT-Food Science and Technology*, **81**, 180-187.
- Herald P.J. and Zottola E.A. 1988.** Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. *J Food Prot* **51**(6):445-8.
- Heukelekian H. and Heller A. 1940.** Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of bacteriology*, **40**(4), 547.
- Højby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S. and Ciofu O. 2010.** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, **35**(4), pp.322-332.
- Højby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. J., Moser C., Jensen P. and Bjarnsholt T. 2011.** The clinical impact of bacterial biofilms, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. **3** No. 2, pp. 55-65.
- Holah J. T. and Gibson H., 2000.** Biofilms: recent advances in their study and control. In L. V. Evans (Ed.), Food industry biofilms (pp. 211-235). Amsterdam. *The Netherlands: Harwood Academic Publishers*.
- Honraet K., Goetghebeur E. and Nelis H. J. 2005.** Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods* **63**, 287-295.
- Hood S.K. and Zottola E.A., 1995.** Biofilms in food processing. *Food Control* **6**, 9-18.
- Hood S.K. and Zottola, E.A., 1997a.** Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 145-153.
- Hood S. and Zottola E. 1997 b.** Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Microbiol* **37**:145-53.

Références bibliographiques

Hyde F.W, Alberg M. and Smith K. 1997. Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:142-9

I

Ibusquiza P. S., Herrera J. J. R. and Cabo M. L. 2011. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology*, 28(3), 418-425.

Iniguez-Moreno M. and Gutiérrez-Lomelí M. 2018. Pedro Javier Guerrero-Medina, María Guadalupe Avila-Novoa Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. *brazilian journal of microbiology* 49, 310-319

ISO 18593. 2004. Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons.

J

Jackson S.G., Goodbrand R.B., Johnson R.P., Odorico V.G., Alves D., Rahn K., Wilson J.B., Welch M.K. and Khakhria R., 1998. *Escherichia coli* O157 [ratio] H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiology & Infection*, 120(1), pp.17-20.

Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L. and Shitiliff M.E. 2008. Complicated Catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 21,26-59.

Jain A., Marsili E. and Bhosle N. B. 2011. The Biofilm Returns: Microbial Life at the Interface. *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85.

Jacquelin L. F., Le Magrex E., Brisset L., Carquin J., Berthet A. and Choisy C., 1994. Synergy effect of enzymes or surfactants in association with a phenolic disinfectant on a bacterial biofilm. *Pathol. Biol.* 42: 425–431.

Jaudon P., Leitao J. and Lellouche –Gilliere. 2000. Hygiène et propreté des surfaces en milieu agro-alimentaire. Collection guides pratiques. Edition PYC livres.

Jay J.M., Loessner M.J. and Golden D.A., 2008. Modern food microbiology. Springer Science & Business Media.

Jemmi T. and Stephan R. 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Review Science Magazine*. Volume 25. p. 571-80.

Jensen B.B.B., Stenby M. and Nielsen D.R. 2007. Improving cleaning effect by cleaning average velocity. *Trends in Food Science & Technology*, 18, S52-S63

Références bibliographiques

- Jeon H. R. , KWON M. J., and Yoon K.S. 2018.** Control of *Listeria innocua* Biofilms on Food Contact Surfaces with Slightly Acidic Electrolyzed Water and the Risk of Biofilm Cells Transfer to Duck Meat. *Journal of Food Protection*. Vol. **81**, No. 4, pp. 582-592.
- Jeong D. K., and Frank J. F. 1994.** Growth of *Listeria monocytogenes* at 10C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*, 57(7), 576-586.
- Johnson J., Jinneman K., Stelma G., Smith B.G., Lye D., Messer J., Ulaszek J., Evsen L., Gendel S., Bennett R.W. and Swaminathan B., 2004.** Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7),pp.4256-4266.
- Johnson, J. R. and Russo, T. A. 2005.** Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology*, 295(6-7), 383-404.
- Jones D. and Seeliger H. P. 1991.** The Genus *Listeria*. In: H. G. T. A. Balows, M. Dworkin et al (ed). *The Procaryotes*, New York,USA, 1598-1616.
- Jones H. C., Roth I. L. and Sanders W. M., 1969.** Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of bacteriology*, 99(1), 316-325.
- Joshi P., Wadhwani T., Bahaley P. and Kothari V. 2010.**Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing, *The IUP Journal of Life Sciences*. Vol. **4** No. 1, pp. 59-72.

K

- Kadam S. R., Den Besten H. M., Van der Veen S., Zwietering M. H., Moezelaar R., and Abee T., 2013.** Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International journal of food microbiology*, 165(3), 259-264.
- Kalmokoff,J.W., Austin X.D., Wan G., Sanders S., Banerjee. and Farber J.M. 2001.** Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, Vol **91**, pages 725–734.
- Kaper J. B., Nataro J. P., and Mobley H. L. T. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.
- Kaplan J. Á. 2010.** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*, 89(3), 205-218.
- Kahrs R. F. 1995.** Principes généraux de la désinfection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 14(1), 123-142.

Références bibliographiques

- Kastbjerg V. G. and Gram L. 2012.** Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. *International journal of food microbiology*, 160(1), 11-15.
- Katsikogianni M. and Missirlis, Y. F. 2004.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, 8(3), 37-57.
- Kern-Benaibout E., 2006.** *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'homme: synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'homme par la contamination de l'environnement (Doctoral dissertation).
- Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y. and Lewis K., 2004.** Persisted cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters*, 230(1), 13-18.
- Kjelleberg S. and Molin S., 2002.** Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. 1615 Microbiol.* 5, 254-258.
- Khamisse E. 2013.** Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. *Bacteriol. Agro Paris Tech*.
- Kirby A. E., Garner K. and Levin, B. R. 2012.** The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 2967-2975.
- Kuda T., Yano T. and Kuda M. T., 2008.** Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT – Food. Sci. Technol.* 41: 988–993.
- Kumar C. G. and Anand S. K., 1998.** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27.
- Kumar G. D., Ravishankar S. and Patel J. 2014.** Comparative Evaluation of Factors Affecting *Escherichia coli* Biofilms on Organic Leafy Green Wash Water Contact Surface. *Journal of Food Protection Supplement*. Vol 77, 2014. Pages 44-45.

L

- Laithier C., Chatelin Y. M., Talon R., Barral J., Tormo H. and Lefrileux Y., 2005.** Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage/désinfection sur la sélection positive des biofilms. *Rencontres au tour des Recherches sur les Ruminants*, 12, 367-370.
- La Ragione R. M. and Woodward M. J., 2002.** Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia

Références bibliographiques

- Larpent J. P., 2000.** *Listeria* (No. Ed. 2). Editions Tec & Doc.
- Larpent J.P., 2004.** *Listeria*. Tec et Doc, 3ème éd., Lavoisier. Paris.
- Larsen M. H., Dalmaso M., Ingmer H., Langsrud S., Malakauskas M., Mader A., Møretrø T., Mozina S.S., Rychli K., Wagner M., R. Wallace J., Zentek J. and Jordan K. 2014.** Persistence of food borne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control.. Vol 44. Pages 92-109.*
- Larson E. L., Morton H. E., 1991.** Alcohols. In: Block S.S. (ed.): Disinfection, Sterilization, and Preservation. 4th Ed. Lea & Febiger, London: 204–224.
- Laura Rodrigues .B., Santos L.R.D., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., Oliveira A.P.D., Goetz F. and Nascimento V.P.D. 2010.** Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian journal of microbiology*, 41(4), pp.1082-1085.
- Lawrence J. R., Korber D. R. and Caldwell D. E., 1989.** Computer-enhanced darkfield microscopy for the quantitative analysis of bacterial growth and behavior on surfaces. *Journal of microbiological methods*, 10(2), 123-138.
- Lelievre C., Antonini G., Faille C. and Benezech T. 2002.** Cleaning-in-place—modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by bacillus spores assuming a process combining removal and deposition. *Food Bioprod. Process.* **80**: 305– 311.
- Lelievre C., Faille C. and Benezech T. 2001.** Removal kinetics of *Bacillus cereus* spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of soiling and cleaning conditions. *J. Food Process Eng.* **24**: 359– 379.
- Le Minor L., Buttiaux R., Gaudier B., Le minor S. and Nicolle P., 1954.** Epidemiologic research on gastroenteritis due to *Escherichia coli* in a Hospital in Northern France.
- Le Minor L. and Veron, M., 1973.** Le genre *Listeria*. *Bactériologie médicale*. Vol 33; pp: 559-569.
- Le Minor L., Popoff M. Y. and Bockemühl, J., 1990.** Supplement 1989 (n 33) to the Kauffmann-White scheme. *Research in microbiology*, 141(9), 1173-1177.
- Lemon K.P., Higgins D. E. and Kolter R. 2007.** Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of bacteriology*, June p. 4418-4424 Vol. **189**, 2007.
- Levine M. 1988.** *Escherichia coli* that cause diarrhea: entérotoxigenic, entéroinvasive, entérohemorrhagic , and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases*; **155** : 377 -389 .
- Lewis K. 2005.** Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* **70**(2): 267-74.

Références bibliographiques

Lewis K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), p.48.

Lawrence J. R., Korber D. R. and Caldwell D. E. 1989. Computer-enhanced darkfield microscopy for the quantitative analysis of bacterial growth and behavior on surfaces. *Journal of microbiological methods*, 10(2), 123-138.

Li Y. H., and Tian X., 2012. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)* 12, 2519-2538.

Lindsay D., Brözel V. S., Mostert J. F. and Von Holy A. 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single and binary biofilms of a dairy associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *J. Appl. Microbiol.* 92: 352–361.

Longhi C., Scoarughi G. L., Poggiali F., Cellini A., Carpentieri A., Seganti, L. and Costerton J. W., 2008. Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. *Microbial pathogenesis*, 45(1), 45-52.

Lunde J., 2004. Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Processing Plants.

Lunden, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J., & Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection* 63, 1204–1207.

Lundén J., Autio T., Markkula A., Hellström S. and Korkeala H., 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International journal of food microbiology*, 82(3), 265-272.

M

Mafu A. A., Roy D., Goulet J. and Magny P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times, *J Food Prot*, 53, 742-746.

Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Savoie L., Roy R., 1990. « Efficiency of Sanitizing Agents for Destroying *Listeria monocytogenes* on Contaminated Surfaces ». *J. Dairy Sci.* 73: 3428- 3432.

Mah T.F.C. and O'toole G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), pp.34-39.

Maillard J. Y., 2002. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol* 92 **Suppl**: 16S-27S.

Mainil J. G. , 2000. Le point des connaissances sur les entérites à *Escherichia coli* chez le veau. *Ann. Méd. Vét* 144:121-136.

Références bibliographiques

- Marshall K. C., Stout R. and Mitchell R., 1971.** Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology*, 68(3), 337-348.
- Martinez-Medina M., Mora A., Blanco M., López C., Alonso M. P., Bonacorsi S., and Blanco J., 2009.** Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, 47(12), 3968-3979.
- Marsh E. J., Luo H. and Wang H., 2003.** A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. *FEMS Microbiology Letters*, 228(2), 203-210.
- Martinez L.R. and Casadevall A. 2007.** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*. 4592- 4601.
- Massicotte R . 2009.** Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Édition : La Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec.
- Mattila-Sandholm T. and Wirtanen G. 1992.** Biofilm formation in the industry: A Review. *Food Rev. Inter.* 8: 573-603.
- McDonnell G. and Russell A. D.. 1999.** Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12(1):147-79.
- McEldowney S, Fletcher M., 1987.** Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Arch Microbiol* 148:57-62.
- Meyer B. 2003.** Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Inter. Biodeterior. Biodegrad* .51: 249 – 253.
- Meyer B., 2006.** Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 275-279.
- Miladi H., Ammar E., Slama R. B., Sakly N. and Bakhrouf, A., 2013.** Influence of freezing stress on morphological alteration and biofilm formation by *Listeria monocytogenes*: relationship with cell surface hydrophobicity and membrane fluidity. *Archives of microbiology*, 195(10-11), 705-715.
- Mokady D., Gophna U. and Ron, E. Z., 2005.** Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 66-73.
- Moltz A. G. and Martin S. E., 2005.** Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of food protection*, 68(1), 92-97.
- Montet M., 2009.** Contamination des aliments par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (stec) en France, et importance de l'acido-résistance de la souche. p72.

Références bibliographiques

- Mora, A., Herrrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., ... & Blanco, M., 2011.** Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104: H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol*, 14(3), 121-141.
- Moreno, L. Z., Paixão, R., Gobbi, D. D., Raimundo, D. C., Ferreira, T. P., Hofer, E., Matte, M. H. et Moreno, A. M., 2012.** Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Res Microbiol* **163**, 268–271.
- Morisaki H., Nagai S., Ohshima H., Ikemoto E. and Kogure, K. 1999.** The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology*, 145(10), 2797-2802
- Müller A., Rychli K., Muhterem-Uyar M., Zaiser A., Stessl B., Guinane C. M. and Schmitz-Esser S., 2013.** Tn6188-a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One*, 8(10), e76835.
- Müller A., Rychli K., Zaiser A., Wieser C., Wagner M. and Schmitz-Esser S., 2014.** The *Listeria monocytogenes* transposon Tn 6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS microbiology letters*, 361(2), 166-173.
- N**
- Nadell C. D., Xavier J. B. and Foster K. R., 2009.** The sociobiology of biofilms. *FEMS. Microbiology Reviews*, 33(1), 206–224.
- Naito M, Frirdich E, Fields J.A, Pryjma M., Li J., Cameron A., Gilbert M., Thompson S.A. and Gaynor E.C. 2010.** Effects of sequential *Campylobacter jejuni* 81–176 lipooligosaccharide core truncations on biofilm formation, stress survival, and pathogenesis. *J Bacteriol* **192**: 2182–2192.
- Nataro J. P. and Kaper J. B. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
- Nataro J. P., Steiner T., and Guerrant R. L., 1998.** Enteraggregative *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases*, 4(2), 251.
- Norwood D.E. and Gilmour A., 1999.** Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 576–582.
- Norwood D. E. and Gilmour A., 2001.** The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**, 320- 324.
- Nousiainen J., et Setälä J., 1998.** Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Ed S.Salminen and A.von Wright. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 437-473.

Références bibliographiques

Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., and Lecuit, M., 2018. *Listeria costaricensis* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 68(3), 844-850.

O

Oh D-H and Marshall DL., 1995. Destruction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel using monolaurin and heat. *J Food Prot* 57(3):251-5.

Öner E. T., 2013. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries (pp. 35-56). Springer, Berlin, Heidelberg.

Oren A., and Garrity G. M., 2018. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 68, part 3, of the *IJSEM*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(6), 1823-1824.

Orsi R. H. and Wiedmann M., 2016. Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5273-5287.

O'Toole G. A., Kaplan H.B. And Kolter R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*. 54: 49- 79.

O'Brien, S. J., G. K. Adak, and C. Gilham., 2001. Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin) producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerg Infect Dis* 7 : 1049-51.

Oulahal-Lagsir N., Martial-Gros A., Bonneau M. and Blum L. J., 2003. “*Escherichia coli*-milk” biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling*. 19: 159–168.

P

Pace J. L., Rupp M. E., and Finch, R. G. (Eds.), 2005. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. CRC Press.

Pan Y., Breidt F. and Kathariou S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12), pp.7711-7717.

Park A. I., Daeschel M. A. and Zhao Y., 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J. Food. Saf.* 69: 215–221.

Parot S. 2007. Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. L'institut National Polytechnique de Toulouse. 247 pages

Parsek M.R. and Greenberg E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), pp.27-33.

Références bibliographiques

- Papaioannou, E., Giaouris, E.D., Berillis, P., Boziaris, I.S., 2018.** Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *Int. J. Food Microbiol.* 267, 9–19.
- Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C. and Paton J.C., 2001.** Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxinogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *infect Immun*, **69** :6999-7009.
- Peeters E., Nelis H. J and Coenye Tom. 2008.** Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Microbiological Methods.* **72**: 157–165.
- Perlat -Leclercq- M. N., 1986.** Etude du nettoyage des échangeurs à plaques destinés à la pasteurisation et à la stérilisation à Ultra-Haute-Température du lait (Doctoral dissertation, Lille 1).
- Pettit R. K., Weber C. A., Kean M. J., Hoffmann H., Pettit, G. R., Tan R., Franks K. S. and Horton M. L., 2005.** Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2612-2617.
- Piercey M. J., Ells T. C., Macintosh A. J. and Hansen, L. T., 2017.** Variations in biofilm formation, desiccation resistance and Benzalkonium chloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada. *International journal of food microbiology*, 257, 254-261.
- Pratt, L. A and Kolter, R., 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P and Dorel, C., 2000.** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**, 450-464.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. and Dorel, C., 2001.** Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *thcsgD* gene. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7213-7223.
- Punithavathy, P. M., Nalina, K. and Menon, T., 2012.** Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J Pathol Microbiol* **55**, 72-74.
- Pirie, J. H., 1940.** *Listeria*: change of name for a genus bacteria. *Nature*, 145(3668), 264.

Références bibliographiques

R

- Ran Han., Klu, Y.A.K. and Chen, J., 2017.** Attachment and biofilm formation by selected strains of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* of fresh produce origin. *Journal of food science*, 82(6), pp.1461-1466.
- Raybourne, R. B., 2002.** Virulence testing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85(2), 516-523.
- Règlement (UE) n ° 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 Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE ; OJ L 167, 27.6.2012, p. 1–123 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, GA, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV), Special edition in Croatian: Chapter 13 Volume 049 P. 181 – 303. In force; ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj>.
- Reguera, G., Pollina, R. B., Nicoll, J. S. and Lovley, D. R., 2007.** Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 189(5), 2125-2127.
- Reis-Teixeira F.B. , Alves V.F. and Pereira de Martinis E.C., 2017.** Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol 48. Pages 587–591.
- Reisner, A., Krogfelt, K. A., Klein, B. M., Zechner, E. L., and Molin, S., 2006.** In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *Journal of bacteriology*, 188(10), 3572-3581.
- Remis, J. P., Costerton, J. W., and Auer, M., 2010.** Biofilms: Structures that may facilitate cell–cell interactions. *The ISME Journal*, 4(9), 1085–1087.
- Ren, T. J., and Frank, J. F., 1993.** Susceptibility of starved planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate counts. *Journal of food protection*, 56(7), 573-576.
- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C., and Dozois, C. M., 2007.** Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1553-1562.
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., Guerrero-Navarro, A. E. and Rodríguez-Jerez, J. J., 2018.** Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food control*, 92, 240-248.
- Rittmann, B. E., 1989.** Detachment from biofilms, Characklis WG, Wilderer PA. Structure and function of biofilms, 49-58.

Références bibliographiques

- Robitaille G., Choinière S. , Ells T. , Deschènes L. and Mafu A.A. 2014.** Attachment of *Listeria innocua* to Polystyrene: Effects of Ionic Strength and Conditioning Films from Culture Media and Milk Proteins. *Journal of Food Protection*. Vol. 77, No. 3, pages 427-434.
- Rocourt, J., Renaud, F., Freney, J., 1994.** *Listeria*. In : J., Freney, F., Renaud, W., Hansen, C., Bollet : Manuel de Bactériologie Clinique, 2ème édition, Elsevier, collection Option Bio, 1994, pp. 833-849.
- Rocourt, J., 1998.** The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods. *Turk. J. Infection*. 2 (4) : 471 – 485.
- Rocourt J., 1999.** Rapport d'activités du centre national de référence des *Listeria*, Institut Pasteur de Paris.
- Rocourt J. and Jacquet C., 2000.** *Listeria* et listériose. In: Précis de bactériologie clinique, Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. (eds). Editions Eska 2000, 943-956.
- Røder, H.L., Raghupathi, P.K., Herschend, J., Brejnør, A., Knøchel, S., Sørensen, S.J. and Burmølle, M., 2015.** Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiol.* 51, 18–24.
- Rodriguez A., Autio W.R, and Lynne A., 2008.** Mclandsborough. Effect of Surface Roughness and Stainless Steel Finish on *Listeria monocytogenes* Attachment and Biofilm Formation. *Journal of Food Protection*, Vol. 71, No. 1, Pages 170–175.
- Rodriguez-Lopez, P., Saa-Ibusquiza, P., Mosquera-Fernandez, M. and Lopez-Cabo, M., 2015.** *Listeria monocytogenes*-carrying consortia in food industry. Composition, subtyping and numerical characterisation of mono-species biofilm dynamics on stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 84–95.
- Rodriguez-Lopez, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vazquez-Sanchez, D., and Lopez Cabo, M., 2018.** Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7(6), 85.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. and Keevil, C. W., 1994.** Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5), 1585-1592.
- Romney, A.J.D., 1990.** *CIP: cleaning in place.. ed. 2.* Society of Dairy Technology.
- Ronald J. Doyle., 1999** *Methods in Enzymology*. AP ACADEMIC PRESS Volume 310: 118-119.

Références bibliographiques

Ronner, A. B., and Wong, A. C. L., 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *Journal of Food Protection* **56**, 750-758.

Rossmore H. W., 1995. Introduction to biocide use. In H. W. Rossmore (Ed.), *Handbook of biocide and preservative use*. pp: 1–18.

Rossoni E.M. and Gaylarde C.C., 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *J Food Microbiol* **61**:81-5.

Russell, A. D., 1996. Activity of biocides against mycobacteria. *Journal of applied bacteriology*, **81**, 87S-101S.

S

Sakamoto C., 2013. Study of the regulatory network of the surface autotransported adhesin antigen 43 in *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Paris 7).

Salvat, G. and Colin, P., 1995. Le nettoyage et la désinfection dans les industries de la viande en Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epi.*, **14** (2), 313, 327, 20-32.

Samaranayake J.Y., Samaranayake L.P., and Yip, H. K., 2004. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* **49**, 789-798.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, **184**(4), 1140-1154.

Schardt, J., Jones, G., Müller-Herbst, S., Schauer, K., D'Orazio, S. E. and Fuchs, T. M., 2017. Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection. *Scientific reports*, **7**(1), 17821.

Schär-Zammaretti, P. and Ubbink, J., 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, **85**(6), 4076-4092.

Seeliger, H.P.R. and Jones, D., 1986. *Listeria*, pp. 1235-1245. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, 9th ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds). Williams & Wilkins, Baltimore.

Sequiera C. A. C., Carrasquinho P. M. N. A. and Cebola C. M., 1988. Control of microbial corrosion in cooling water systems by the use of biocides. In: Sequiera C.A.C., Tiller A.K. (eds): *Microbial Corrosion 1*. Elsevier Appl.Sci. Essex: 240–255.

Références bibliographiques

- Sharma M. and Anand S. K., 2002.** Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry – a case. *Food Control*. **13**: 469–477.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D. and Nataro, J. P., 2001.** Roles for Fis and Yafk in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**, 983- 997.
- Simões M., Simões L. C., Machado I., Pereira M. O. and Vieira M. J., 2006.** Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*. **84**: 338–345.
- Simões M., Simões L.C. and Vieira M.J., 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol* .**43**:573–583.
- Sinde E. and Carballo J., 2000.** Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol* **17**:439-47.
- Sjollem, J., Van der Mei, H. C., Uyen, H. M. W. and Busscher, H. J., 1990.** The influence of collector and bacterial cell surface properties on the deposition of oral streptococci in a parallel plate flow cell. *Journal of Adhesion Science and Technology*, **4**(1), 765-777.
- Skyberg, J.A., Siek, K.E., Doetkott, C. and Nolan, L.K., 2007.** Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *Journal of applied microbiology*, **102**(2), pp.548-554.
- Sleytr, U. B. and Beveridge, T. J., 1999.** Bacterial S-layers. *Trends in microbiology*, **7**(6), 253-260.
- Smoot L.M and Pierson M.D., 1998.** Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *J Food Prot* **61**(10):1293-8.
- Spormann A.M. 2008.** Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*.5208- 5218.
- Stellman, J. M., 2000.** Encyclopédie de sécurité et de santé au travail (Vol. 2). International Labour Organization.
- Stenutz, R., A. Weintraub, and G. Widmalm., 2006.** The structures of *Escherichia coli* Opolysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* **30**:382-403.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic. I, Savic. B, Svabic-Vlahovic M., 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* **40**: 175–179.

Références bibliographiques

- Stepanovic S., Circovic I., Mijac V., Švabic'-Vlahovic' M., 2003.** Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* **20**: 339–343.
- Steven L., Percival J. T. and Walker P. R., 2000.** Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking water. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. p 164-168.
- Stewart J.C. and Seiberling D. A., 1996.** The secrets out: clean in place. *Chem. Eng.* **103**:72–79.
- Stewart, P. S., and Costerton, J. W. , 2001.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.
- Stewart, P.S., 2015.** Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiology spectrum*, **3**(3).
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W., 2002.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, **56**(1), 187-209.
- Sundheim, G., Langsrud, S., Heir, E. and Holck, A.L., 1998.** Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. *International biodeterioration & biodegradation*, **41**(3-4), pp.235-239.
- Sugiyama, A., Iwade, Y., Akachi, S., Nakano, Y., Matsuno, Y., Yano, T., Yamauchi, A., Nakayama, O., Sakai, H., Yamamoto, K.I. and Nagasaka, Y., 2005.** An outbreak of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Japanese journal of infectious diseases*, **58**(6), p.398.
- Survillane Ammon, A., 1997.** Surveillance des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. *Eurosurveillance*, **2**(12), pp.91-96.
- Szalo, I. M., Taminiau, B. and Mainil, J., 2006.** Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli*: structure, biosynthèse et rôles. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 150, No. 2, pp. 108-124). Université de Liège.

T

- Tenke P. Kovacs B., Jackel M and Nagy E. , 2006.** The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* **24**, 13-20.
- Thorene G., 1994.** Humoral immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* ; p43.
- Tolker-Nielsen, T. and Molin, S., 2000.** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, **40**(2), 75–84.
- Tony R ., 2008.** Current Topics in Microbiology and Immunology : *Bacterial Biofilms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Volume **322**. 293 pages.

Références bibliographiques

Tote, K., Vanden Berghe, D., Maes, L. and Cos, P., 2008. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol* **46**, 249-254.

Tremblay, Y. D., Hathroubi, S. and Jacques, M., 2014. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *78*(2), 110-116.

Tresse, O., Lebret, V., Benezech, T. and Faille, C., 2006. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *Journal of applied microbiology*, *101*(1), 53-62.

Tresse, O., Lebret, V., Garmyn, D. and Dussurget, O., 2009. The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. *Canadian journal of Microbiology*, *55*(2), 189-196.

Troller J. A., 1993. Sanitation in food Processing. *Academic Press, San Diego*: 30: 263–286.

Trueman J. R., 1971. The Halogens. In : Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Hugo W.B.ed Academic press, London. pp: 137-183.

V

Van Houdt, R. and Michiels, C. W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* **156**, 626-633.

Van der Veen, S., and Abee, T., 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(3), 421–431.

Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E., Rees, C. E. and Waites, W. M., 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.*, *66*(2), 860-863.

Vernozy-rozand C, Montet MP and Berardin M., 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Lett Appl Microbiol*; **41** : 235-241.

Verran J. and Jones M., 2000. Problems of biofilm in the food and beverage industry. In: Walker J, Suramn S, Jass J, editors. *Industrial Biofouling*. Cichester, N.Y. John Wiley. P 145-73.

Références bibliographiques

Vincent, P., 1999. Assurance de la qualité en laboratoire de contrôle de la qualité: validation d'un procédé de nettoyage de la verrerie de laboratoire par un laveur (Doctoral dissertation, Paris 5).

Vloková H., Barak V., Seydlova R., Pavlik I. and Schlegelova J., 2008. Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: *Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms – a Review*. **26**: 309–323.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R., and Ivanova, E., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, **14**(7), 2535-2554.

W

Wang J., Ray A. J., Hammons S.R. and Haley F. 1997. Persistent and Transient *Listeria monocytogenes* Strains from Retail Deli Environments Vary in Their Ability to Adhere and Form Biofilms and Rarely Have inlA Premature Stop Codons. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol **12**, N° 2.

Wang, H., Wilksch, J. J., Strugnell, R. A. and Gee, M. L., 2015. Role of capsular polysaccharides in biofilm formation: an AFM nanomechanics study. *ACS applied materials & interfaces*, **7**(23), 13007-13013.

Whitfield, G. B., Marmont, L. S., and Howell, P. L., 2015. Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. *Frontiers in microbiology*, **6**, 471.

Wirtanen G., 1995. Biofilm Formation and its Elimination from Food Processing Equipment, VTT Publications 251, Espoo, VTT Offsetpaino.

Wirtanen G., Saarela M. and Mattila-Sandholm T., 2000. Biofilms – impact on hygiene in food industries. In J. D. Bryers (Ed.), *Biofilms II: Process analysis and applications*. pp: 327–372.

Wirtanen G. and Juvonen R., 2002: Disinfectant efficacy on spoilage yeasts isolated from various food processes. In: Wilson D.I., Fryer P.J., Hastings A.P.M. (eds.): *Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing*. City Services Design and Print, Cambridge: 189–196.

Wirtanen G. and Salo S., 2003. Disinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol* .**2**: 293–306.

X

Xu, R., Ma, S., Wang, Y., Liu, L. and Li, P., 2010. Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *Afr. J. Microbiol. Res*, **4**(9), 783-795.

Références bibliographiques

Y

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hóiby, N., Molin, S and Song, Z. J., 2011. Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 74–81.

Yannick D.N., Skander T. and Mario Jacques H., 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* 78:110-116.

Yoon, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S. and Choi, K. H., 2015. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. *Food Research International*, 72, 25-36.

Youwen Pan, Frederick Breidt, Jr., and Sophia Kathariou., 2009. Competition of *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains in Mixed-Culture Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, N°18. Pages 5846–5852.

Z

Zaika L.L. and Fanelli J.S., 2003. Growth kinetics and cell morphology of *Listeria* Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. *J. Food.Prot.*, 66, 1208-1215.

Zameer, F., Gopal, S., Krohne, G.and Kreft, J., 2010. Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes* EGD-e. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1143-1147.

Zeraik A.E. and Nitschke M. 2012. Influence of Growth Media and Temperature on Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. *An international journal*.Vol 55, n° 4, pages 569-576.

Zhang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A. A. and Meng, J., 2007. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *International journal of food microbiology*, 113(1), 47-53.

Zobell, C. E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*, 46(1), 39.

Zottola, E.A. and Sasahara, K.C., 1994. Microbial Biofilms in the Food Processing Industry: Should They Be a Concern. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 125 148.