

# Impact des résidus de biocides sur la colonisation bactérienne de surfaces alimentaires

Sarah Fourour

▶ **To cite this version:**

Sarah Fourour. Impact des résidus de biocides sur la colonisation bactérienne de surfaces alimentaires. Microbiologie et Parasitologie. 2015. anses-01229047

**HAL Id: anses-01229047**

**https://anses.hal.science/anses-01229047**

Submitted on 16 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Rennes 1 (U.F.R Science de la Vie et de l'Environnement)

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes

Master Sciences, Technologies, Santé

*Mention* : Biologie, Agronomie, Santé

*Spécialité* : Microbiologie Fondamentale et Appliquée - MFA

Co-habilité avec Agrocampus Ouest

2ème année – Promotion 2014/2015

# Impact des résidus de biocides sur la colonisation bactérienne de surfaces alimentaires

Mémoire présenté le 22 juin 2015 par **Sarah FOUROUR**

Stage effectué à :

l'Agence Nationale de la sécurité sanitaire, de l'Environnement et du travail

Anses, Laboratoire de Fougères - Javené CS 40608, 35306 Fougères Cedex

Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance (AB2R)

Sous l'encadrement de **Christophe SOUMET**

Université de Rennes 1 (U.F.R Science de la Vie et de l'Environnement)
Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes

Master Sciences, Technologies, Santé

*Mention* : Biologie, Agronomie, Santé

*Spécialité* : Microbiologie Fondamentale et Appliquée - MFA

Co-habilité avec Agrocampus Ouest

2ème année – Promotion 2014/2015

# Impact des résidus de biocides sur la colonisation bactérienne de surfaces alimentaires

Mémoire présenté le 22 juin 2015 par Sarah FOUROUR

Stage effectué à :

l'Agence Nationale de la sécurité sanitaire, de l'Environnement et du travail

Anses, Laboratoire de Fougères - Javené CS 40608, 35306 Fougères Cedex

Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance (AB2R)

Sous l'encadrement de Christophe SOUMET

Présentation technique du stage

Master suivi :
Master Sciences, Technologies, Sante
*Mention* : Biologie-Agronomie-Sante
*Spécialité* : Microbiologie fondamentale et appliquée – MFA
Co-habilité avec Agrocampus-Ouest

Année Universitaire :
2014 - 2015

Sujet du mémoire :
Impact des résidus de biocides sur la colonisation bactérienne de surfaces alimentaires

Auteur du mémoire :
Sarah FOUROUR

Maître de stage :
Christophe SOUMET

Laboratoire d'accueil :
Agence Nationale de la sécurité de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail (Anses)
Laboratoire de Fougères - Javené CS 40608, 35306 Fougères Cedex
Unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistance (AB2R)

Durée du stage :
Du 5 Janvier au 26 Juin 2015 (6 mois)

# Remerciements

Tout d'abord, c'est un honneur d'avoir effectué un stage au sein d'un établissement de qualité tel que l'Anses de Fougères, dirigé par Pascal SANDERS, que je remercie pour m'y avoir accueillie.

Je remercie également Pierre MARIS, responsable adjoint du laboratoire, pour avoir partagé son regard d'expert concernant les produits biocides.

C'est un merci tout particulier que j'adresse à Christophe SOUMET, mon maitre de stage et chef de l'unité Antibiotique, Biocides, Résidus et Résistances (AB2R), pour m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de son équipe. Je lui en suis également reconnaissante pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils ainsi que pour le temps consacré à la lecture et la correction de ce rapport.

Merci à Mireille BRUNEAU, chef-adjoint de l'unité AB2R, de m'avoir également accueillie dans son équipe.

Merci à Rachel FRESNEL, mon encadrante technique et ingénieur d'étude, d'avoir été disponible pour répondre à mes questions, pour ses conseils avisés et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances.

J'exprime ma reconnaissance à Marie-Hélène MOREAU, technicienne de laboratoire, d'avoir travaillé avec moi tout au long de ce stage. Merci pour son aide indispensable mais aussi pour sa gentillesse et sa gaieté.

C'est avec beaucoup d'amitié que je tiens à remercier les thésards et les autres stagiaires du laboratoire d'avoir contribué à rendre ces 6 mois agréables. Merci pour les déjeuners dans une bonne ambiance, pour les pauses « goûter », pour leur bonne humeur et à certains pour leur soutien. Un merci particulier à la « dream team bad' » d'avoir tenté de faire de moi une grande sportive.

Enfin, je remercie tous les agents du laboratoire pour m'avoir fait une place parmi eux et particulièrement tous ceux qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. J'exprime également beaucoup de reconnaissance envers toutes les personnes avec qui j'ai covoituré : Jean-Pierre ABJEAN, Damien BOUCHARD, Françoise PICHART, Annie RAULT …

Vous avez tous participé à la réalisation de mon stage dans un environnement chaleureux et motivant…

Sommaire

Remerciements ..... 5
Sommaire ..... 6
Liste des figures et tableaux ..... 8
Liste des abréviations utilisées ..... 9
Préambule ..... 10
*I* - Étude bibliographique ..... 1
1.Le risque bactérien en industries agro-alimentaires ..... 1
1.1La sécurité alimentaire en France ..... 1
1.2Facteurs liés à la contamination des aliments ..... 2
1.2.1Persistance bactérienne ..... 2
1.2.2Adhésion bactérienne ..... 2
1.2.3Formation d'un biofilm ..... 3
2.Nettoyage-désinfection des surfaces et risques associés ..... 3
2.1Contexte réglementaire ..... 3
2.2Les produits biocides : notion de substances actives, résidus et « résistance » ..... 4
2.3Risques liés à la rémanence de résidus de produits biocides ..... 5
2.3.1Impact sur la colonisation bactérienne ..... 5
2.3.2Etat Viable Non Cultivable (VNC) ..... 5
*II* - Matériels et méthodes ..... 8
1.Les produits désinfectants ..... 8
1.1Préparation des solutions mères et filles ..... 8
1.2Choix des gammes de concentrations ..... 8
2.Les supports en acier inoxydable ..... 9
2.1Stérilisation des supports ..... 9
2.2Conditionnement des supports ..... 9
3.Les souches bactériennes ..... 9
3.1Choix des souches bactériennes ..... 9
3.3Contamination et incubation des supports ..... 10
4.Traitement des supports sans et après incubation ..... 10
4.1Témoins de « non-colonisation » ..... 10
4.2Après incubation ..... 11
5.Mise en place de la méthode PCRq-PMA ..... 11
5.1Extraction d'ADN et conditions PCRq ..... 11
5.2Courbe standard de quantification ..... 12
5.3Validation de la méthode PCRq-PMA ..... 13
6.Quantification bactérienne ..... 13
6.1Bactéries viables Cultivables (VC) - Dénombrement ..... 13
6.2Bactéries viables Totales (VT) – PCRq-PMA ..... 14

7.Méthode d'exploitation des résultats et analyses statistiques ..... 14
*III* - Résultats ..... 15
1.Gammes de concentrations en produits désinfectants ..... 15
2.Quantification des bactéries Viables Cultivables (VC) ..... 15
2.1Comparaison du dénombrement bactérien obtenu à partir des supports conditionnés avec les produits désinfectants par rapport à celui des supports témoins ..... 15
2.1.1Témoins de « non-colonisation » ..... 15
2.1.2Résultats de la comparaison ..... 16
2.2Comparaison inter-souche de la capacité de multiplication sur les supports ..... 19
3.Mise en place de la PCRq-PMA ..... 19
3.1Courbe standard de quantification ..... 19
3.2Validation de la PCRq-PMA ..... 21
4.Quantification des bactéries Viables Non Cultivables (VNC) ..... 22
4.1Choix et conditions de comparaison de la quantification des formes VT et VC ..... 22
4.2Comparaison de la quantification des formes VT et VC ..... 22
*IV* – Discussion ..... 24
1.Choix des gammes de concentrations en produits désinfectants ..... 24
2.Bactéries Viables Cultivables (VC) ..... 25
3.Bactéries Viables Totales (VT) ..... 26
4.Contraintes techniques rencontrées lors de cette étude ..... 27
*V* - Conclusion et perspectives ..... 28
*VI* - Références Bibliographiques ..... 29
Publications ..... 29
Directives / Règlements / Normes ..... 31
Thèse ..... 31
Sites internet ..... 31

# Liste des figures et tableaux

## *Table des figures :*

Figure 1 : Comparaison du dénombrement obtenus des supports conditionnés avec différentes concentrations de Triameen ou de CDDA (gris) par rapport aux supports témoins conditionnés avec du lait 1/100$^{ème}$ seul (vert) pour les souches *E. coli* ATCC 25 922 (A, B) et 003 (C, D). P 17

Figure 2 : Comparaison du dénombrement obtenus des supports conditionnés avec différentes concentrations de Triameen ou de CDDA (clair) par rapports aux supports témoins conditionnés avec du lait 1/100$^{ème}$ seul (foncé) pour les souches *L. monocytogenes* ScottA (A, B) et 008 (C, D). P 18

Figure 3 : Comparaison du dénombrement bactérien en $log_{10}$ UFC/support des supports témoins en fonction des souches : *E. coli* ATCC 25 922 et 003 ; *L. monocytogenes* ScottA et 008. P 19

Figure 4 : Courbes standards de quantification donnant la relation entre le $log_{10}$ UFC/ml et le nombre de Ct pour les souches *E. coli* ATCC 25 922 (A) et *L. monocytogenes* ScottA (B). P 20

Figure 5 : Résultats des essais préliminaires de PCRq-PMA. P 21

Figure 6 : Comparaison du nombre de cellules viables totales (VT) (rouge) et des viables cultivables (VC) (violet) pour les souches E. coli ATCC 25 922 (A, B) et 003 (C, D) sur les supports conditionnés avec différentes concentrations en Triameen ou en CDDA ainsi que sur les supports témoins. P 23

## *Table des tableaux :*

Tableau 1 : Gammes de concentrations en produits désinfectants Triameen et CDDA par souche bactérienne. P 15

Tableau 2 : Différence du nombre de Ct (Delta (Ct)) entre le nombre de Ct des essais traités au PMA à celui des essais non traités pour les souches E. coli ATCC 25 922 et L. monocytogenes ScottA. P 21

# Liste des abréviations utilisées

Anses : Agence National de la Sécurité sanitaire, de l'Environnement et du Travail

BAC : Chlorure de BenzAlkonium

BTS : Bouillon Trypticase Soja

CE : Commission Européenne

CDDA : Chlorure de DidécylDimethylAmmonium

Ct : Threshold cycle

DEPC : Diéthyl Pyrocarbonate

GTS : Gélose Trypticase Soja

PCR : Polymerase Chain reaction

PMA : Propidium MonoAzide

P : $p_{value}$

UFC : Unité Formant Colonie

VC : Viable Cultivable

VNC : Viable Non Cultivable

VT : Viable Totale

# Préambule

*L'Agence Nationale de la Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail (Anses) est un établissement public à caractère administratif, qui assure des missions de veille, d'expertise, de recherche et de référence dans plusieurs domaines (santé humaine, santé/bien-être animal et santé des végétaux). Ce stage se déroule au sein de l'unité Antibiotiques, Biocides, Résidus et Résistances (AB2R) du laboratoire de Fougères, dont l'une des thématiques de recherche consiste à évaluer les risques associés à l'utilisation de produits antimicrobiens, tout au long de la chaîne alimentaire.*

# *I* - Étude bibliographique

## 1. Le risque bactérien en industries agro-alimentaires

### 1.1 La sécurité alimentaire en France

En France et en Union Européenne, la très stricte politique de sécurité alimentaire souligne la responsabilité des professionnels et fournit une large législation en ce qui concerne la qualité des aliments. Les industriels possèdent des outils réglementaires ainsi que des avis d'experts scientifiques afin de répondre au mieux à cette législation. Cela englobe notamment les bonnes pratiques de fabrication, l'analyse constante du danger sanitaire et l'adoption d'une assurance qualité. Le but étant une maîtrise optimale de l'aliment au sein de tous les maillons de la chaîne alimentaire, de la collecte jusqu'à l'assiette du consommateur. La Commission Européenne (CE) a mis en application le « paquet hygiène » depuis 2006, qui comprend un ensemble de textes législatifs destinés aux professionnels des industries agro-alimentaires ainsi qu'aux organismes de contrôle. Il a pour objectif principal l'harmonisation et l'adoption d'une politique unique et transparente en matière d'hygiène. Selon le règlement 852/2004 du « paquet hygiène », les denrées alimentaires mises sur le marché ne doivent présenter aucun risque sanitaire et avoir une qualité commerciale acceptable. Ces exigences nécessitent un suivi rigoureux de la présence de microorganismes pathogènes ou d'altération directement dans les aliments et au niveau des surfaces susceptibles d'y entrer en contact (équipements, installations, matériaux, machines et accessoires …).

Il existe différents types de contaminants potentiels au sein d'un environnement industriel (bactéries, virus, parasites, substances chimiques …), les risques varient en fonction de la source de contamination et du secteur concerné. Dans ce rapport, il sera question du risque bactérien et en particulier au sein des industries laitières. Le lait et les produits laitiers peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires, du fait qu'ils soient sujets à la contamination par des bactéries pathogènes (*L. monocytogenes, Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*...) (Brisabois *et al.,* 1997) ; leur consommation peut alors être corrélée à des infections telles que la listériose, des gastro-entérites ou encore des douleurs abdominales. Cela est d'autant plus risqué pour les produits prêts à la consommation ne subissant pas de stérilisation, tels que le lait cru ou certains fromages au lait cru. Les bactéries pathogènes, souvent ubiquitaires, proviennent de façon non exhaustive des équipements de traite, de l'environnement des élevages, de la muqueuse des animaux et/ou des équipements de stockage de la matière première. Elles sont alors susceptibles d'être acheminées jusque dans l'environnement des usines alimentaires. La réduction du risque bactérien passe essentiellement par la stérilisation de certains aliments mais surtout par une maîtrise indispensable des procédures de nettoyage-désinfection. Bien que cela garantisse l'élimination, l'inactivation et/ou la destruction de la plupart des germes pathogènes, une partie d'entre eux peut y échapper. C'est pourquoi, il peut survenir des cas sporadiques ou

endémiques d'infections alimentaires. Par exemple, une recrudescence des cas de listériose a été observée en France et dans certains pays de l'Union européenne en 2006 sans qu'aucun aliment n'ait été discriminé et sans aucune explication (Goulet *et al.,* 2008).

## 1.2 Facteurs liés à la contamination des aliments

### 1.2.1 Persistance bactérienne

Le terme « persistance » se rapporte à une sous-population bactérienne qui survit à certains stress bien mieux que le reste de la population (Hofsteenge *et al.,* 2013). Cela a été effectivement observé par Carpentier (2011) qui évoque une minorité de variants phénotypiques, qui sont capables de survivre après nettoyage-désinfection de surfaces inertes. Le terme de persistance n'est cependant pas corrélé uniquement à l'hétérogénéité d'une population d'un point de vue phénotypique. En effet, au cours d'une récente étude réalisée sur *L. monocytogenes,* il a été montré que les souches persistantes ne sont ni plus tolérantes, ni plus résistantes, ni même plus adhérentes aux surfaces inertes que les souches non persistantes (Carpentier *et al.,* 2011). Dans le cadre de cette étude, il est conclu qu'il n'existe pas des propriétés ou de changements phénotypiques uniques attribuant à certaines souches l'avantage de persister mais ce serait la présence de niches qui confèrent aux bactéries une protection contre les conditions environnementales défavorables. Sur les surfaces inertes, les niches peuvent être des microfissures emprisonnant d'autres éléments microscopiques tels que la matière organique, l'eau et/ou résidus de produits chimiques. A partir de ce microenvironnement, les bactéries peuvent être délogées et disséminées par l'intermédiaire d'aliments ou bien à cause de projections d'aérosols après une action mécanique. Sans avoir une définition unique de la persistance, de manière consensuelle ce terme est utilisé lorsque plusieurs souches de même typage moléculaire sont isolées, de façon répétée et dans un intervalle de temps donné, au sein d'un même atelier (Carpentier, 2011).

### 1.2.2 Adhésion bactérienne

Hormis le phénomène de persistance, la présence de bactéries peut être la conséquence de leur adhésion sur des surfaces. Le mécanisme d'adhésion d'une bactérie sur une surface inerte résulte d'une interaction physique attractive. Bien qu'étant un organisme vivant, la bactérie est considérée comme un « matériau physique » chargé et possédant une certaine hydrophobicité. Sachant que les surfaces inertes sont également dotées de propriétés physico-chimiques, des forces d'attractions ou de répulsions peuvent s'exercer entre les deux éléments. En industrie alimentaire, les matériaux constituant les surfaces sont choisis minutieusement afin de minimiser les phénomènes d'attraction. Néanmoins, cela n'est pas suffisant pour éviter l'adhésion bactérienne. En effet, un procédé de nettoyage incomplet entraînant la rémanence de dépôts organiques, aussi appelés « matière organique » ou « matière interférente », peut entrainer des changements dans les propriétés physico-

chimiques des surfaces. Cela aboutit à des modifications de la capacité d'adhésion des bactéries. Par exemple, le conditionnement des surfaces en acier inoxydable (inox) par différents types de lait (entier, demi-écrémé et écrémé) augmente l'hydrophobicité et modifie les propriétés oxydo-réductrices des surfaces, ce qui diminue la capacité d'adhésion d'une souche de *S. aureus* (Hamadi *et al.,* 2014). En complément, il a été montré que l'adhésion dépendait également de la quantité de matière grasse dans le lait (Hamadi *et al.,* 2014). L'adhésion bactérienne à une surface est une première étape vers la résistance à certains agents antibactériens. Les modalités de l'adhésion doivent donc être bien comprises afin d'éviter l'émergence de population résistantes aux procédés de nettoyage-désinfection.

### 1.2.3 Formation d'un biofilm

Le terme « biofilm » est généralement utilisé pour décrire une communauté de micro-organismes, protégée par une matrice extracellulaire polysaccharidique, adhérés entre eux et à une surface biotique ou inerte. La formation d'un biofilm est souvent l'étape consécutive à l'adhésion bactérienne puisque c'est sur des colonisateurs primaires que s'implantent d'autres colonisateurs dît secondaires ; l'ensemble formant une structure tridimensionnelle multicouches. La formation de biofilm est régie par le « quorum sensing », forme de communication inter-cellulaire de cette communauté, qui entraîne une profonde modification dans l'expression de gènes bactériens. Les biofilms font l'objet d'une lutte active puisque les bactéries vivants en communauté possèdent de multiples avantages dont une protection contre les agents agressifs, une disponibilité en nutriments ou encore le transfert horizontal de gènes de résistance aux agents anti-microbiens. En outre, les problèmes résultants sont divers : la matrice protectrice et l'épaisseur du biofilm rendent difficiles la diffusion des agents antimicrobiens ; des gènes codant pour des facteurs de virulence (tels que les adhésines) peuvent être sur-exprimés; et il existe un risque de re-contamination des surfaces par des bactéries qui se détachent du biofilm. En conséquence, le biofilm peut résister aux procédés de nettoyage-désinfection entrainant alors un risque sanitaire potentiel puisqu'il représente un réservoir conséquent de bactéries pouvant contaminer les aliments.

## 2. Nettoyage-désinfection des surfaces et risques associés

### 2.1 Contexte réglementaire

En industrie agro-alimentaire, la mise au point de procédés de nettoyage-désinfection des surfaces permet une élimination physique et chimique des micro-organismes. Tout d'abord, le nettoyage permet l'élimination d'une grande quantité de souillures organiques et de micro-organismes non adhérés. Cette première étape est essentielle puisqu'elle permet d'augmenter l'efficacité de la désinfection, laquelle consiste en la destruction des micro-organismes restants. La désinfection est réalisée à l'aide de produits antimicrobiens dont l'utilisation est très encadrée par la législation. Ces

produits, appelés biocides, peuvent être dangereux pour la santé humaine et animale ainsi que néfastes pour l'environnement. La mise en place du règlement 528/2012 par la Commission Européenne, qui remplace la directive 98/8/CE[1] depuis 2013, permet à la fois de réglementer la mise sur le marché des produits biocides mais aussi l'harmonisation des produits autorisés dans les états membres. Pour cela, ce nouveau règlement exige d'abord l'évaluation des risques encourus par leur emploi dans les domaines industriels concernés, afin d'établir une nouvelle liste de substances approuvées qui remplacerait celle annexée à l'ancienne directive.

Pour des usages alimentaires, les produits biocides sont utilisés à des concentrations bactéricides, définies à l'aide d'une méthode en suspension selon la norme NF EN 1276[2] du Comité Européen de Normalisation (CEN) sur des souches de référence appartenant aux espèces *E. coli*, *P. aeruginosa, S. aureus* et *E. hirae*. Elle consiste en la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) à une température de croissance, un temps de contact et en présence d'une matière interférente donnés, autant de facteurs pouvant influencer leur efficacité. Pour se rapprocher des conditions terrain, l'évaluation de la bactéricidie peut être également réalisée par une méthode porte-germes selon la norme NF EN 13697[3] avec des souches définies. A ce jour, aucune méthode normalisée n'est décrite pour évaluer l'efficacité bactéricide de biocides à partir de bactéries présentes au sein d'un biofilm.

### 2.2 Les produits biocides : notion de substances actives, résidus et « résistance »

Les biocides représentent une large famille de produits antimicrobiens répartis, en fonction de leurs usages, en quatre groupes comprenant au total 22 types[4]. Ceux utilisés en industries agro-alimentaires correspondent au groupe des désinfectants et appartiennent aux produits de type 4 (TP4). Le choix du produit pour la réalisation du nettoyage-désinfection des surfaces repose sur des exigences particulières telles que l'efficacité, une toxicité minimale, un respect des matériaux, une facilité de rinçage, un moindre coût et des conditions pratiques optimales (temps de contact, température d'application). Par définition, ce sont des produits constitués notamment de substances actives qui permettent de combattre, de façon chimique ou biologique, un groupe spécifique ou non de micro-organismes. Ces substances actives peuvent avoir une activité spécifique (ex : ammoniums quaternaires et dérivés phénoliques), mais ils ont le plus souvent une activité non spécifique (ex : oxydants, halogènes, alcools et aldéhydes …) (Allion, 2004).

Suite aux opérations de désinfection, des « traces » de produits biocides - dit en concentrations résiduelles ou sublétales - peuvent subsister au niveau des surfaces alimentaires. Par définition, le résidu d'un produit biocide est un reste de n'importe quelle(s) substance(s) contenue(s) dans le produit d'origine, aussi bien dans son état inchangé ou bien transformé en métabolites, produits de dégradation ou de réactions qui en découlent. Une étude menée par l'AFSA (Agence Européenne de la

Sécurité Alimentaire) dans 16 pays européens y compris la France montre que des résidus de biocides sont détectés dans des échantillons alimentaires (EFSA, 2013). Parmi les biocides concernés, le chlorure de didécyldimethylammonium (CDDA) et le chlorure de benzalkonium (BAC) appartenant tous deux à la famille des ammoniums quaternaires, ont été retrouvés dans 12% des échantillons de lait et de produits laitiers testés (EFSA, 2013).

Les résidus de produits biocides, au contact des bactéries, peuvent conduire à leur adaptation voire à une résistance croisée vis-à-vis d'agents antimicrobiens (biocides et antibiotiques) (Morente *et al.,* 2013). Contrairement aux antibiotiques, il n'existe pas pour les biocides de valeurs seuil consensuelles à partir desquelles il est possible de parler de résistance car cela dépend en particulier des méthodes utilisées (Cerf *et al.,* 2011).

## 2.3 Risques liés à la rémanence de résidus de produits biocides

### 2.3.1 Impact sur la colonisation bactérienne

La survie des bactéries sur les surfaces étant due à l'acquisition d'un phénotype biofilm, il s'est alors avéré pertinent de chercher si la présence de ces résidus de biocides a un rôle positif, négatif ou neutre, dans les étapes de la formation de biofilm. Il a quelque fois été observé une éventuelle corrélation entre la présence de résidus de biocides et l'augmentation de la colonisation de certaines espèces bactériennes sur des surfaces (Syed *et al.,* 2014) (Machado *et al.,* 2011). Syed et ses collaborateurs (2014) ont mis en évidence un lien direct entre la présence de triclosan, trouvé dans certains produits d'hygiène, et l'augmentation de la colonisation par *S. aureus* au niveau des muqueuses nasales et des surfaces inertes (plastique et verre). D'autres part, l'évaluation de la croissance, adhésion et formation de biofilm au sein d'une surface en polystyrène, a montré que certaines souches de *P. aeruginosa* sont capables de s'adapter et d'augmenter leur capacité d'adhésion et de formation de biofilm sur les supports conditionnés par des résidus de BAC (Machado *et al.,* 2011). Cela est d'autant plus significatif lorsque les souches ont préalablement été exposées à des concentrations croissantes de BAC (Machado *et al.,* 2011). Plusieurs autres auteurs ont déjà décrit des changements physiologiques de certaines souches bactériennes, notamment en ce qui concerne leurs capacité d'adhésion et de multiplication au sein des surfaces inertes conditionnées avec différents types de matière interférente (sang, surfactants …) (Machado *et al.,* 2011).

### 2.3.2 Etat Viable Non Cultivable (VNC)

Il a longtemps été pensé que l'absence de colonies dans un milieu de culture usuellement utilisé pour la caractérisation d'un (groupe de) micro-organisme(s) signifiait l'absence de bactéries. Cependant depuis 1982, Xu et son équipe ont défini un nouvel état bactérien : l'état « Viable Non Cultivable » (VNC), qui correspond à une sorte de « dormance » bactérienne lorsque les conditions

environnementales sont défavorables (Oliver, 2004). Cet état ne s'apparente ni à la phase stationnaire de croissance ni à la sporulation. Il s'agit plutôt d'une réponse à différents stress rencontrés par la bactérie : une carence nutritionnelle, une exposition à des températures non optimales, une élévation de la pression osmotique ou encore une disponibilité en oxygène insuffisante (Olivier, 2004). Le problème majeur posé par cet état est que les bactéries maintiennent leur pouvoir pathogène et sont capables de « revivification » lorsque les conditions environnementales deviennent plus favorables (Khamisse *et al.,* 2012 ; Firmesse *et al.,* 2012 ; Olivier, 2004 ).

Les études menées sur les formes VNC au sein des surfaces des industries alimentaires montrent que la proportion de ces formes dépend à la fois du matériau constituant la surface mais aussi du moment pendant lequel sont réalisés les prélèvements : avant ou après le nettoyage-désinfection (Khamisse *et al.,* 2012). C'est grâce à une étude réalisée en 2012 que Khamisse et son équipe sont arrivés à ces précédentes conclusions, lorsqu'ils ont entrepris d'évaluer la proportion de cellules VNC sur deux types de supports inertes : PVC et acier inoxydable. Les résultats ont montré que dans le cas de l'acier inoxydable, le nombre de cellules VNC passe de 1.5 à 2.5 $\log_{10}$ respectivement avant et après simulation d'une étape de nettoyage-désinfection. Cependant, les auteurs soulignent sur le fait que cette étude a été réalisée sur une flore capable de survivre à la procédure de nettoyage-désinfection, ce qui n'est pas forcément le cas pour toutes les bactéries pathogènes retrouvées en industries agro-alimentaires.

Contrairement aux bactéries viables cultivables (VC) facilement quantifiables par dénombrement sur milieu solide, celles des bactéries VNC exigent le recours à des méthodes de biologie moléculaire comprenant la PCR quantitative en temps réel (PCRq). Cette dernière estime le nombre de cellules totales (cellules mortes, VC et VNC). La PCRq peut être associée à des agents chimiques, telle que le PMA, qui sont des agents intercalants de l'ADN double brin libre dans une suspension bactérienne. Ils s'introduisent également au sein de cellules mortes à membranes endommagées pour y fixer l'ADN non libéré. La particularité de ces molécules est que les cellules vivantes à membranes intactes y sont imperméables. Ainsi, la réalisation d'une PCRq sur un extrait d'ADN obtenu à partir d'une suspension bactérienne traitée avec du PMA permet la quantification uniquement des bactéries viables (VC et VNC). La quantification des cellules VNC seules, découle alors de la soustraction des cellules VC (quantification sur milieu solide) aux cellules viables totales (quantification par PCRq-PMA).

## 3. Contexte et objectifs du stage

La base des travaux de recherches menés lors de ce stage repose sur les résultats des études de Syed (2014) et de Machado (2011) et collaborateurs, qui ont montré que la présence de résidus de certains produits biocides sur des surfaces inertes peut augmenter la colonisation bactérienne. Sachant que les industries agro-alimentaires sont constituées de nombreuses surfaces, lesquelles sont désinfectées par

des produits biocides, il s'est avéré primordial d'enrichir les données déjà existantes sur les risques de colonisation par certaines bactéries. Les choix réalisés à chaque niveau (choix des souches bactériennes, des produits biocides, matériaux constituant les surfaces …) ont été toujours effectué dans le souci de reproduire au mieux les conditions retrouvées en industrie laitière. Il existe de nombreuses souches bactériennes candidates, retrouvées en industries laitières, pouvant trouvées une légitimité dans cette étude mais par manque de temps il a été choisi de se restreindre à deux espèces : *L. monocytogenes* pour le fort risque sanitaire qu'elle présente dans les produits laitiers ; et *E. coli* qui est une bactérie ubiquitaire. En ce qui concerne les produits biocides ciblés, l'évaluation du risque éventuel causé par les résidus de CDDA et du N-(3 aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (de son nom commercial « Triameen ») va être étudié. Cette étude portera sur la colonisation bactérienne des surfaces en acier inoxydable, plus connu sous le nom d' « inox », qui est l'un des matériaux constitutif des surfaces inertes le plus retrouvé en industrie laitière.

L'objectif principal de ce stage est de donner des éléments de réponses à l'interrogation suivante : est-ce que le conditionnement des surfaces en inox par des résidus de produits biocides CDDA et Triameen, dilués dans du lait, favorise ou non la colonisation de deux bactéries : *L. monocytogenes* et *E. coli* ? Pour cela, la stratégie menée est double : il y a d'abord quantification des formes Viables Cultivables (VC) par dénombrement en milieu solide ; puis quantification des formes Viables Totales (VT) par PCRq-PMA dans le but de mettre en évidence des formes Viables Non Cultivables (VNC) s'il y en a.

# *II* - Matériels et méthodes

## 1. Les produits désinfectants

### 1.1 Préparation des solutions mères et filles

La plupart des produits désinfectants sont constitués de matières actives et d'excipients. Les concentrations citées par la suite seront exprimées uniquement en matières actives. Les produits désinfectants Triameen (*Quaron, Rennes, France*) et CDDA (*Merk, Hohenbrunn, Allemagne*) utilisés par le laboratoire, sont constitués respectivement de 30 % et 50 % de matières actives et sont fournis sous forme liquide. Les solutions mères sont préparées par pesée du produit brut sur une balance de précision (*Mettler ; 10 à 210 mg*) et les volumes adéquats sont complétés par de l'eau ultrapure. Une fois préparées, ces solutions sont stockées à 4°C idéalement pour une durée de 15 jours (3 semaines au maximum). Pour chaque solution mère, une première solution fille est préparée extemporanément par dilution dans du lait entier (*DLC : 17-02-2015*), lui-même dilué au 1/100$^{ème}$ dans de l'eau ultrapure (appelé « lait 1/100$^{ème}$ » par la suite). Cette solution fille sert de stock pour la réalisation des gammes de concentrations en produits désinfectants, lesquelles sont préparées par dilution de celle-ci dans du lait 1/100$^{ème}$.

### 1.2 Choix des gammes de concentrations

Le travail est réalisé avec des concentrations résiduelles (ou sublétales) en produits désinfectants, il faut donc déterminer les concentrations seuils pour lesquelles il y a une croissance bactérienne malgré la présence de ces produits. Une méthode appelée « seuil de détection » a été mise au point au laboratoire. Elle consiste à conditionner des supports avec différentes concentrations filles en produits désinfectants, puis de les mettre en contact avec une gélose ensemencée. Le « seuil de détection » correspond à la plus forte concentration en produit désinfectant ayant permis la croissance bactérienne et donc pour laquelle il n y'a plus d'halo d'inhibition. Brièvement, la démarche suivie est la suivante : (i) un tube de 10 ml de Bouillon Trypticase Soja (BTS) est ensemencé par une colonie bactérienne issue d'un milieu gélose Trypticase Soja (GTS), puis mis à incuber 24h à 37°C. Après quoi, (ii) il y a dilution de la suspension bactérienne dans du milieu BTS, afin d'avoir une $DO_{\lambda=600nm}$ de 0.1 (soit $10^8$ cellules/ml). Cette suspension est ensuite (iii) diluée au 1/5$^{ème}$ dans du milieu GTS. Le mélange est maintenu liquide dans un bain d'eau chaude pendant la répartition de 5 ml dans des boîtes de Pétri à fond plat (*VWR International, Strasbourg, France*). Une fois la gélose prise en masse, des supports conditionnés sont déposés dans le centre de la boîte ; le côté conditionné faisant face à la gélose ensemencée. Les boîtes de Pétri sont disposées dans des plus grandes boîtes tapissées d'un

papier absorbant humidifié pour maintenir une humidité relative afin de prévenir le dessèchement des supports. Les grandes boîtes sont ainsi mises à incuber en étuve à 37°C pendant 24h.

## 2. Les supports en acier inoxydable

### 2.1 Stérilisation des supports

Les supports sont des coupons de dimension 20 x 10 x 1 mm (*Osmio Water, Kent, RU*), qui doivent être lisses. Avant utilisation, ces supports sont préalablement stérilisés. Tout d'abord, rincés abondamment avec de l'eau osmosée afin d'enlever la poussière, ils sont ensuite baignés dans de l'éthanol 100% durant 30 min. Puis, ils sont rincés cinq fois dans des bains successifs d'eau osmosée. Enfin, ils sont déposés sous un PSM (*Poste de Sécurité Microbiologique*), jusqu'à séchage complet puis stockés à l'intérieur d'une boîte stérile elle-même en acier inoxydable.

### 2.2 Conditionnement des supports

Sachant que tous les essais sont réalisés en triplicat, pour faciliter la manipulation les trois supports sont déposés à l'intérieur d'une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces brucelles également stériles. Pour les supports témoins, 80 µL de lait 1/100$^{ème}$ sont déposés et étalés à l'aide de la pointe de la pipette de façon à recouvrir entièrement les supports. De la même façon, 80 µL de chaque solution fille constituant les gammes de concentrations en produits désinfectants sont déposés et étalés sur les supports. Les boîtes de Pétri sont laissées ouvertes sous le PSM jusqu'au séchage complet des supports alors conditionnés (45 min environ).

## 3. Les souches bactériennes

### 3.1 Choix des souches bactériennes

Le laboratoire possède une collection de plusieurs souches d' *E. coli* et de *L. monocytogenes* ; au total, quatre souches seront traitées dans ce rapport. Parmi elles, deux sont des souches dites de « référence » : *E. coli* ATCC 25 922 et *L. monocytogenes* ScottA. Ces dernières ont été fournis par le centre Pasteur. Les deux autres souches seront dénominées *E. coli 003 et L. monocytogenes* 008**,** elles ont été isolées directement dans des industries laitières (environnement, produits finis…). Chaque souche est stockée en solution nutritive de conservation dans des cryotubes à -80°C. Afin de relancer leur croissance, elles sont repiquées dans des tubes de milieu GTS en pente, puis incubées en étuve à 37°C. Des isolements sur boîtes de milieu GTS sont systématiquement réalisés en parallèle afin de vérifier la pureté des souches. Après 24h de culture, les tubes ensemencés sont placés à 4°C, ils servent alors de stocks pour la réalisation de repiquages.

### 3.2 Préparation des souches

A la veille d'un essai, les souches d'intérêt sont repiquées sur des pentes de milieu GTS à partir des pentes stocks, les tubes sont ensuite mis à incuber 24h à 37°C. Au jour de l'essai, les bactéries sont récupérées dans 20 mL d'eau physiologique, en les décrochant à l'aide d'une oese. La suspension obtenue est centrifugée (3000g ; 15 min) afin de former un culot bactérien. Ce dernier est lavé successivement à deux reprises par 5 mL d'eau physiologique, par alternance de centrifugation (3000g ; 15 min) et re-suspension. A terme, le culot bactérien lavé est remis en suspension dans un faible volume d'eau physiologique. Ces suspensions sont alors ajustées à $10^8$ cellules/ml, ce qui correspond à une $DO_{\lambda=600nm}$ de 0,17 pour *E. coli* et 0,1 pour *L. monocytogenes*. Des dilutions au 1/10$^{ème}$ allant de -1 à -8 sont réalisées dans de l'eau physiologique peptonnée. Les dilutions de -5 à -8 sont ensemencées dans des boîtes de milieu GTS par inclusion de 1 ml, avant d'être incubées 24h pour *E. coli* et 48h pour *L. monocytogenes* ; le but étant de vérifier que le nombre de bactéries est bien aux alentours de $10^8$ cellules/ml. Dans le cas contraire, il y a réajustement par dilution.

### 3.3 Contamination et incubation des supports

Dans le but de reproduire les conditions retrouvées en industrie laitière, les supports conditionnés sont contaminés à raison d'une centaine de bactéries, ce qui correspond à 10 µl de la dilution -4 de la suspension initiale de $10^8$ cellules/ml. Un triplicat de supports témoins est traité directement après contamination (témoins de « non-colonisation »). Un autre triplicat de supports témoins et les supports conditionnés avec différentes concentrations filles en produits désinfectants sont incubés à 20°C afin de favoriser la colonisation bactérienne. Pour éviter un maximum le dessèchement de la suspension étalée sur ces supports, deux petits tampons de papier absorbant humidifiés sont déposés aux deux pôles opposés des boîtes de Pétri contenant les supports conditionnés et contaminés. Ces boîtes de Pétri sont disposées dans une plus grande boîte, laquelle est tapissée par deux feuilles de papier absorbant humidifié avec 10 ml d'eau stérile. Les supports sont ainsi mis à incuber pendant 20±4h pour *E. coli* et 40±4h pour *L. monocytogenes*.

## 4. Traitement des supports sans et après incubation

### 4.1 Témoins de « non-colonisation »

Ces témoins permettent de vérifier qu'après l'étape de traitement des supports, décrite ci-après, le nombre de bactéries récupéré correspond à la centaine déposée. Tout de suite après leur contamination, ces supports sont déposés individuellement dans des tubes en verre contenant 4 ml d'eau physiologique peptonnée. Ces tubes sont ensuite disposés dans un bain à ultrasons (*Elma, Singen, Allemagne*) (35 KHz, 2 min), puis vortexés 15 sec afin de renforcer le décrochage des bactéries.

Enfin, 1 ml de chaque tube est ensemencé dans une boîte de milieu GTS par inclusion. De plus, chaque support est récupéré puis inclut également afin de vérifier le bon décrochage des bactéries. Les boîtes de milieu GTS ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 24h *E. coli* et 48h pour *L. monocytogenes.*

### 4.2 Après incubation

Un triplicat de supports témoin et de supports conditionnés avec les différentes solutions filles en produits désinfectants ont été incubés à 20°C. Ils subissent le même traitement que celui décrit précédemment (cf : paragraphe ***II*** – **4.1**) à une exception près. En effet, après l'étape de vortex durant 15 sec, la suspension de 4 ml est diluée en série au 1/10$^{ème}$ jusqu'à la dilution -5 ; l'incubation à 20°C ayant permis la multiplication bactérienne, il est nécessaire de réaliser des dilutions afin d'effectuer un dénombrement. Ensuite, il y a inclusion dans des boîtes de milieu GTS de (i) 1 ml de chaque tube, (ii) de 1 ml des dilutions allant de -1 à -5 associées, ainsi que (iii) des supports. Les boîtes de milieu GTS ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h *E. coli* et 48h pour *L. monocytogenes.*

## 5. Mise en place de la méthode PCRq-PMA

### 5.1 Extraction d'ADN et conditions PCRq

La réalisation d'une PCRq nécessite une extraction préalable des acides nucléiques (ADN), qui est effectuée à l'aide du kit d'extraction « Nucleospin Tissue » (*Macherey-Nagel, Düren, Allemagne*) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, le culot bactérien est récupéré après centrifugation (15 000g, 5 min) puis traité par une solution de lyse qui permet à la fois la lyse des membranes/parois bactériennes mais aussi la dégradation des protéines grâce à l'action de la Protéinase K (56°C ; 1h). L'ADN libéré est précipité par de l'éthanol 100% puis fixé sur une colonne de silice, laquelle est lavée successivement à l'aide de tampons de lavage. Enfin, l'ADN est élué dans 100 µL de tampon d'élution préalablement chauffé à 70°C.

La PCRq mise en place au laboratoire repose sur la chimie Syber™ Green I, utilisant un agent intercalant de l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Cet agent émet une fluorescence mesurable quand il est excité par des rayonnements ultraviolet (UV) et lorsqu'il est intercalé dans l'ADN. Ainsi, l'intensité de la fluorescence augmente de façon proportionnelle à la quantité d'amplicons formés. Les résultats sont exprimés en termes de « *threshold cycle*» (Ct), soit le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour avoir une fluorescence suffisamment significative. Le nombre de Ct est inversement proportionnel à la quantité d'amplicons. Ces derniers sont générés par amplification d'un gène cible grâce à des amorces spécifiques. Dans cette étude, les gènes ciblés sont le *16S rRNA* codant pour l'ARN 16S chez *E. coli* et *hlyA* codant une listériolysine chez *L. monocytogenes.* Les couples d'amorces respectivement sens et antisens sont 5'cat gcc gcg tgt atg aag aa3' et 5'cgg gta acg tca atg agc aaa3'

pour le gène *16S rRNA* ; ainsi que 5'tgc aag tcc taa gac gcc3' et 5'cac tgc atc tcc gtg gta tac taa a3' pour le gène *hlyA*. Afin de tester la spécificité des amorces choisies, deux types de témoins sont réalisés par amplification : (i) à partir d'un extrait d'ADN issu d'une colonie isolée sur boîte de milieu GTS remise en suspension dans de l'eau DEPC (témoin positif) ; (ii) où le volume d'ADN est remplacé par de l'eau DEPC (témoin négatif). Les résultats de PCR sont exploités uniquement si ces témoins donnent des résultats cohérents. D'un point de vu expérimental, l'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL en micro-tubes : 12,5 µl d'un mix d'amplification IQ™ SYBR®Green Supermix 2X ; 500 nM des amorces sens et anti-sens ; 5 µL d'extrait d'ADN ; puis le volume est ajusté à 25 µL par de l'eau ultrapure DEPC (*Invitrogen, Carlsbad, USA*) dépourvue de Dnase et de Rnase. Chaque amplification est réalisée en duplicat technique. Les micro-tubes sont placés dans un thermocycleur Chromo 4 (*Briorad, Californie, USA*), sont soumis au programme d'amplification suivant : une étape de dénaturation et d'activation de la polymérase (95°C ; 3 min) suivie de 40 cycles alternant une étape de dénaturation (95°C ; 20s), d'hybridation (57°C ; 20s) et enfin d'élongation (72°C ; 20s). Une lecture de la fluorescence est réalisée à la fin de chaque cycle. La température de fusion (Tm), représentant la température à laquelle il y a hybridation des amorces sur les matrices d'ADN, doit être quasi-identique pour tous les essais réalisés avec le même couple d'amorce. Pour vérifier cela, les amplicons sont soumis à une augmentation de la température de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C toutes les 5 sec tout en mesurant l'intensité de fluorescence en continu.

### 5.2 Courbe standard de quantification

Pour comparer les résultats de quantification obtenus par dénombrement (formes VC) de la PCRq-PMA (formes VT), une courbe standard de quantification est réalisée. Celle-ci permet d'avoir une correspondance entre le $\log_{10}$ UFC/ml et le nombre de Ct. Une courbe sera effectuée pour chacune des souches de référence. Pour cela, les bactéries sont repiquées dans 10 ml d'un bouillon BTS puis incubé 24h à 37°C. Le lendemain, la suspension est ajustée à $10^8$ cellules/ml, puis diluée au 1/10$^{ème}$ de -1 à -8. Un dénombrement sur boîtes de milieu GTS est réalisé par inclusion de 1 ml des dilutions -5 à -8. Ensuite, il y a extraction d'ADN à partir de 1 ml de la suspension pure et des dilutions -1 à -5 puis réalisation d'une PCRq à partir des extraits d'ADN obtenus. Grâce aux résultats du dénombrement sur milieu solide, il sera possible de déterminer la quantité de bactéries dans la suspension pure, puis d'en déduire celui des dilutions -1 à -5. Ainsi, une courbe de tendance : nombre de Ct = f($\log_{10}$ UFC/ml) sera tracée. A l'aide des données associées à cette courbe, il sera possible d'analyser la linéarité par la valeur du coefficient de corrélation $R^2$ ; l'efficacité de la PCRq (Eff) correspondant à $10^{-1/pente}$ ; la spécificité des amorces à l'aide des Tm ; et, la sensibilité de la méthode par la détermination du nombre de copies du gène cible nécessaire pour atteindre le seuil de positivité de la méthode.

### 5.3 Validation de la méthode PCRq-PMA

La PCRq-PMA n'est pas une méthode utilisée en routine au laboratoire, une première étape va donc consister à sa mise en place et à vérifier qu'elle permet effectivement de quantifier les formes VT. Pour rappel, une PCRq en absence de PMA permet l'amplification d'un gène cible dans un extrait d'ADN obtenu à partir de toutes les cellules d'une suspension (mortes, VC et VNC), tandis que la PCRq-PMA permet cet amplification uniquement à partir de la totalité des cellules viables (VC et VNC). Le PMA empêche donc l'amplification de gènes cibles issus de bactéries mortes. Nous avons réalisé des essais en nous inspirant de l'étude de Pan et son équipe (2007). Le but étant de trouver une variation logique des résultats de PCRq seule ou de PCRq-PMA en fonction de la proportion de cellules viables et mortes. Pour cela, quatre suspensions différentes ont été préparées à partir des souches de référence, elles contiennent : (i) 8 $\log_{10}$ cellules/ml de bactéries vivantes ; (ii) 4 et 7 $\log_{10}$ cellules/ml de bactéries respectivement vivantes et mortes ; (iii) 3 et 7 $\log_{10}$ cellules/ml de bactéries respectivement vivantes et mortes ; enfin, 8 $\log_{10}$ cellules/ml de bactéries mortes. Les bactéries mortes sont obtenues après un choc thermique : la suspension est incubée 10 min à 95 °C puis directement refroidie dans de la glace durant 10 min. Pour chacune des préparations ci-dessus, une PCRq seule et une PCRq-PMA ont été réalisées après une extraction préalable de l'ADN. D'un point de vue technique, brièvement les bactéries sont repiquées dans un bouillon BTS, lequel est mis à incuber 24h à 37°C. Au lendemain, une suspension est préparée à $10^8$ cellules/ml, laquelle est diluée au $1/10^{ème}$ de -1 à -8 dans de l'eau physiologique peptonnée. Un dénombrement sur boîte de milieu GTS est réalisé par inclusion de 1 ml des dilutions -5 à -8. Les préparations de 8 $\log_{10}$ ; 4 $\log_{10}$ ; 3 $\log_{10}$ cellules/ml nécessaires aux essais correspondent respectivement à la suspension pure, à la dilution -3 et à la dilution -4. Ensuite, le PMA est ajouté dans les tubes à traiter à raison de 50 µM dans 500 µL de suspension. Après homogénéisation totale, les tubes traités au PMA sont incubés 5 min à l'obscurité. L'activation du PMA est ensuite réalisée durant 10 min par utilisation de l'appareil Phast Blue (*GenIUL, Barcelone, Espagne*) à une intensité de 80 %. Une extraction d'ADN est ensuite réalisée, pour les tubes traités ou non au PMA, suivie d'une PCRq.

## 6. Quantification bactérienne

### 6.1 Bactéries viables Cultivables (VC) - Dénombrement

La quantification de bactéries VC est réalisée grâce au comptage des colonies ayant poussées sur les boîtes de milieu GTS. Les comptages sont pris en compte uniquement lorsque le nombre de colonies est compris entre 15 et 300. Le dénombrement bactérien est exprimé en nombre d'Unité Formant Colonies (UFC) par support (UFC/support). Ce calcul est réalisé à l'aide de la formule suivante : *[(Somme des colonies de toutes les boîtes contenant 15 à 300 colonies) / ($D_1$ + 0.1 * $D_2$)* FDil* V)]* avec

$D_1$ : nombre de boîtes conservées à la première plus forte dilution ; $D_2$ : nombre de boîtes conservées à la seconde plus forte dilution ; *Fdil* : le plus fort taux de dilution ; et *V* : volume de suspension inoculé par boîte.

### 6.2 Bactéries viables Totales (VT) – PCRq-PMA

La PCRq-PMA est réalisée à partir de 500 µL des 4 ml de suspension obtenue juste après passage des supports aux ultrasons (cf : paragraphe ***II*** – **4.2**), le PMA est ajouté à raison de 50 µM par aliquot. Après une extraction d'ADN, une PCRq est réalisée comme décrit précédemment (cf : paragraphe : ***II*** – **5.1**).

## 7. Méthode d'exploitation des résultats et analyses statistiques

Afin de faciliter l'exploitation des résultats, les calculs de dénombrement obtenus en nombre d'UFC/support sont transformés par application de la fonction logarithme base 10 ($\log_{10}$). Sachant que chaque essai est réalisé en triplicat technique, une moyenne du dénombrement en $\log_{10}$ UFC/support est réalisée associé à un écart-type.

Les concentrations en produits désinfectants sont exprimées en partie par milliard (ppb), cette unité se rapporte à un rapport de $10^{-9}$ entre deux valeurs, elle est équivalente au ng/ml ou bien au µg/l.

L'analyse statistique de la comparaison de la quantité de bactéries VC entre les supports conditionnés ou non avec les produits désinfectants (cf : paragraphe ***III*** – **2.1**) ainsi que pour la comparaison inter-souche de leur capacité de multiplication (cf : paragraphe ***III*** – **2.2**), sont réalisés à l'aide du test ANOVA one-way. Si une différence significative est trouvée, le test post-hoc de Bonferroni sera effectué avec un intervalle de confiance de 95% afin de situer cette différence. Pour la comparaison de la quantification des formes VC et VT (cf : paragraphe ***III*** – **3.3**), l'analyse statistique sera réalisée à l'aide du test ANOVA two-way, suivie du test de Bonferroni si besoin.

Les tests statistiques donnent des valeurs de $p_{value}$ (p) qui déterminent la significativité de la différence : il n'y a pas de différence significative quand $p > 0,05$ tandis qu'il en a une quand la $p < 0,05$ (*). Dans ce dernier cas, la différence peut être hautement ($p < 0,01$)(**) ou bien très hautement ($p < 0,001$) (***) significative.

# *III* - Résultats

## 1. Gammes de concentrations en produits désinfectants

Une gamme de concentrations par produit désinfectant a été déterminée par souche à l'aide de la méthode du « seuil de détection », laquelle a permis de détecter la plus forte concentration pour laquelle il y a une croissance bactérienne. A partir de cette concentration, la gamme a été réalisée par quatre dilutions successives au 1/4$^{ème}$ ; il y a donc au total cinq concentrations par gamme (**tableau 1**).

**Tableau 1** *:* **Gammes de concentrations en produits désinfectants Triameen et CDDA par souche bactérienne.** Les valeurs entre crochets indiquent la plus faible et la plus forte concentration, exprimées en ppb ou ng/ml.

| Souches / produits désinfectants | Triameen (ppb) | CDDA (ppb) |
|---|---|---|
| *E. coli* ATCC 25 922 | [11,7 - 3000] | [3,7 - 937] |
| *E. coli* 003 | [2,9 - 750] | [0,9 - 234] |
| *L. monocytogenes* ScottA | [2,9 - 750] | [0,9 - 234] |
| *L. monocytogenes* 008 | [0,7 - 187,5] | [0,2 - 58,6] |

Les résultats montrent que les souches de référence *E. coli* ATCC 25 922 et *L. monocytogenes* ScottA sont systématiquement plus tolérantes au Triameen et au CDDA que les autres souches de la même espèce, respectivement *E. coli* 003 et *L. monocytogenes* 008. Ces premières sont effectivement tolérantes à des concentrations quatre fois plus élevées. Toutes les souches sont environ trois fois plus tolérantes au Triameen par rapport au CDDA. Les souches *E. coli* 003 et *L. monocytogenes* ScottA semblent avoir la même tolérance vis-à-vis du Triameen et du CDDA.

## 2. Quantification des bactéries Viables Cultivables (VC)

### 2.1 Comparaison du dénombrement bactérien obtenu à partir des supports conditionnés avec les produits désinfectants par rapport à celui des supports témoins

#### 2.1.1 Témoins de « non-colonisation »

Le traitement des résultats suppose la validation des témoins de « non-colonisation », non soumis à une incubation à 20°C. Pour cela, il faut que le dénombrement bactérien obtenu de ces témoins corresponde à la centaine de batéries déposées (cf : paragraphe ***II*** – **4. 1**) (résultats non montrés).

Il est stipulé qu'il y a eu « colonisation des supports » lorsque le dénombrement des bactéries sur les supports incubés à 20°C est supérieur à celui des témoins de « non-colonisation », soit supérieur à une centaine d'UFC/supports (ou 2 $\log_{10}$ UFC/support). Les résultats d'après colonisation regroupés en fonction des produits désinfectants et des souches, sont illustrés à l'aide des **figures 1** et **2**. Sans décrire au cas par cas, les dénombrements des supports témoins après incubation à 20°C sont compris entre 5 à 7 $\log_{10}$ UFC/support, il y a donc bien eu multiplication des bactéries et colonisation des supports.

Les résultats du dénombrement obtenus à partir des supports conditionnés avec les produits désinfectants sont directement comparés à ceux des supports témoins conditionnés avec du lait 1/100$^{ème}$ uniquement (« Témoin » sur les **figures 1** et **2**).

### 2.1.2 Résultats de la comparaison

Pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25 922, il y a significativement moins de bactéries récupérées sur les supports conditionnés avec des concentrations de 750 et 3000 ppb de Triameen (**Fig1. A**) : pour 750 ppb de Triameen, il y a 0,7 $\log_{10}$ UFC/support en moins ($p < 0,05$) ; et pour 3000 ppb, aucune bactérie n'est dénombrée ($p < 0,001$). Les deux plus fortes concentrations de la gamme de CDDA entrainent également une diminution significative du nombre de bactéries (**Fig1. B**) : 234 ppb de CDDA engendrent une diminution d'environ 0.7 $\log_{10}$ UFC/support ($p < 0.001$) ; et pour 937 ppb, aucune bactérie n'est dénombrée ($p < 0.001$). En ce qui concerne la souche *E. coli* 003, aucune différence significative n'est observée en présence ou en absence de Triameen (**Fig1. C**) ou de CDDA (**Fig1. D**).

Pour la souche de référence *L. monocytogenes* scottA, il y a une diminution significative du nombre de bactéries pour la quasi-totalité de la gamme de concentrations de Triameen ($p < 0,05$) (**Fig2. A**). En effet, pour des concentrations de 2,9 ppb ; 11,7 ppb ; et 187,5 ppb, il y a une diminution respectivement d'environ 1 $\log_{10}$ ; 0,8 $\log_{10}$ ; et 0,75 $\log_{10}$ UFC/support (respectivement $p < 0,01$ et deux fois $p < 0.05$). A la plus forte concentration de la gamme, soit 750 ppb, il n'y a pas de bactéries dénombrées ($p < 0,001$). Aucune différence significative n'est observée pour 46,9 ppb, cela est surprenant puisque cette concentration est encadrée par des concentrations conduisant une diminution significative du nombre de bactéries. Ce résultat pourrait provenir d'une erreur de manipulation (colonisation avec un plus grand volume de bactéries, mauvaise réalisation de la gamme de concentration …). En ce qui concerne les supports conditionnés avec le CDDA, deux concentrations sont responsables d'une diminution significative du nombre de bactéries (**Fig2. B**) : 58,6 ppb entrainent une diminution de 0.7 $\log_{10}$ UFC/support ($p < 0,01$) ; et pour 234 ppb, aucune bactérie n'est dénombrée ($p < 0,001$). Enfin, en ce qui concerne la souche *L. monocytogenes* 008, une diminution significative d'environ 0.3 $\log_{10}$ UFC/support ($p < 0,05$) est observée en présence de 187,5 ppb de Triameen (**Fig2. C**). Cependant, aucune différence significative n'est observée en présence de CDDA (**Fig2. D**).

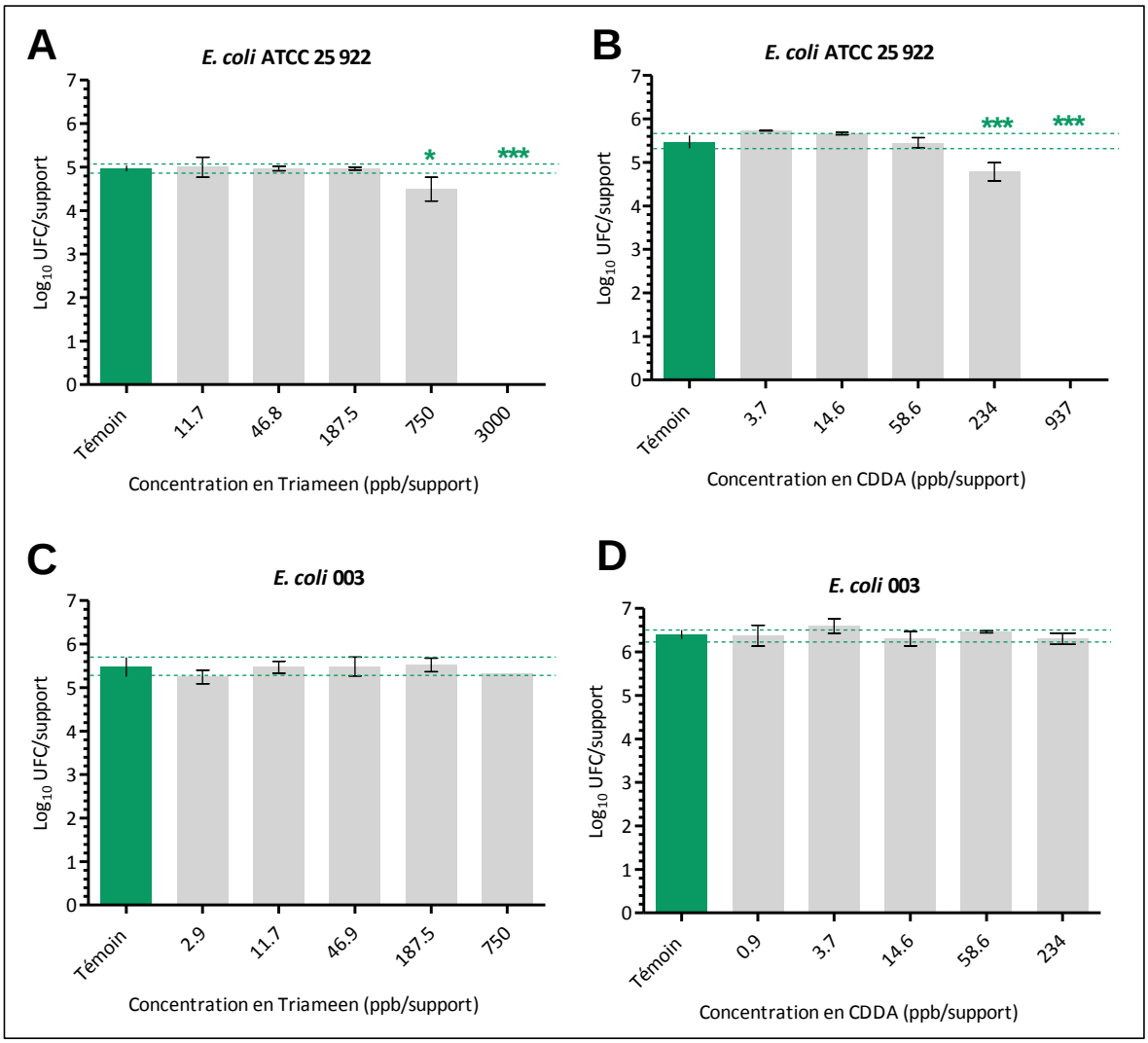



Figure 1: **Comparaison du dénombrement obtenus des supports conditionnés avec différentes concentrations de Triameen ou de CDDA (gris) par rapport aux supports témoins conditionnés avec du lait 1/100ème seul (vert) pour les souches *E. coli* ATCC 25 922 (A, B) et 003 (C, D)**. Résultats exprimés en $\log_{10}$ CFU/support en fonction de la concentration en produit désinfectant en ppb/support. Pour chaque point de la gamme, les histogrammes correspondent à la moyenne des valeurs de $\log_{10}$ CFU/support du triplicat ; les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types. Les lignes pointillées correspondent aux écarts types inférieurs et supérieurs des supports témoins. Les étoiles (*) correspondent aux valeurs significativement différentes des témoins

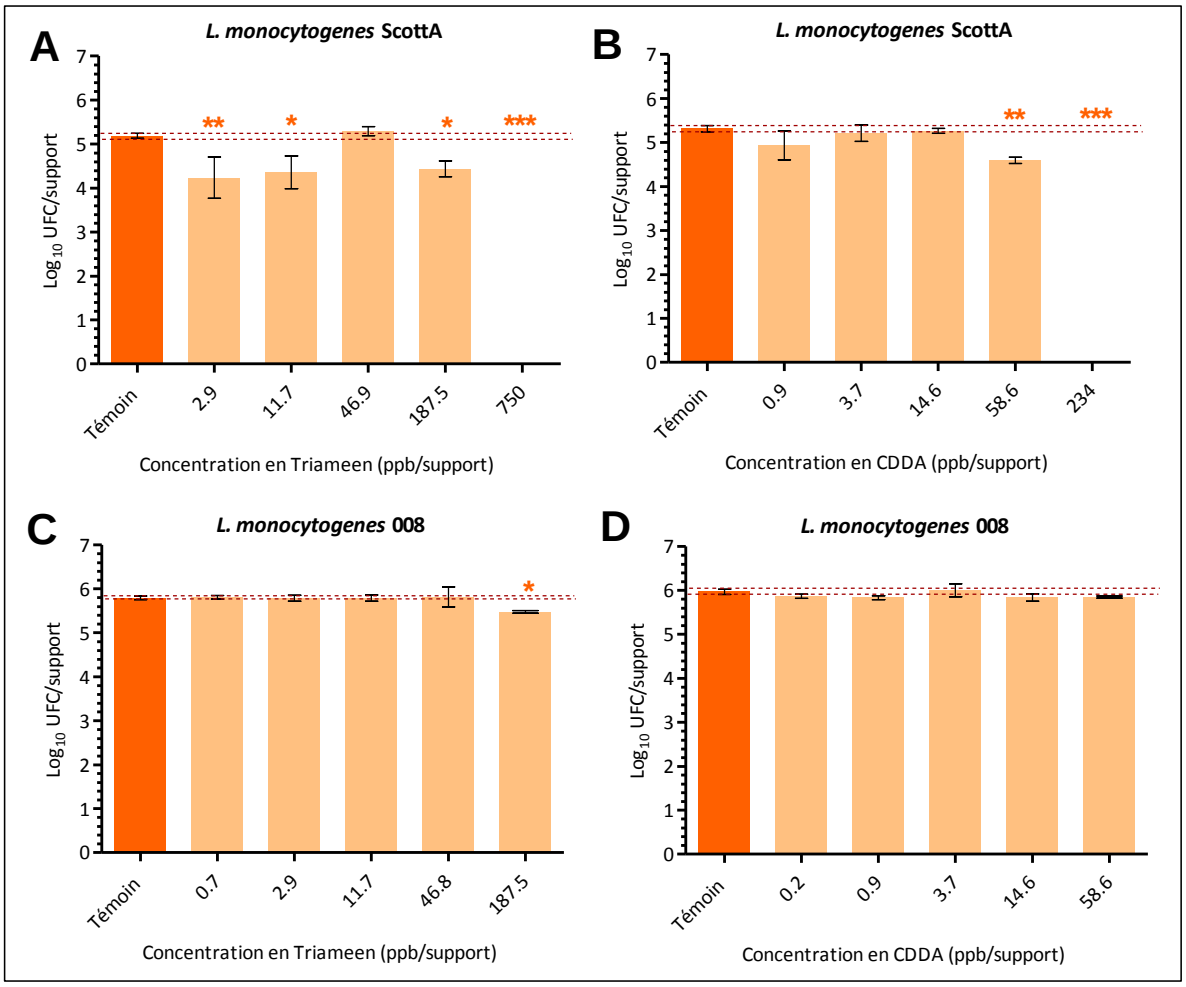



Figure 2 : **Comparaison du dénombrement obtenus des supports conditionnés avec différentes concentrations de Triameen ou de CDDA (clair) par rapports aux supports témoins conditionnés avec du lait 1/100ème seul (foncé) pour les souches L. monocytogenes ScottA (A, B) et 008 (C, D).** Résultats exprimés en $\log_{10}$ CFU/support en fonction de la concentration en produit désinfectant en ppb/support. Pour chaque point de la gamme, les histogrammes correspondent à la moyenne des valeurs de $\log_{10}$ CFU/support du triplicat ; les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types. Les lignes pointillées correspondent aux écarts types inférieurs et supérieurs des supports témoins. Les étoiles (*) correspondent aux valeurs significativement différentes des témoins.

### 2.2 Comparaison inter-souche de la capacité de multiplication sur les supports

Les dénombrements des supports témoins sont comparés entre les souches et les résultats sont illustrés à l'aide de la **figure 3**. Ces résultats vont permettre de mettre en évidence les différences capacité de multiplication entre les souches sur les supports.

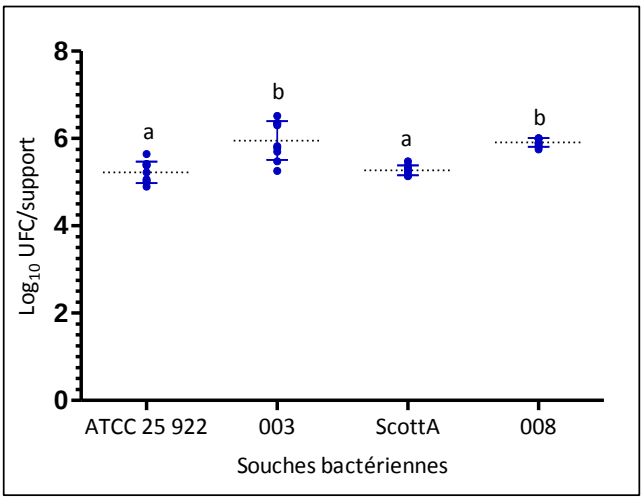



**Figure 3** : **Comparaison du dénombrement bactérien en $log_{10}$ UFC/support des supports témoins en fonction des souches : *E. coli* ATCC 25 922 et 003 ; *L. monocytogenes* ScottA et 008**. Les résultats sont obtenus à partir de triplicat techniques et biologiques (n = 3) ; soit 9 valeurs/souche. Les lettres identiques indiquent les souches pour lesquelles il n'y a pas de différence significative.

Il y a une différence significative dans la colonisation des supports témoins entre les souches ($p < 0,001$). Les deux souches de référence *E. coli* ATCC 25 922 et *L. monocytogenes* ScottA, dont la colonisation est statistiquement équivalente (a), présentent une plus faible colonisation comparée aux autres souches de la même espèce (b) ($p < 0,001$). La différence est d'environ 0.7 $log_{10}$ UFC/support. Les souches de *L. monocytogenes* 008 *et E. coli* 003 (b) ne présentent pas de différence significative entre elles.

## 3. Mise en place de la PCRq-PMA

### 3.1 Courbe standard de quantification

La courbe standard de quantification permet de donner les équivalences entres les valeurs $log_{10}$ UFC/ml et le nombre de Ct afin de comparer les résultats de quantification des bactéries VC (dénombrement) et des formes VT (PCRq-PMA). Elles ont été réalisées à partir des souches de référence *E. coli* ATCC 25 922 et *L. monocytogenes* ScottA et sont illustrées au sein de la **figure 4.** Pour le tracé de ces courbes, toutes les valeurs de Ct obtenues pour les dilutions de la suspension bactérienne d' *E. coli* ATCC 25 922 ont été conservées, tandis que pour *L. monocytogenes* ScottA les dilutions -4 et -5 n'ont pas été prises en compte car aucune amplification par PCRq n'a été détectée.

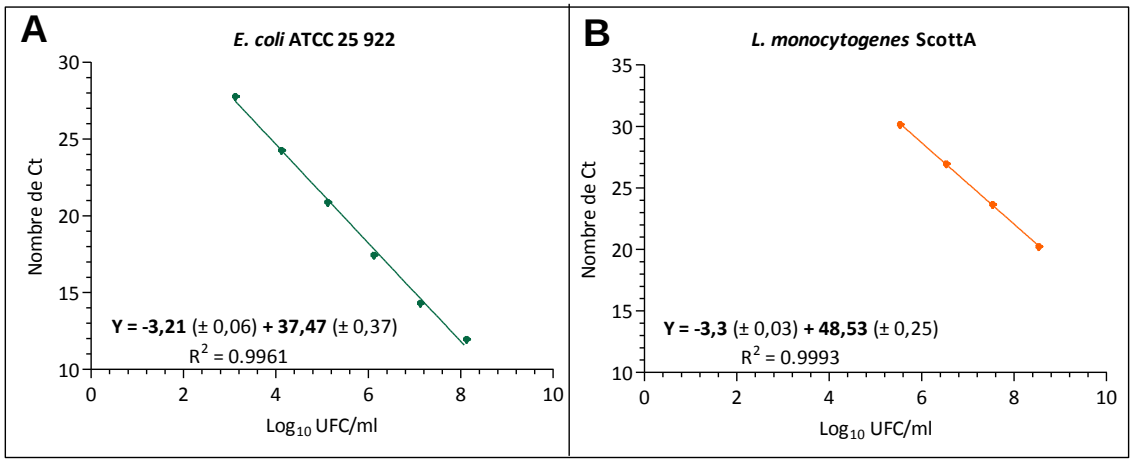



Figure 4 : **Courbes standards de quantification donnant la relation entre le $log_{10}$ UFC/ml et le nombre de Ct pour les souches *E. coli* ATCC 25 922 (A) et *L. monocytogenes* ScottA (B)**. Les nombre de Ct sont obtenus à partir de suspensions pures et diluées (-1 à -5). L'équation des courbes sont sous forme y=ax+b et la force de la corrélation est estimée par le coefficient de corrélation $R^2$.

Les coefficients de régression $R^2$ des deux courbes sont supérieurs à 0.95 ($R^2$ = 0.9961 pour *E. coli* ATCC 25 922 (**Fig4. A**) ; $R^2$ = 0.9993 pour *L. monocytogenes* ScottA (**Fig4. B**), ce qui atteste d'une bonne linéarité des courbes et donc d'une proportionnalité entre $log_{10}$ UFC/ml et le nombre de Ct.

L'efficacité (Eff) de la PCR est calculée à l'aide de la formule Eff = $(1 + 10^{-1/pente})$, ce paramètre permet d'estimer le nombre de molécules générées par ADN cible et par cycle. Sachant qu'une PCRq est une réaction exponentielle alors le nombre de molécules théorique générées par ADN cible est de 2. L'efficacité des deux courbes est bonne puisque les valeurs sont de 2,05 (**Fig4. A**) et de 2 (**Fig4. B**), ce qui équivaut à une efficacité respectivement de 102,5 % et 100 %.

La spécificité d'une PCRq permet de vérifier si le couple d'amorces choisi amplifie uniquement le gène cible ; elle est évaluée par le « *melting température* » ou « température de fusion » (Tm) obtenu à partir des courbes de fusion réalisées en fin d'amplification. Pour le couple d'amorce ciblant le gène *16S rRNA,* le Tm est compris entre 80,5 et 81°C et celui ciblant le gène *hlyA* est compris entre 77,5 et 78°C. La différence de Tm entre les échantillons étant très faible (0,5°C au maximum), les deux couples d'amorces utilisés sont donc spécifiques aux gènes ciblés.

La sensibilité dépend de la quantité de copies du gène cible qu'il faut dans l'extrait d'ADN pour atteindre le seuil de positivité de la PCRq. Considérant qu'une bactérie possède une copie du gène cible, alors la limite de positivité correspond à la quantité de bactéries dans la plus forte dilution donnant une amplification positive. L'idéal serait d'atteindre la positivité de la PCRq à partir d'une seule copie du gène cible dans le mix réactionnel. Ici, la limite de positivité correspond à environ $10^3$ copies du gène *16S rRNA* par essai, soit 5 copies/mix réactionnel. Pour le gène *hlyA*, il faut plus de $10^5$ copies par essai, soit au minimum 500 copies /mix réactionnel.

### 3.2 Validation de la PCRq-PMA

Dans l'objectif de valider la méthode de PCRq-PMA mise en place au laboratoire, différents tests ont été effectués (cf : paragraphe *II* - 5.3) et les résultats sont illustrés à l'aide de la figure 5. La PCRq seule donne un nombre de Ct correspondant à l'amplification du gène cible chez toutes les formes bactériennes (mortes, VC et VNC), tandis que seules les formes viables (VC et VNC) sont prises en compte pour la PCRq-PMA. Il est attendu que le nombre de Ct soit plus élevé en PCRq-PMA par rapport à la PCRq seule, et cela de façon proportionnelle à la quantité de bactéries mortes.

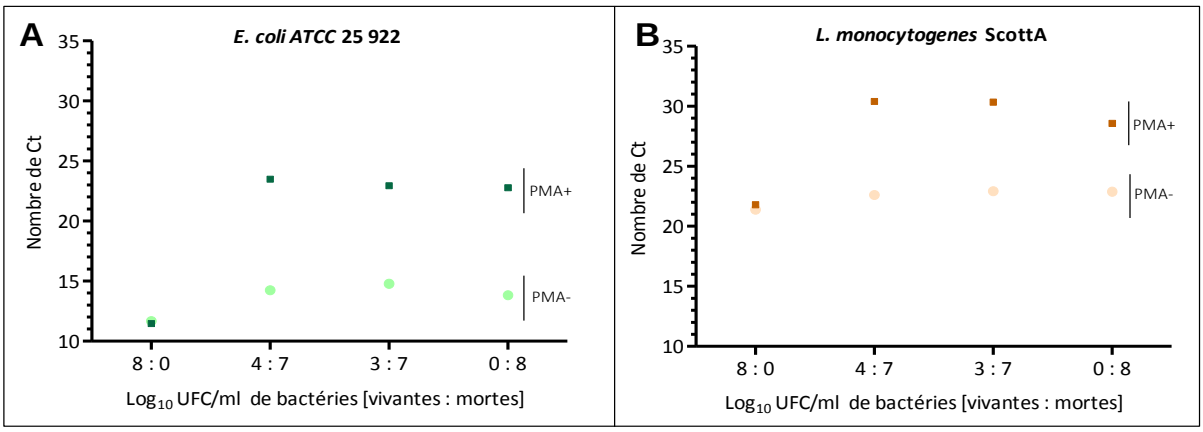



Figure 5 : **Résultats des essais préliminaires de PCRq-PMA**. Les essais diffèrent selon le ratio de bactéries vivantes et mortes, exprimé en $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries [vivantes : mortes] mais aussi selon l'ajout (PMA+ ; couleur foncée) ou non (PMA - ; couleur claire) de 50 µM de PMA.

Visuellement, les résultats montrent les mêmes variations pour les essais réalisés pour les deux espèces bactériennes (Fig5. A & B). Pour l'essai (i) contenant 8 $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries vivantes, les nombres de Ct sont équivalents en présence ou en absence de PMA. Lorsque les échantillons contiennent des bactéries mortes, cas des essais (ii) (iii) et (iv), les valeurs de Ct sont plus élevées lorsque les suspensions sont traitées avec du PMA. Si ces résultats semblent jusqu'ici cohérents, il n'ya pas une différence croissante du nombre de Ct lorsque la proportion de bactéries mortes augmente, ou que la proportion de bactéries vivantes diminue. Des delta(Ct) sont calculés à partir des essais (ii), (iii) et (iv) par soustraction du nombre de Ct obtenu avec les essais traités au PMA à ceux obtenus par les essais non traités ; ils sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : **Différence du nombre de Ct (Delta (Ct)) entre le nombre de Ct des essais traités au PMA à celui des essais non traités pour les souches *E. coli* ATCC 25 922 et *L. monocytogenes* ScottA.**

| Essais | | (i) | (ii) | (iii) | (iv) |
|---|---|---|---|---|---|
| [$\log_{10}$ UFC/ml bactéries vivantes : $\log_{10}$ UFC/ml bactéries mortes] | | 8 : 0 | 4 : 7 | 3 : 7 | 0 : 8 |
| Delta Ct | *E. coli* ATCC 25 922 | 0 | 7,8 | 7,4 | 5,6 |
| | *L. monocytogenes* ScottA | 0 | 8,2 | 8,2 | 8,9 |

Pour les deux souches, quasiment le même delta(Ct) est observé à partir des essais (ii), (iii) et (iv) tandis qu'ils possèdent différentes proportions de bactéries mortes, respectivement 3 $\log_{10}$, 4 $\log_{10}$ et 8 $\log_{10}$ UFC/ml.

## 4. Quantification des bactéries Viables Non Cultivables (VNC)

### 4.1 Choix et conditions de comparaison de la quantification des formes VT et VC

Les résultats de quantification des formes VC à partir des supports conditionnés avec les produits désinfectants ont montré quelques concentrations en Triameen et CDDA pour lesquelles il y a une diminution des formes VC (**Fig.1 & 2**). La démarche établie par la suite consiste à rechercher si ces diminutions des formes VC ne pourraient pas s'expliquer par un changement phénotypique des bactéries sous forme VNC. S'il y a un plus grand nombre de bactéries sous formes VT par rapport aux formes VC, alors il sera conclu que des formes VNC existent. Dans le cas des souches de référence, la quantification des formes VT sera réalisée pour une concentration en Triameen ou en CDDA pour lesquelles il y a une diminution des formes VC ; mais également sur une autre concentration n'ayant pas d'impact sur les formes VC qui servira de témoin. Pour les deux autres souches, sachant qu'aucun changement n'est observé dans la quantification des formes VC avec ou sans produits désinfectants (**Fig.1 & 2**), quelques concentrations en Triameen et CDDA seront choisies aléatoirement pour la quantification des formes VT.

### 4.2 Comparaison de la quantification des formes VT et VC

Les résultats de la comparaison de la quantification des bactéries VC et VT pour les deux souches d' *E. coli* en présence de Triameen et de CDDA sont illustrés par la **figure 6**. Pour la souche *E. coli* ATCC 25 922, il y a 0.8 $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries sous formes VT en plus par rapport aux formes VC ($p < 0{,}001$) pour une concentration de 750 ppb/support de Triameen. Cet écart pourrait s'expliquer par l'existence de formes VNC. Par ailleurs, des formes VNC ont également été détectées sur le support témoin ($p < 0,05$) mais de façon moins significative. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les formes VT et VC pour les souches *E. coli* ATCC 25 922 en présence de CDDA ; ni même pour la souche *E. coli* 003 en présence de Triameen ou de CDDA.

La quantification des formes VT par PCRq-PMA n'a donné aucun résultat pour les souches de *L. monocytogenes*. Pourtant, la validation des témoins positifs et négatifs d'amplification montrent qu'il n y'a pas eu d'erreur de manipulation. La méthode PCRq-PMA atteint donc sa limite de quantification pour les souches de *L. monocytogenes*.

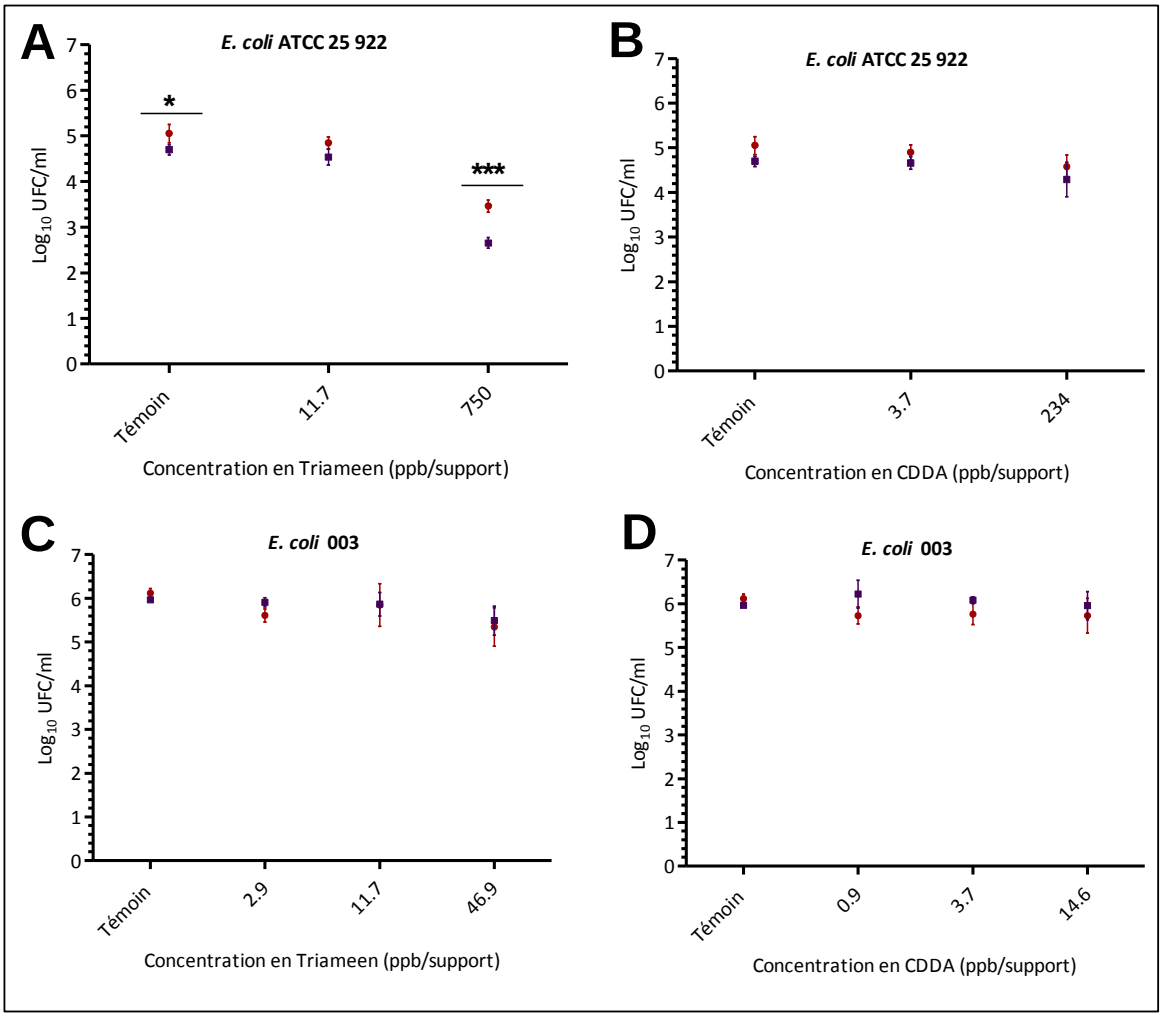



Figure 6 : **Comparaison du nombre de cellules viables totales (VT) (rouge) et des viables cultivables (VC) (violet) pour les souches E. coli ATCC 25 922 (A, B) et 003 (C, D) sur les supports conditionnés avec différentes concentrations en Triameen ou en CDDA ainsi que sur les supports témoins**. Résultats exprimés en $\log_{10}$ UFC/support en fonction de la concentration en produit en ppb/support. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs $\log_{10}$ UFC/support des essais réalisés en triplicat. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types. Les étoiles (*) correspondent aux valeurs significativement différentes.

# *IV* – Discussion

## 1. Choix des gammes de concentrations en produits désinfectants

Lors de cette étude, parmi les concentrations testées en Triameen et CDDA, quelques-unes conduisent à une diminution (< 1 $\log_{10}$ UFC/support) des formes VC chez les souches de référence *E. coli* ATCC 25 922 et *L. monocytogenes* ScottA, alors que ces mêmes concentrations n'ont aucun impact sur les autres souches de la même espèce (respectivement *E. coli* 003 et *L. monocytogenes* 008) (**Fig1** et **2**). Pourtant, les résultats de la détermination du « seuil de détection » avaient révélé que les souches de référence étaient plus tolérantes au Triameen et CDDA par rapport aux autres souches (**Tab 1**). Ces différentes réponses aux conditions de colonisation peuvent s'expliquer par les propriétés intrinsèques de chacune des souches, en particulier leur capacité de multiplication. Cela est par ailleurs très probable, puisque la comparaison de la colonisation des supports par les différentes souches a mis en évidence une plus faible (d'environ 0,7 $\log_{10}$ UFC/support en moins) colonisation pour les souches de référence par rapport aux autres souches (**Fig3**). La capacité de multiplication des souches semble donc déterminer leur taux de colonisation des supports conditionnés avec les produits désinfectants, bien plus que les résultats du « seuil de détection ». Cela est d'autant plus justifié que pour la même tolérance envers les produits Triameen et CDDA, la souche *E. coli* 003 présente une colonisation plus importante sur les supports par rapport à la souche *L. monocytogenes* ScottA.

Un autre paramètre pourrait expliquer le fait que les souches de référence aient des tolérances plus élevées aux produits désinfectants mais que dans les conditions de colonisation elles présentent une plus faible multiplication que les autres souches de la même espèce, celui de leur provenance. En effet, contrairement aux souches de référence, les souches *E. coli* 003 et *L. monocytogenes* 008 ont directement été isolées dans les industries laitières. Ces dernières ont donc été exposées de façon plus ou moins répétées aux produits désinfectants utilisés dans ces industries. C'est pourquoi, elles seraient capables de s'adapter plus rapidement aux conditions défavorables et ainsi maintenir leur capacité de multiplication.

La différence phénotypique entre *E. coli* et *L. monocytogenes*, notamment en ce qui concerne la coloration de Gram (négative pour *E. coli* et positive pour *L. monocytogenes*) ne semble pas avoir un impact ni sur la détermination du « seuil de détection » ni sur la capacité de multiplication en présence ou non de produits désinfectants.

A partir de nos résultats, il est pertinent de se demander si la méthode de « seuil de détection » est le bon outil pour trouver les concentrations sub-létales en produits désinfectants. Dans la littérature, ces concentrations ont été déterminées par la méthode de CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) (Ortiz *et al.,* 2014 ; Machado *et al.,* 2011 ; Capita *et al.,* 2014) mais les essais de colonisation en présence de produits désinfectants ont été réalisés en milieu liquide dans des micro-plaques. Dans notre étude, la

réalisation de la CMI en milieu liquide n'est pas adaptée car les essais de colonisation sont réalisés sur des surfaces inertes, où le contact bactéries-produits désinfectants est différent. Le problème susceptible d'être rencontré avec la méthode du « seuil de détection » est la répartition homogène ou non des résidus des produits désinfectants sur le support. Un résidu peut être autant la substance active que le produit issu de sa dégradation, sa transformation et sa réaction. La méthode du « seuil de détection » implique un contact direct entre une gélose ensemencée et les supports conditionnés avec les résidus de produits désinfectants, la substance active peut donc diffuser au sein de la gélose. Par contre pour les essais de colonisation, la multiplication bactérienne et/ou le développement d'un biofilm peut s'effectuer au contact de résidus de produits désinfectants sans pour autant qu'il s'agisse de la substance active en elle-même. La meilleure démarche serait donc de réaliser des études préliminaires de détermination du « seuil de détection » afin de cibler des gammes de concentrations, puis de les confirmer/ajuster par des essais de colonisation.

## 2. Bactéries Viables Cultivables (VC)

La problématique de cette étude est née de la volonté de déterminer si les résidus des produits désinfectants Triameen et CDDA peuvent avoir un impact, en l'occurrence une augmentation, sur la colonisation de certaines souches bactériennes sur des supports inertes en inox conformément à ce qui a été observé dans certaines études pour d'autres produits (Syed *et al.,* 2014 ; Machado *et al.,* 2011). Or, les résultats obtenus dans notre étude ne tendent pas vers de telles conclusions puisque aucune différence de colonisation n'est observée dans le sens d'une augmentation pour les supports conditionnés avec ces produits désinfectants pour les souches testées. Cependant, rien ne présageait à l'avance les résultats qui pouvaient être obtenus puisqu' aucune donnée dans la littérature ne regroupe les conditions établies dans cette étude. Bien que la problématique de départ ait été inspirée de l'hypothèse d'une augmentation de la colonisation, le phénomène inverse a déjà été observé. Notamment, le conditionnement de cathéters avec du chlorure de Benzalkonium (BAC) diminue la colonisation de certaines bactéries (Tabbes *et al.,* 1993) ou celui de supports en polystyrène par des concentrations sublétales de Trisodium Phosphate aboutit à la même conclusion concernant la souche *E. coli* ATCC 12 806 (Capita *et al.,* 2014).

Comme rapporté dans la bibliographie, les modifications de la colonisation des bactéries sont principalement corrélées aux changements des propriétés physico-chimiques des surfaces bactéries/supports. Ainsi, le conditionnement des supports en inox par du lait entraine une augmentation de leur hydrophobicité (Hamadi *et al.,* 2014). Par ailleurs, une étude a montré que la croissance de *L. monocytogenes* ScottA à 20°C dans un milieu de culture équivalent au GTS augmente l'hydrophobicité de sa surface (Briantet *et al.,* 1999). La surface bactérienne et du support étant hydrophobe, il pourrait y avoir un effet de répulsion, ce qui pourrait expliquer l'absence d'augmentation de la colonisation par

cette souche. De telles données ne sont pas rapportés pour les autres souches testées, il est donc difficile de généraliser ces conclusions. Il est néanmoins possible de vérifier cette hypothèse en réalisant des essais de colonisation sur des surfaces non conditionnées avec du lait. En effet, les surfaces en inox dépourvues de matières interférentes étant hydrophiles (Hamadi *et al.,* 2014), il serait possible d'observer l'impact sur la colonisation de la souche *L. monocytogenes* ScottA dont la surface est hydrophobe dans les conditions de cultures choisies (milieu et température de culture).

## 3. Bactéries Viables Totales (VT)

Si les courbes standards de quantification des formes VT par la PCRq-PMA présentent une bonne linéarité, efficacité et spécificité, elles montrent néanmoins que la sensibilité reste à améliorer. La détection du gène *16S rRNA* chez *E. coli* nécessite au moins 5 copies /mix réactionnel, ce qui équivaut à 3 $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries. En ce qui concerne *L. monocytogenes*, il faudrait plus de 500 copies du gène *hlyA* soit plus de 5 $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries au minimum. Sachant qu'après colonisation des souches de *L. monocytogenes*, il y a entre 5 et 6 $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries, il est normal de ne pas détecter de formes VT. Pour améliorer la sensibilité de la méthode, il faudrait augmenter le volume de la suspension à partir duquel sont réalisées les extractions d'ADN.

Les résultats des essais de validation de la méthode de PCRq-PMA ont permis de montrer qu'il y avait une variation du nombre de Ct entre les suspensions qui ne contenaient que des bactéries vivantes par rapport à celles n'en contenant que des mortes. Cependant les différences de Ct ne sont pas suffisamment élevées dans les essais réalisés avec différentes proportions de bactéries vivantes et mortes. Théoriquement pour un 1 $\log_{10}$ UFC/ml de bactéries mortes, l'augmentation du nombre de Ct doit être de l'ordre de 3,3. Donc les essais avec une suspension ne contenant que des bactéries mortes aurait dû donner un nombre de Ct élevé voir négatif après traitement au PMA, ce qui n'a pas été le cas. De la même façon, une variation plus importante du nombre de Ct aurait dû être obtenue dans les mélanges de bactéries vivantes et mortes, or les delta(Ct) sont équivalents. Ces résultats pourraient être expliqués par une concentration insuffisante en PMA. Bien que Pan et son équipe (2007) prétendent qu'il est inutile d'utiliser davantage que 50 µM de PMA, d'autres études rapportent l'utilisation d'une concentration plus élevée (Firmesse *et al.,* 2012 ; Yang *et al.,* 2011 ; Marouani-Gadri *et al.,* 2010).

Malgré une optimisation encore nécessaire pour la méthode PCRq-PMA, des formes VNC ont quand même été détectées chez *E. coli* ATCC 25 922 pour une concentration de 750 ppb/support de Triameen (0.8 $\log_{10}$ UFC/support). Ce résultat conforte l'idée que des formes VNC sont bien favorisées par la présence de produits désinfectants. Cependant, leur quantification et les conclusions à tirer quant à leur présence éventuelle pour les autres souches ne peuvent être réellement avancées sans une amélioration préalable de la méthode.

## 4. Contraintes techniques rencontrées lors de cette étude

Il est difficile d'estimer l'impact des contraintes techniques sur les résultats obtenus, ils sont donc à interpréter dans les limites techniques rencontrés. Par exemple, la dilution du lait au 1/100$^{ème}$ a été primordiale afin de prévenir d'éventuels précipités pouvant se former suite au mélange avec les solutions mères trop concentrées en produits désinfectants. La reproduction des conditions retrouvées en industries laitières n'a donc pas été tout à fait conforme concernant la charge des supports en matière interférente. De plus, la qualité des supports en inox fournis n'a pas été idéale : certains présentaient des traces de rouilles. C'est après plusieurs essais qu'il a été supposé que la rouille pouvait avoir un impact sur la viabilité et/ou multiplication des bactéries. Voulant confirmer cette hypothèse, une attention particulière a été donnée aux résultats de dénombrement obtenus sur les supports rouillés. Ainsi, il a été constaté qu'au sein d'un essai en triplicat, les supports rouillés avaient donné un plus faible dénombrement. Un autre problème a été rencontré, la contamination des supports par un faible volume de suspension bactérienne (10 µl) entrainait un dessèchement rapide ce celle-ci. C'est pourquoi, l'étalement a été jugé comme étant une étape critique qui devait être réalisée rapidement et en dehors du PSM afin de prévenir le séchage de la suspension ; qui provoquait une diminution du titre bactérien. De plus, lors de cet étalement, il fallait faire attention à ne pas « gratter » le film conditionnant afin de ne pas remettre en suspension les produits désinfectants et le lait. En effet, les bactéries sont susceptibles de ne pas avoir le même comportement lorsque le produits désinfectants et la matière interférente se trouvent sous forme liquide, par rapport à lorsqu'elles sont fixées sur un support inerte.

# *V* - Conclusion et perspectives

Le principal enjeu de ce stage était la détermination de l'impact des résidus de Triameen et de CDDA sur la colonisation d' *E. coli* et de *L. monocytogenes* sur des supports en inox. Les résultats de cette étude, ont montré une diminution de la colonisation des formes VC pour certaines concentrations de ces produits. Cette diminution pourrait être due (a) au conditionnement des supports par des concentrations supérieures aux concentrations sub-létales ; ou bien (b) au changement phénotypique des bactéries stressées qui passent à l'état VNC. Cette seconde hypothèse a été en partie vérifiée puisque des formes VNC ont été détectées pour une concentration en Triameen résultant en une diminution des formes VC chez *E. coli* ATCC 25 922. Pour aucune autre souche et/ou conditions, des formes VNC ont été mises en évidence. Cependant, ces résultats sont à prendre avec les limites de techniques utilisées. En effet, la méthode PCRq-PMA mise en place au laboratoire manque de sensibilité : le nombre de bactéries VT en particulier pour *L. monocytogenes* n'est pas assez important pour atteindre la limite de positivité de la PCRq. L'autre facteur important pouvant jouer sur les formes VT est la concentration en PMA, le traitement d'une suspension d'environ 500 µL avec 50 µM de PMA pourrait être insuffisant. La quantification des formes VT par la PCRq-PMA doit être optimisée.

La comparaison inter-souches de la capacité de multiplication, dans les mêmes conditions expérimentales que les essais de colonisation, a montré que les souches isolées d'industries alimentaires possèdent une meilleure capacité de multiplication. Ces dernières pourraient s'adapter rapidement aux produits désinfectants auxquels elles sont exposées. Par ailleurs, une étude comparative sur l'impact de la présence de BAC sur des surfaces en polystyrène pour des souches de *P. aeruginosa* adaptés ou non à des concentrations croissantes de BAC, a montré que la colonisation bactérienne était plus élevée pour les souches adaptées (Machado et al., 2011). Ces résultats nous laissent penser que si les souches testées étaient préalablement adaptées au Triameen et au CDDA, des résultats différents pourraient être obtenus. Par ailleurs, ces expériences permettraient de se rapprocher davantage des conditions de terrain.

# Références Bibliographiques

## Publications


Briandet,R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, MH. 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. Appl Environ Microbiol. 65(12): 5328–5333

Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M.L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., Thorel, M.F. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Revue Scientifique et Technique de l'OIE. Vol. 16, n° 2, p. 452-471

Capita,R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to Sublethal Concentrations of Food-Grade BiocidesInfluencesIts Ability To Form Biofilm, Resistance to Antimicrobials, and Ultrastructure. Appl Environ Microbiol. 80(4): 1268–1280

Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Review –Persistence of LM in food industry equipement and premises. Inter J food Micro. 145(1),1-8

Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. (2011) Tests for Determining in-Use Concentrations of Antibiotics and Disinfectants Are Based on Entirely Different Concepts : 'Resistance' Has Different Meanings. Int J Food Microbiol. 136 : 247–254

Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja C. (2012) Influence of Serotype on the Growth Kinetics and the Ability to Form Biofilms of *Salmonella* Isolates from Poultry. Food Microbiol. 31, no. 2 : 173–80

Firmesse, O., Morelli, E., Vann, S., Carpentier, B. (2012) Monitoring of Bacterial Load in Terms of Culturable and Non-Culturable Cells on New Materials Placed in a Delicatessen Serve over Counter. Int J Food Microbiol. 159 : 179–185

Garrett, T., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008) Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. Prog Nat Sci. 18, no. 9 : 1049–56

Goulet, V., Leclercq, A., Vaillant, V., Le Monnier, A., Laurent, E., Thierry-Bled, F., Pihier, N., Valk, H. 2008. Recrudescence récente des cas de listériose en France. Institut de veille sanitaire (Invs).

Hamadi, F., Asserne, F., Elabed, S., Bensouda, S., Mabrouki, M., Latrache. H. (2014) Adhesion of *Staphylococcus Aureus* on Stainless Steel Treated with Three Types of Milk. Food Control 38 : 104–8

Hofsteenge, N., Nimwegen, E., Silander, O. 2013. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of E. coli. BMC Microbiology.

Khamisse, E., Firmesse, O., Christieans, S., Chassaing, D., Carpentier, B. (2012). Impact of Cleaning and Disinfection on the Non-Culturable and Culturable Bacterial Loads of Food-Contact Surfaces at a Beef Processing Plant. Int J Food Microbiol. 158 : 163–168

Latorre, A., Van Kessel, J., Karns, J., Zurakowski, M., Pradhan, A., Boor, K., Adolph, E., Sukhnanand, S., Schukken, Y. (2011) Increased In Vitro Adherence and On-Farm Persistence of Predominant and Persistent *Listeria Monocytogenes* Strains in the Milking System. Appl Environ Microbiol. 77, no. 11 : 3676–84

Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande Burgos, M.J., Abriouel, H., Pulido, R.P., Gálvez, A. (2013) Biocide Tolerance in Bacteria. Int J Food Microbiol. 162 : 13–25

Machado, I., Graça, J., Sousa, AM., Lopes, S., Pereira, MO. (2011) Effect of Antimicrobial Residues on Early Adhesion and Biofilm Formation by Wild-Type and Benzalkonium Chloride-Adapted *Pseudomonas Aeruginosa*. Biofouling. 27, no. 10 : 1151–59

Marouani-Gadri, N., Firmesse, O., Chassaing, D., Sandris-Nielsen, D., Arneborg, N., Carpentier, B. 2010. Potential of Escherichia coli O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. Int J Food Microbiol. 15;144(1):96-103

Meylheuc, T., Van Oss, C., Bellon-Fontain, MN. (2001) Bellon-Fontaine. Adsorption of Biosurfactant on Solid Surfaces and Consequences Regarding the Bioadhesion of *Listeria Monocytogenes LO28*. J Appl Microbiol. 91, 822-832

Oliver, J. 2009. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews. Vol3, Issue 4, p 415–425

Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. (2014) The Influence of Subminimal Inhibitory Concentrations of Benzalkonium Chloride on Biofilm Formation by *Listeria Monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 189 : 106–112

Otter, J., Vickery, K., Walker, J., deLancey Pulcini, E., Stoodley, P., Goldenberg, S.D., Salkeld, J.A.G., Chewins, J., Yezli, S., Edgeworth, J.D. (2015) Surface-Attached Cells, Biofilms and Biocide Susceptibility : Implications for Hospital Cleaning and Disinfection. J Hosp Infect. 89 : 16e27

Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L., Svabić-Vlahović, M. (2004) Biofilm Formation by *Salmonella Spp*. and *Listeria Monocytogenes* on Plastic Surface. Lett Appl Microbiol 38, no. 5 : 428–32

Syed, A., Ghosh, S., Love, N., Boles, B. (2014) Triclosan Promotes *Staphylococcus Aureus* Nasal Colonization. mBio. 5, no. 2 : e01015–13

Pan, Y., Breidt, F. 2007. Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. Appl Environ Microbiol. p. 8028–8031 Vol. 73, No. 24

Tebbs, S., Elliott, J. 1993. A novel antimicrobial central venous catheter impregnated with benzalkonium chloride. J Antimicrob Chemother. 31, 261-271

Yang, X., Badoni, M., Gill, C. 2001. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable Escherichia coli from E. coli killed by mild or pasteurizing heat treatments. Food Microbiology. 1478-1482

## Directives / Règlements / Normes

[1] Directive 98/8/CE. Février 1998. Mise sur le marché des produits biocides. 1998.Commission européenne

[2] Norme NF EN 1276 (Mars 2010) Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés dans les domaines de l'agroalimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité

[3] Norme NF EN 13697 (Novembre 2001) Antiseptiques et désinfectants chimiques. Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité

## Thèse

Allion, Audrey. 2004. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer *in situ* l'éfficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Thèse doctorale de l'école doctorale Agriculture, Biologie et Santé.

## Sites internet

EFSA - Technical Report : Evaluation of Monitoring Data on Residues of DDAC and BACs in Food. 2013. *http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/483e.htm*

[4] Site officiel de l'Anses : *https://www.anses.fr/fr/content/les-produits-biocides*