

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie microbienne.

Présenté par :

M'SILI Fatima zohra
DALI Soumia

Thème

Etude de la contamination des surfaces d'un abattoir de viande rouge par *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* et leur capacité à former des biofilms sur un support en plastique.

Soutenu le : 01 / 07/ 2018

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme. LEZZOUM Sara</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M. RAI Abdelwahab</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Nous remercions « ALLAH » le tout puissant qui nous a donné la volonté et la patience pour mener à bien ce modeste travail.

Nous remercions nos chers parents pour tous les sacrifices qu'ils ont faits et la souffrance qu'ils ont endurée afin de nous permettre de réaliser nos études.

Nous tenons aussi à remercier notre promotrice Mme LEZZOUM ATEK S. pour son encadrement et son soutien dans notre travail, ses conseils et ses encouragements, ainsi que toute l'aide précieuse apportée à notre égard.

Nous remercions les membres du jury Mr KADRI N. et Mr RAI AB. Pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions tous les enseignants qui nous ont orientés pendant tout notre parcours ainsi que tous les membres du département de Biologie.

Nos remerciements s'adressent particulièrement à Mr Sirine Nabil qui nous a permis la réalisation d'une partie de notre travail à l'abattoir de

Ain bessem, merci pour vos conseils et vos orientations.

Merci, à tous ceux qui nous ont aidés à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A mes très chers parents : Foudil et Farida pour leurs encouragements et leurs prières, sincèrement aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

A mes chers sœurs : Souhila, Yasmina et Kamilia.

A mes frères à qui je souhaite beaucoup de bonheur et réussite dans leur vie.

A tous mes neveux,

A tous mes cousins et mes cousines.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mon binôme Fatima zohra et sa famille.

A mes chères amies et à tous mes camarades de promotion.

SOUUMIA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A mes très chers parents : Foudil et Farida pour leurs encouragements et leurs prières. Sincèrement, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

A mes chers sœurs : Souhila, Yasmina, Kamilia

A mes frères à qui je souhaite beaucoup de bonheur de réussite dans leur vie.

A tous les enfants de neveu

A tous mes cousins et mes cousines

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mon binôme Fatima zohra et sa famille.

A ma chère promotrice pour leurs soutiens et leurs encouragements.

A mes chères amies et à tous mes camarades de la promotion.

A vous aussi

SOUMIA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A mes très chers parents : Rabah et Om el Khair pour leurs encouragements et leurs prières. Sincèrement, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

A mon marri Sirine Nabil et sa famille

A mes chers sœurs : Mariem, Amina, Hadjer, Hafsa

A mes frères à qui je souhaite beaucoup de bonheur de réussite dans leur vie.

A tous les enfants de neveux,

A mes cousines surtout Asma, Chaima, Soumia

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mon binôme Soumia et sa famille.

A ma chère promotrice pour son soutien et son encouragements.

A mes chères amies Tounes, Amina, Fatima et à tous mes camarades de la promotion.

A vous aussi

FATIMA ZOHRRA

Liste des abréviations

A : surface écouvillonnée en cm²

AFNOR : Association française de normalisation

Ag H : Antigène flagellaires

Ag O : Antigène osomatique

Ag K : Antigène capsulaire

ALOA : Agar pour *Listeria* selon Ottaviani et Agosti

CS : Citrate de Simmons

DO : densité optique

ESC : Esculine

E. coli : *Escherichia coli*

F : le volume en millilitre de la dilution mère

GLU : Glucose

ISO : Organisation internationale de normalisation

L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*

L. innocua : *Listeria innocua*

LPS : Lipopolysaccharides

LAC : Lactose

LDC : Lysine décarboxylase

McF : McFarland

N : Somme des colonies comptées sur la boîte retenues

ODC : Ornithine décarboxylase

PGA : Poly-β-1,6-N-Acétyl-Glucosamine

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

TSA: Tryptone soya agar

TSB: Tryptone soya broth

TDA : Tryptophane désaminase

UFC : Unités formant colonie

Un antigène ECA : *Enterobacterial* Common Antigen/antigène de Kunin

URE : Uréase

VP : Voges Proskauer.

Liste des figures

Figure 01: Schéma représentant les étapes du développement du biofilm	05
Figure 02 : <i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique	13
Figure 03 : Les voies de contamination par l' <i>Escherichia coli</i>	17
Figure 04 : Caractères morphologiques de <i>Listeria monocytogenes</i> (coloration Gram)	21
Figure 05: Organigramme de l'isolement, identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i>	38
Figure 06 : Organigramme de l'isolement, identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. innocua</i>	39
Figure 07 : Aspect des colonies de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria innocua</i> et sur le milieu ALOA.....	40
Figure 08 : Aspect des colonies d' <i>E. coli</i> sur le milieu CHROMID.....	42
Figure 09 : Aspect des colonies sur gélose TSA.....	44
Figure 10 : Tube TSB après incubation (apparition de trouble).....	44
Figure 11: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. innocua</i> (solution à 1McF)	46
Figure 12 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> (solution à 1McF)	47
Figure 13 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i> (solution à 1McF)	48
Figure 14: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. innocua</i> (solution à 4McF)	49
Figure 15 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> (solution à 4 McF)	50
Figure 16: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli</i> (solution à 4McF)	51
Figure 17: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L.m</i> (solution à 1McF)	52

Liste des figures

Figure 18: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de <i>L.m+E. coli</i> (solution à 1McF)	53
Figure 19: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli+L.i</i> (solution à 1McF).....	54
Figure 20 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli+L.i+L.m</i> (solution à 1McF).....	55
Figure 21: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm <i>L.m+L.i</i> (solution à 1McF).....	56
Figure 22: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli+L.i</i> (solution à 4McF).....	57
Figure 23: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d' <i>E. coli+L.m</i> (solution à 4McF).....	58

Liste des tableaux

Tableau 01 : La classification d' <i>Escherichia coli</i>	12
Tableau 02 : Les caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i>	13
Tableau 03 : les dix-huit espèces de <i>Listeria</i> recensées en 2015	21
Tableau 04 : Caractères biochimiques différenciant les espèces de <i>Listeria</i>	23
Tableau 05 : Testes biochimiques réalisés en utilisant une galerie API <i>Listeria</i>	23
Tableau 06 : Capacité de production de l'unité d'abattage.....	30
Tableau 07 : Répartition des échantillons selon la nature de la surface prélevée.....	32
Tableau 08 : Estimation de la formation des biofilm.....	35
Tableau 09 : Souches et associations de souches préparées à 1 et à 4 McF.....	36
Tableau 10 : Nombre des <i>Listeria monocytogenes</i> isolés par cm ² ou par écouvillon.....	40
Tableau 11 : Le nombre des <i>Listeria innocua</i> isolés par cm ² ou par écouvillon.....	41
Tableau 12 : Nombre d' <i>E. coli</i> isolés par cm ² ou par écouvillon	42

Sommaire

Introduction	01
I. Les Biofilms	03
I.1. Définition	03
I.2. Les étapes de formation de Biofilm	03
I.2.1. Film de conditionnement	03
I.2.2. L'adhérence réversible	03
I.2.3. L'adhérence irréversible	04
I.2.4. Le développement précoce du biofilm	04
I.2.5. La maturation du biofilm	04
I.2.6. Le détachement du biofilm	04
I.3. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	05
I.3.1. Caractéristiques de la surface	05
I.3.2. Caractéristiques du milieu	06
I.3.3. Propriétés des cellules	08
II. Méthodes d'étude <i>in vitro</i> des biofilms	08
II.1. Mesure de la biomasse	09
II.1.1. Crystal Violet	09
II.1.2. Syto9	09
II.2. Mesure de la viabilité cellulaire	09
II.2.1. XTT (sel de tétrazolium)	10
II.2.2. Résazurine	10
II.3. Mesure de la matrice : le 1,9-bleu de méthylène de diméthyle	10
III. L'espèce <i>Escherichia coli</i> et la formation des biofilms	11
III.1. Historique	11
III.2. Définition	11
III.3. Classification	11
III.4. Habitat et Stratégie de l'infection	12
III.5. Caractères bactériologiques	12
III.6. Pouvoir pathogène	14

Sommaire

III.6.1. Mode de transmission.....	15
III.7. Déterminants de la formation de biofilm chez <i>E. coli</i>	17
IV. Le genre <i>Listeria</i> et la formation des biofilms	19
IV.1. Historique.....	19
IV.2. Caractéristiques	19
IV.3. Taxonomie	20
IV.4. Caractéristiques morphologiques	21
IV.5. Caractéristiques biochimiques	22
IV.6. Caractères cultureux.....	23
IV.7. Caractéristiques antigéniques.....	24
IV.8. Structure génomique de <i>Listeria innocua</i>	24
IV.9. Pouvoir pathogène.....	24
IV.9.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	24
IV.9.2. <i>Listeria innocua</i>	25
IV.10. La formation de biofilm chez <i>Listeria</i>	26
IV.11. Les Déterminants de la formation de biofilm chez <i>L. monocytogenes</i>	27
V. La contamination des surfaces par les bactéries	28
V.1. Intérêt des opérations de nettoyage de désinfection.....	28
PARTIE EXPERIMENTALE	
1. Matériels et méthodes	30
1.1. Echantillonnage	30
1.1.1. Matériel	33
1.2.. Méthodes	33
1.2.1. Isolement, identification et dénombrement	33
1.2.2. Méthodes pour la réalisation des tests d'adhésion et formation de biofilm	35
1.2.3. Analyse statistique	37
Résultats et discussion	40
1. Isolement et dénombrement des <i>Listeria</i>	40
2. Isolement et dénombrement d' <i>E. coli</i>	42

Sommaire

3. Interprétation des résultats de l'évaluation de la contamination des surfaces.....	43
4. Repiquage sur TSA et enrichissement sur TSB	43
5. Résultats des tests d'adhésion et formation de biofilms.....	45
5.1. Biofilm mono espèce : Solution à 1 McFarland.....	45
5.2. Biofilm mono espèce : Solution à 4 McFarland.....	48
5.3. Biofilm multi espèces : solutions à 1 McFarland.....	51
5.4. Les associations d'espèces : solution à 4 McFarland.....	56
CONCLUSION	59

Références bibliographiques

ANNEXE

RESUME.

Introduction

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolée dans le milieu externe (état planctonique).

Un biofilm est une communauté de différents micro-organismes aérobies ou anaérobies (bactéries, champignons, algues, protozoaires, etc.) 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, dans un milieu où l'humidité est au-dessus du point de saturation ou bien dans un milieu aquatique (**Jain et al., 2011**).

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 du revêtement. La plupart de ces germes sont pathogènes et peuvent causer diverses maladies. Parmi ces pathogènes ; nous citons : *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*. La rugosité et la topographie de la surface jouent également un rôle important sur le nombre de bactéries adhérentes (**Belco L et al., 2017**).

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. Les surfaces peuvent favoriser la persistance de flores microbiennes indésirables, en particulier de flores résistantes à l'action d'agents antimicrobiens. Elles peuvent également se comporter comme émetteurs de micro-organismes.

Parmi ces différentes bactéries, nous allons nous intéresser particulièrement à trois espèces bactériennes : *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua*.

Notre choix c'est portée sur ces espèces là car :

Escherichia coli étant considérée comme un hôte normal de la microflore digestive de l'homme et de nombreuses espèces, elle fait partie des coliformes thermo-tolérants dont la

Introduction

présence dans les aliments indique une contamination fécale et une éventuelle contamination par des bactéries pathogènes (**Minor et al., 1954**).

L. monocytogenes est la seule espèce de ce genre qui est 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 soit les caractères de pathogénicité de cette dernière, rendant ainsi les manipulations au laboratoire sans risque (**Anses, 2011**).

Les objectifs de ce travail sont répartis en deux parties :

- La première consiste à l'évaluation de la contamination des surfaces d'un abattoir de viande rouge par les bactéries *E. coli*, *L. monocytogenes* et *L. innocua*.
- La deuxième consiste à l'étude de la capacité de ces bactéries à adhérer et former des biofilms sur un support en plastique (cuves) en variant plusieurs paramètres : l'aérobiose et la microaérophilie, la charge bactérienne et les espèces bactériennes formant le biofilm.

I. Les Biofilms

I.1. Définition :

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésive et protectrice qu'ils secrètent (**Jain et al., 2011**). C'est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif (**Boutaleb, 2007**).

Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (**Behlau et Gilmore, 2008**). On distingue généralement six étapes de formation des biofilms.

I.2. Les étapes de formation de Biofilm :

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (**Vu et al., 2009**).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques et/ ou sur les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Talero, 2008**).

I.2.1. Film de conditionnement :

En premier lieu, un film de conditionnement, est produit pendant l'immersion dans un liquide. Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques ou organiques ou des composés biologiques de l'environnement. La nature du film de conditionnement sera affectée par la nature de la surface et la source du film de conditionnement (**Zottola et Sasahara, 1994**).

Le rôle du film primaire n'est pas clairement élucidé, il modifierait les propriétés physicochimiques de surface, influençant ainsi l'adhésion bactérienne.

I.2.2. L'adhérence réversible :

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles) (**Høiby et al., 2011**). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide.

L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin *et al.*, 2008**).

I.2.3. L'adhérence irréversible :

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes (**Høiby, 2011**). Par exemple, les fimbriae et les curli pour *E. coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloin *et al.*, 2008**).

I.2.4. Le développement précoce du biofilm :

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides.

Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (**Jacobsen *et al.*, 2008**).

I.2.5. La maturation du biofilm :

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (**Folkesson *et al.*, 2008**), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke *et al.*, 2006**).

La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présent dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacobsen *et al.*, 2008**).

I.2.6. Le détachement du biofilm :

Les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique.

Traditionnellement, le détachement des bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve.

Cependant, le détachement des bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités.

Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués. Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est

un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries.

Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller colonisée d'autres surfaces (Joshi *et al.*, 2010). (Figure 01).

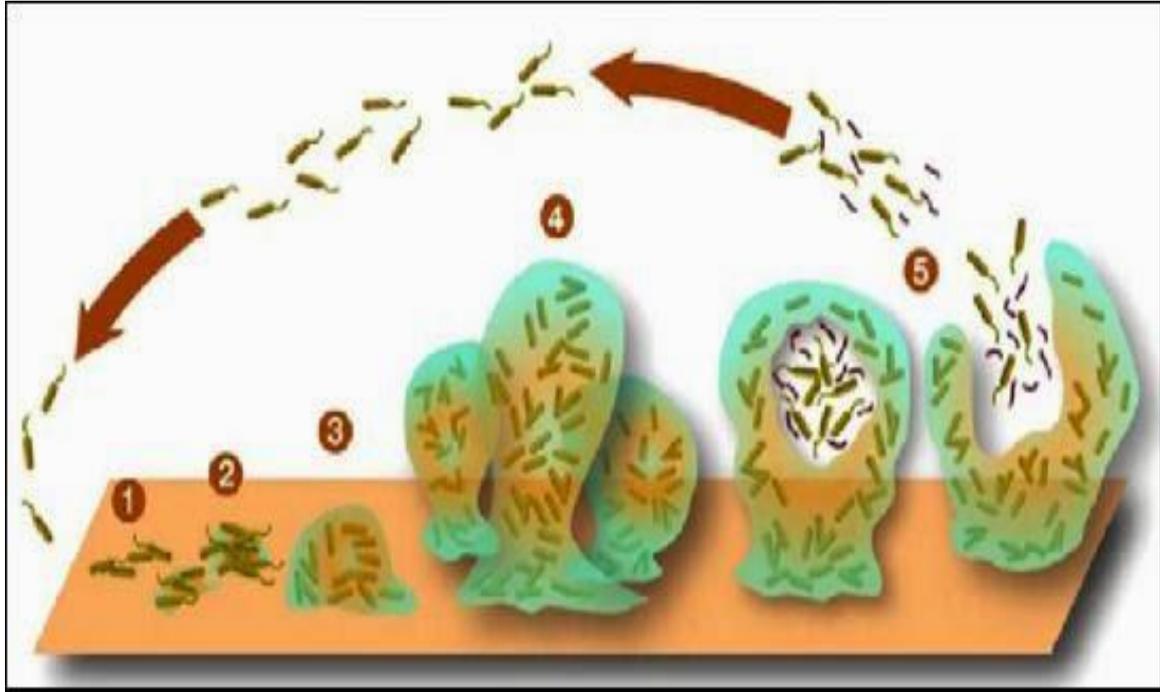


Figure 01: Schéma représentant les étapes du développement du biofilm (Yannick *et al.*, 2014).

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

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (Donlan, 2002).

I.3.1. Caractéristiques de la surface :

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (De Chalvet et De Rochemonteix, 2009).

a. Rugosité de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**).

Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (**Donlan et Costerton, 2002**).

b. Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. 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:

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms.

I.3.2 Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (**O'Toole et al., 2000; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008**):

a. Température :

Est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**).

b. pH :

Du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (**Hamadi et al., 2004**). Ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Boutaleb, 2007**).

c. Concentration en oxygène :

Elle peut intervenir dans l'ampleur de la formation du biofilm en agissant soit en faveur du développement bactérien ou l'inverse.

d. Concentration en fer et osmolarité :

Présence d'ions spécifiques influence la formation des biofilms.

e. Sources de carbone disponibles :

Elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez, 2007**).

f. Concentrations en nutriments :

Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

g. Concentrations en certains cations :

L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (**Fletcher, 1988**).

h. Hydrodynamique du fluide :

Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation.

C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

I.3.3. Propriétés des cellules :

La présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface.

L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière, moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (**Donlan, 2002**).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes.

Les Exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

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

Les problèmes provoqués par les biofilms sont maintenant clairement définis. Pour prévenir et lutter contre ces biofilms, une meilleure compréhension de leurs mécanismes de formation est nécessaire. De nombreuses méthodes d'étude de la formation et du développement des biofilms ont été utilisées au cours des dernières années : des méthodes d'observation par microscopie (microscope à fluorescence, microscope confocal à balayage laser, microscope électronique à balayage) ou des méthodes de numération des bactéries après détachement des biofilms par sonication, frottement ou vortex des surfaces. Ces techniques permettent d'obtenir des informations détaillées mais sont difficiles et longues à réaliser. C'est pourquoi des modèles d'étude *in vitro* en microplaques ont été développés. Ces tests ont l'avantage d'être relativement rapides et peu coûteux. Ils permettent de réaliser de nombreux tests simultanément, notamment pour tester l'effet de plusieurs facteurs influençant la formation de biofilm, comparer la capacité de formation de biofilm de souches sauvages et de souches mutantes, ou encore tester la sensibilité des bactéries au sein du biofilm aux agents antimicrobiens (**Peeters et al., 2008**).

II.1. Mesure de la biomasse

II.1.1. Crystal Violet

La méthode de quantification de la formation de biofilm utilisant le Crystal Violet (CV) a été décrite la première fois par Christensen *et al.*, en (1985), puis modifiée pour augmenter sa précision et permettre la quantification de la biomasse totale par resolubilisation du colorant. Le CV est un colorant basique qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. Les bactéries vivantes, les bactéries mortes et la matrice exopolysaccharidique sont donc colorées par le CV. Cependant, de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques peuvent influencer cette fixation.

Chaque puits de la microplaque est inoculé avec une suspension bactérienne. Après incubation de la microplaque, des étapes de lavage, de mise en contact avec le CV, de nouvelles étapes de lavage et de redissolution du colorant sont nécessaires pour mettre en évidence la formation des biofilm par une coloration violette. La densité optique, mesurée par spectrophotométrie à 560 nm dans un lecteur de microplaque, est proportionnelle à la quantité de biomasse dans le puits de la microplaque (**Extremina *et al.*, 2011**).

II.1.2. Syto9

Le Syto9 est un colorant vert fluorescent qui diffuse passivement à travers les membranes cellulaires et se lie à l'ADN présent à la fois chez les bactéries vivantes et chez les bactéries mortes, ainsi qu'à la matrice extracellulaire. Il permet une quantification de la biomasse du biofilm (**Peeters *et al.*, 2008**).

Le Syto9 a été utilisé pour la détection et la numération des bactéries au microscope confocal à balayage laser (CLSM) et pour les tests de quantification des biomasses des biofilms bactériens et fongiques (**Honraet *et al.*, 2005**).

II.2. Mesure de la viabilité cellulaire

Il peut être intéressant de différencier les bactéries vivantes des bactéries mortes, notamment lorsque l'on teste l'effet d'agents antimicrobiens sur les bactéries au sein du biofilm. Des techniques de quantification basées sur l'activité métabolique des bactéries vivantes ont été développées.

II.2.1. XTT (sel de tétrazolium)

Le XTT est un composé jaune pouvant être réduit par les bactéries métaboliquement actives en formasan, un colorant orange. Le formasan est soluble dans l'eau et peut être directement quantifié par spectrophotométrie.

Le test au XTT a été largement utilisé pour la quantification de cellules viables dans les cultures de bactéries planctoniques. Il a aussi été développé pour l'étude de la formation de biofilm chez des souches de *Candida* sp, et a montré son intérêt dans l'étude de la formation de biofilm chez d'autres espèces fongiques et bactériennes (**Jin et al., 2004; Peeters et al., 2008**).

Certaines limites à l'utilisation de ce réactif ont été décrites. Par exemple, la modification des états métaboliques des bactéries au cours des différentes étapes de formation des biofilms peuvent entraîner des fluctuations dans leurs capacités à métaboliser le colorant. De plus, des variabilités inter et intra-espèces ont été reportées (**Honraet et al., 2005**).

II.2.2. Résazurine

La résazurine est un colorant non toxique de couleur bleue qui peut être réduit par les bactéries métaboliquement actives en résorufine, un composé rose fluorescent. La quantité de résorufine, mesurée par fluorimétrie, est directement proportionnelle au nombre de bactéries viables présentes dans le milieu.

La résazurine a souvent été employée pour l'évaluation de la viabilité des bactéries planctoniques. Plus récemment, elle a été utilisée avec succès pour la quantification de la formation de biofilm en microplaque et pour évaluer l'efficacité d'agents antimicrobiens dans la lutte contre les biofilms chez différentes souches bactériennes et fongiques (**Jiang et al., 2011; Peeters et al., 2008; Pettit et al., 2005; Punithavathy et al., 2012**).

II.3. Mesure de la matrice : le 1,9-bleu de méthylène de diméthyle

La matrice extracellulaire est un élément essentiel à la formation et au maintien d'un biofilm mature. Le DMMB forme un complexe insoluble en présence des polysaccharides sulfatés de la matrice du biofilm. Le taux de colorant libéré après ajout d'une solution de décomplexation est mesuré par un spectrophotomètre : la densité optique est proportionnelle au taux de polysaccharides sulfatés présents dans la matrice.

Le test au DMMB a été initialement développé pour la détection d'aminoglycanes, puis a été optimisé pour permettre la quantification des biofilms à *Staphylococcus aureus* (Tote *et al.*, 2008). Il a montré une bonne répétabilité pour différentes espèces bactériennes (Peeters *et al.*, 2008).

III. L'espèce *Escherichia coli* et la formation des biofilms

III.1. Historique

En 1885, Theodor Escherich (1857-1911) découvre un bacille qu'il dénomma *Bacterium coli* commun dans les selles de nourrissons (Leminor *et al.*, 1954).

Médecin allemand, il fit une partie de ses études de médecine à Strasbourg et élaborait sa thèse de doctorat en pédiatrie en 1881 à Munich à propos des bactéries intestinales des nourrissons et de leur rapport avec la physiologie de la digestion.

En 1904 : isolement de cette même bactérie dans un cas d'infection urinaire.

En 1919 : Castellani et Chalmers donne le nom d'*Escherichia coli* (*E. coli*) à cette bactérie (Buttiaux *et al.*, 1956).

III.2. Définition

Le genre *Escherichia* comprend plusieurs espèces, dont seul *E. coli* (colibacille) 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 (Avril *et al.*, 2000).

Elle représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie, où elle participe à la barrière intestinale en arrêtant la croissance des espèces bactériennes nuisibles. La colonisation du tube digestif commence dès les premières heures après la naissance et le rythme de division d'*E. coli* lui permet de garder pendant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la flore (une division toute les 20 min à 37°C et en conditions favorables). La présence de cette bactérie dans le sol, l'eau et /ou les aliments témoigne d'une contamination fécale et suggère la possibilité que d'autres bactéries ou virus d'origine digestive s'y trouvent. On considère que sa présence rend l'eau ou les aliments impropres à l'utilisation ou à la consommation (Avril *et al.*, 1987; CristianCarip *et al.*, 2008).

III.3. Classification

L'espèce *Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle a été caractérisée sur les plans phénotypique, biochimique et physiologique. Aujourd'hui, ce sont

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

des techniques basées sur l'utilisation de l'ADN qui permettent une étude génétique des populations et la caractérisation des différentes souches *d'Escherichia coli* (Stewart *et al.*, 2015).

Tableau 01 : La classification *d'Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012 :

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>

III.4. Habitat et Stratégie de l'infection

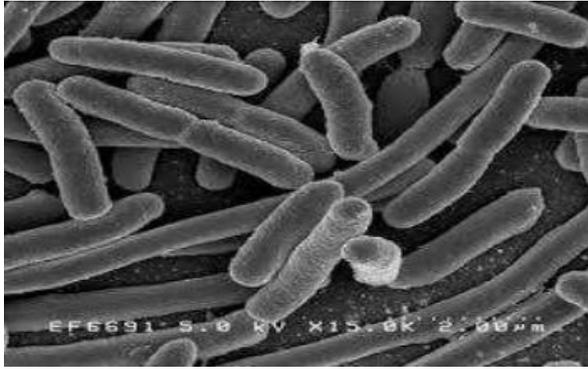
Les entérobactéries sont présentes dans de nombreux écosystèmes, elles peuvent être saprophytes, commensales et pathogènes. Le cas *d'Escherichia coli* est typique. Cette bactérie est retrouvée dans l'intestin et à titre d'exemple dans les eaux souvent en provenance d'une contamination fécale (Greatorex *et al.*, 2000). Cependant, bien que la majorité des souches *d'Escherichia coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Montet, 2009) ou extra-intestinales très diverses chez l'homme. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches *d'Escherichia coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont la colonisation de muqueuses, éventuellement l'invasion des cellules, la multiplication, l'évasion des défenses de l'hôte et les dommages à l'hôte (Bergey's, 2001). La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche, les modes d'infection et les signes cliniques de l'infection, constituent un moyen de typage *d'Escherichia coli* que l'on désigne sous le néologisme de pathotype ou pathovar (Levine, 1988).

III.5. Caractères bactériologiques

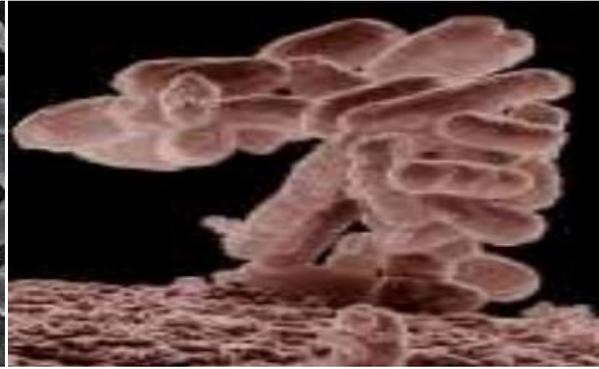
a. Caractères morphologiques et culturels

E. coli ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 µm de long sur 0.4 à 0.6 µm de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une

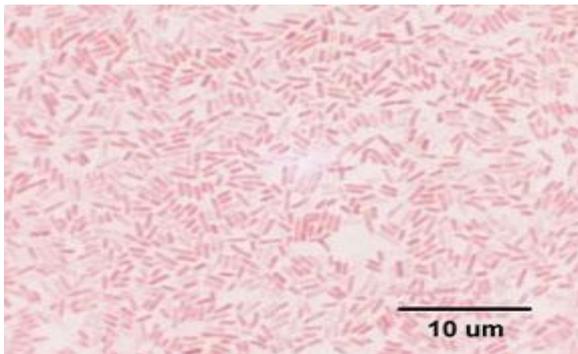
ciliature pérित्रиче. Elle se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques (Avril J.L et al., 2000).



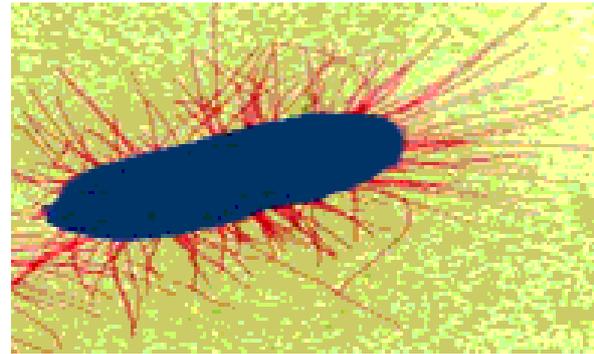
a-*Escherichia coli* Grossissement x 15000



b-*Escherichia coli* Grossissement x 1000



c-*Escherichia coli* (coloration Gram)



d-*Escherichia coli* (micrographe électronique)

Figure 02 : *Escherichia coli* sous microscope électronique (kaiser, 1998).

b. Caractères biochimiques

E. coli possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille (Avril et al., 2000 ; Fludrois, 2004). Les caractères biochimiques sont résumés dans le tableau 02.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 02 : Les caractères biochimiques *d'Escherichia coli*.

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

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 (ciliature péritriche) permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène K de surface n'est pas toujours présent mais s'il l'est, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O (**Sureillane, 1997**).

III.6. Pouvoir pathogène

Il existe différents pathotypes *d'Escherichia coli* responsables d'infections intestinales :

- **ETEC** : *Escherichia coli* entérotoxigènes, sont à l'origine d'épisodes de diarrhée aqueuse, modérée à sévère, peu fébriles, associés à des nausées et à des crampes abdominales. Dans les pays dits en voie de développement, les ETEC sont la cause majeure de cas de diarrhée aqueuse aiguë chez les enfants de moins de 5 ans et de « diarrhée du voyageur » ou « turista » (**Kaper et al., 2004 ; Nataro et al., 1998**). Les ETEC appartiennent aux sérotypes : O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159 et O173 (**Stenutz et al., 2006**).

- **EIEC** : *Escherichia coli* entéroinvasives, encore appelé *Escherichia coli Shigella-like*, sont responsables de syndrome dysentérique caractérisé par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus). Cependant, *Shigella* est une bactérie à localisation intra-cellulaire qui n'a ni flagelles ni des facteurs d'adhésion. Elle est fortement infectieuse et est responsable de la dysenterie bacillaire avec diarrhée sanglante (**Kaper et al., 2004**). Les souches d'EIEC appartiennent aux sérotypes : O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164 et O167 (**Stenutz et al., 2006**).

- **EHEC** : *Escherichia coli* entérohémorragiques, sont des bactéries pathogènes et zoonotiques qui se retrouvent dans l'eau et parfois dans les aliments. Elles sont responsables de diarrhée, de colite hémorragique et de syndrome urémique hémolytique chez l'homme mais

peu ou pas de maladie perceptible chez les animaux considérés comme des réservoirs. Le serotype 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. A ce jour plusieurs dizaines de sérotypes ont été reconnus et publiés (**Nataro et al., 1998**).

- **EPEC** : *Escherichia coli* entéro-pathogènes, responsables de gastroentérites infantiles. Ils sont responsables de diarrhées chez le nourrisson (<18 mois). Les sérogroupes des souches EPEC les plus fréquemment associées à la diarrhée chez l'homme sont O111, O128, O86, O55, O125, O127 et chez les bovins, le séro groupe O26 (**Mainil, 2000**).

III.6.1. Mode de transmission

a. Transmission alimentaire :

- Les produits carnés sont à l'origine d'un grand nombre d'infection à *Escherichia coli*. (**Vernozy-Rozand et al., 2005**). La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante (**Baranyi, Roberts, 1995**). La viande d'autres animaux de boucherie ou de volailles a également été mise en cause (**Paton, 2001**).

-Le lait et les produits laitiers non pasteurisés ont également été à l'origine d'épidémie.

La voie de contamination du lait actuellement retenue est celle de la contamination à partir des matières fécales de bovins lors de la traite. En effet, les conditions de traite l'environnement dans lequel elle se réalise jouent un rôle prépondérant dans la contamination du lait (**Allerberger, 2001**).

- Les fruits et légumes crus (salade, radis, épinards, oignons...) peuvent être directement contaminés par l'eau d'irrigation, à partir du sol contaminé suite à l'épandage d'effluents d'élevages ou via l'activité de la faune du sol (**Baranyi, Roberts, 1995**).

b. Transmission par le contact direct avec les animaux de ferme et leur environnement :

Le contact direct avec des animaux de ferme ou avec leurs déjections peut être à l'origine de cas isolés, sporadiques ou d'épidémies. En Suède, en 1997, une exploitation laitière a été impliquée dans un cas d'infection à STEC. La même souche a été isolée sur un échantillon fécal de la personne malade et des bovins. La visite occasionnelle de fermes a été associée à de nombreux cas d'infections sporadiques à O157 en Angleterre. Le risque est notable chez

les personnes qui sont en contact non régulier avec une ferme ou son environnement, que ce soit pour une visite occasionnelle, des vacances ou des visites professionnelles (**O'Brien et al., 2001**).

c. Transmission inter-humaine :

La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. De plus, cette transmission est d'autant plus importante lorsque l'hygiène générale est mauvaise et que les contacts sont étroits. La transmission oro-fécale est une réelle préoccupation dans les crèches (**Sugiyama et al., 2005**), les centres de soins journaliers et dans les centres psychiatriques. Ce mode de transmission est aussi responsable de l'extension de l'infection au sein des familles et dans les hôpitaux. La durée du portage serait en moyenne de 13 jours lors d'*Escherichia coli* entérohémorragique et de 31 jours lors de syndrome hémolytique et urémique SHU (**Bielaszewska et al., 1997**).

d. Transmission hydrique :

Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. Entre 1997 et 2004, le système de surveillance des Etats-Unis rapportait que 6% des épidémies d'origine hydrique étaient liées aux EHEC.

- La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infection et d'épidémies à *Escherichia coli*.
- L'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans un lac, ou dans une autre étendue d'eau naturelle (**Jackson et al., 1998**) (**figure 05**).

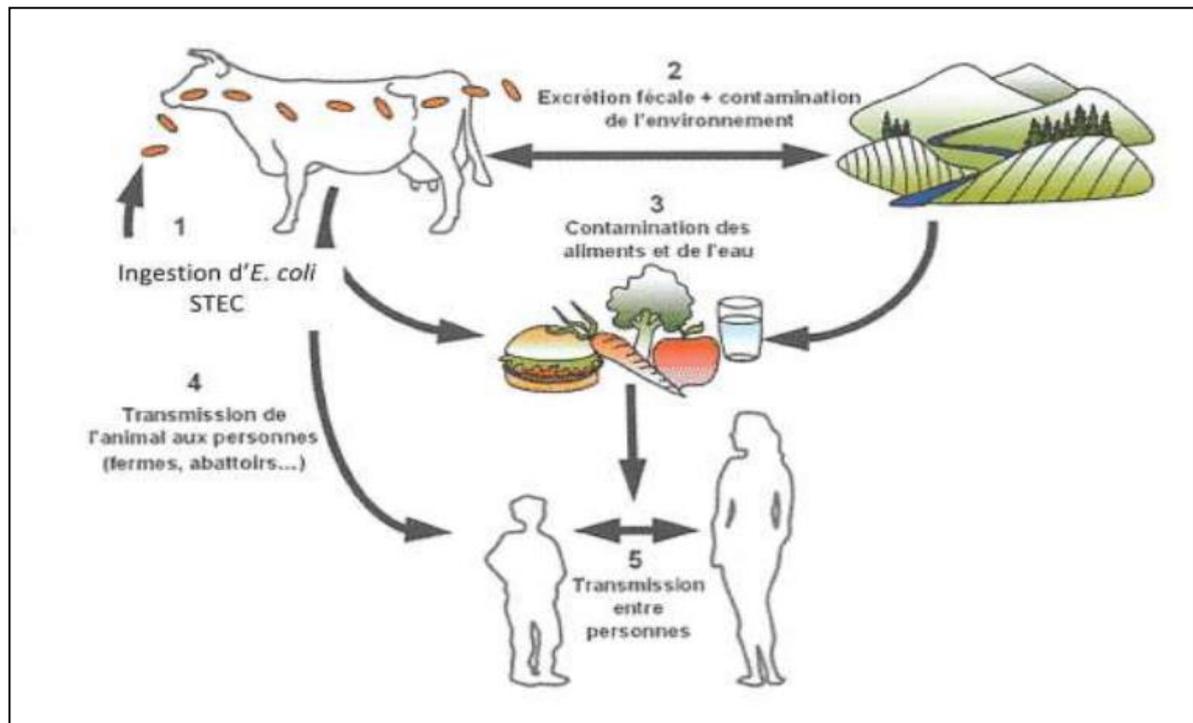


Figure 03 : Les voies de contamination par l'*Escherichia coli* (Marc, 2000).

III.7. Déterminants de la formation de biofilm chez *E. coli*

Parmi les nombreux facteurs de virulence décrits chez *E. coli*, un certain nombre sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation du biofilm. On peut citer les flagelles et les fimbriae (ou pili), plutôt impliqués dans les étapes d'adhérence aux surfaces et de développement précoce du biofilm, ainsi que l'antigène 43, le PGA (Poly- β -1,6-N-acétylglucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm (Beloin *et al.*, 2008; Van Houdt *et Michiels*, 2005). Leurs voies de régulation sont complexes et peuvent être intriquées, rendant difficile la compréhension des conditions de formation des biofilms qui sont très dépendantes des conditions environnementales.

a. Les flagelles

Les flagelles sont des appendices filamenteux extracellulaires de structure hélicoïdale, insérés dans la membrane interne. Ils permettent à la bactérie de se déplacer en milieu liquide ou semi-liquide et ont un rôle dans le chimiotactisme. Une étude a montré le rôle décisif des flagelles dans l'initiation de la formation de biofilm : ils favoriseraient l'attachement initial des bactéries à une surface en luttant contre les forces électrostatiques répulsives et leur permettraient de se propager le long de cette surface (Pratt *et Kolter*,

1998). Cependant, certaines souches non mobiles sont également capables de produire du biofilm. C'est le cas des *E. coli* entéroagrégatifs (Sheikh *et al.*, 2001) ou de souches surexprimant des adhésines de surfaces telles que les curli (Prigent-Combaret *et al.*, 2000).

b. Les fimbriae (ou pili)

Les fimbriae sont des appendices filamenteux extracellulaires permettant aux bactéries d'adhérer entre elles ou à une surface. Ils forment des tubes minces et droits implantés dans la membrane externe bactérienne et constitués de plusieurs sous-unités. Ils sont plus courts, plus minces et plus nombreux que les flagelles. Il existe quatre classes principales de fimbriae : les fimbriae de type 1, les fimbriae P, les curli et les pili conjugatifs.

c. Les auto-transporteurs de type V

Chez les bactéries à Gram négatif, la translocation des protéines vers la surface bactérienne ou le milieu extracellulaire nécessite le passage à travers la membrane cytoplasmique, le périplasma et la membrane externe. Le passage de la membrane externe est réalisé grâce à différentes voies de sécrétion. Parmi elles, les auto-transporteurs de type V sont des protéines sécrétées qui contiennent tout l'équipement nécessaire pour leur propre sécrétion à travers la membrane externe. Ces protéines ont une structure similaire avec quatre domaines caractéristiques : un peptide signal N-terminal permettant le passage de la membrane cytoplasmique par la voie Sec-dépendante, le domaine constituant la protéine mature qui est sécrétée (ou domaine passager), une région nécessaire au passage du domaine passager à travers la membrane externe et un domaine C-terminal formant un pore transmembranaire (Henderson *et al.*, 2004). Après le passage de la membrane cytoplasmique, le peptide signal est coupé par une peptidase, libérant la protéine mature dans l'espace périplasmique. Le domaine C-terminal peut alors s'insérer dans la membrane externe pour former un pore transmembranaire permettant la translocation du domaine passager à la surface bactérienne (Beloïn *et al.*, 2008). Parmi ces auto-transporteurs, l'antigène 43 et les protéines AidA et TibA ont un rôle dans la formation des biofilms.

d. Les polysaccharides de la matrice du biofilm

En parallèle de l'expression de protéines adhésives, la production d'une matrice est essentielle pour la maturation du biofilm. Comme il a été vu précédemment, elle a un rôle protecteur et structural. Les interactions entre les différents constituants de la matrice peuvent participer à la croissance tri-dimensionnelle du biofilm. Il existe une très grande

hétérogénéité dans la composition de la matrice, mais plusieurs exopolysaccharides tels que la cellulose, l'acide colanique ou le PGA: Poly- β -1,6-N-Acétyl-Glucosamine sont des composants clés des biofilms à *E. coli*.

e. Les polysaccharides à la surface bactérienne

Les polysaccharides de surface ont aussi un rôle dans les interactions entre les bactéries et leur environnement. La plupart des souches de *E. coli* produisent un nombre complexe de polysaccharides de surface, spécifiques de sérotypes : le lipopolysaccharide (LPS) avec l'antigène O et l'antigène de capsule K. Les variations de structure de ces polysaccharides donnent plus de 170 antigènes O et 80 antigènes K différents, définissant différents sérogroupes de *E. coli* (Beloin *et al.*, 2008).

IV. Le genre *Listeria* et la formation des biofilms:

IV.1. Historique

La description en 1926 par Murray *et al.*, d'un nouvel agent pathogène, dénommé *Bacterium monocytogenes*, suite à l'observation de plusieurs cas de mort soudaine de jeunes lapins de l'animalerie du département de pathologie de l'université de Cambridge, constitue la première description publiée de *L. monocytogene*. En 1927, suite à des morts suspectes de gerbilles, Pirie *et al* isolent et décrivent également l'agent de la listériose. Du fait de son caractère pathogène et en l'honneur de Lord Lister, Pirie nomma ce nouvel agent infectieux *Listerella hepatolytica*. La similarité des deux découvertes obligea Murray et Pirie à renommer l'agent sous le nom de *Listerella monocytogenes*. Le nom *Listerella* étant déjà utilisé pour un champignon et un protozoaire, il fut rejeté en 1939 par la commission internationale du « Committee on Systematic Bacteriology ». Ce n'est qu'en 1940 que le nom définitif *Listeria monocytogenes* fut accordé et retenu par les « Approved Lists of Bacterial Names » (Euzèby et Tindall, 2004).

IV.2. Caractéristiques

Les *Listeria* sont des petits bacilles (0,4 μ m de diamètre et 0,5-2 μ m de longueur), qui ne sont ni sporulées ni capsulées, très présents dans le milieu extérieur, le sol, la végétation et les eaux stagnantes. Sa mobilité, uniquement à 20-25°C, est assurée par une ciliature péritriche lui donnant des mouvements en "pirouette" reconnaissable à l'état frais.

Listeria se développe dans des températures variant de 1° à 45°C avec une température optimale de 30-37°C. Une courte pasteurisation la détruit, elle est halophile (certaines souches

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

supportent 20% de NaCl), sa croissance est possible à pH 6-9 et possède une catalase et des cytochromes mais pas d'oxydase (**Brooks et al., 1989**).

Listeria est aérobie anaérobie facultatif et fermente le glucose (et beaucoup d'autres glucides) sans gaz en formant de l'acide lactique L(+). *Listeria* a toutefois une préférence pour les faibles pressions en oxygène : tendance plutôt micro aérophile. Les *Listeria* se développent sur gélose au sang, leur croissance étant stimulée par l'ajout de 0,2-1 % de glucose, elle se développe également sur gélose Mac Conkey en présence de 0,25 % d'acétate de thallium, 3,75 % de thiocyanate de potassium, de 0,04 % de tellurite de potassium et de 0,01 % de chlorure de 2,3,5 triphényl tétrazolium (TTC). L'acide de sodium inhibe le développement de *Listeria*. Elles résistent à 55°C pendant 30 min, à 40% de bile et à 10% de NaCl (**Zaika et Fanelli, 2003**).

IV.3. Taxonomie

Dés 1966, la recherche de plus en plus fréquente de *Listeria* dans des niches écologiques variées a conduit à l'isolement de souches atypiques dont l'étude taxonomique a montré qu'il s'agit bien de nouvelles espèces. Compte tenu des travaux de J. Rocourt (**Rocourt, 1999**), *Listeria* est un petit bacille à Gram positif qui a longtemps été considéré comme une bactérie corynéforme; il est actuellement admis que les bactéries de ce genre appartiennent à la branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* (**Avril, 2000 ; Rocourt, 1999**).

A ce jour, le genre *Listeria* (Phylum : *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Bacilliales*, Famille : *Listeriaceae*) regroupe 18 espèces bactériennes dont *L.monocytogenes* qui est la principale pathogène pour l'homme (**Guillet et al., 2010**) (Tableau 3).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 03 : les dix-huit espèces de *Listeria* recensées en 2015.

Espèce de <i>Listeria</i>	Référence
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> , <i>L. grayi</i> , <i>L. denitrificans</i> et <i>L. ivanovii</i>	Wiedmann (2002)
<i>L. marthii</i>	Graves <i>et al.</i> (2010)
<i>L. rocourtiae</i>	Leclercq <i>et al.</i> (2010)
<i>L. fleischmannii</i>	Bertsch <i>et al.</i> (2013)
<i>L. weihenstephanensis</i>	Halter <i>et al.</i> (2013)
<i>L. floridensis</i> , <i>L. aquatica</i> , <i>L. cornellensis</i> , <i>L. riparia</i> et <i>L. grandensis</i>	den Bakker <i>et al.</i> (2014)
<i>booriae</i> et <i>L. newyorkensis</i>	Weller <i>et al.</i> (2015)

IV.4. Caractéristiques morphologiques

Les cellules de *Listeria* sont des bâtonnets Gram+ courts et réguliers, de 0,4-0,5 µm de diamètre et 0,5-2 µm de longueur, avec des extrémités arrondies. Quelques cellules peuvent être incurvées. La longueur de la cellule n'est pas corrélée avec la cinétique de croissance (Zaika et Fanelli, 2003). Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînettes. Bien qu'une capsule a été observée dans des conditions particulières de culture, certains microbiologistes pensent que *L. monocytogenes* devrait être considérée comme une espèce bactérienne non capsulée, ne forme pas de spores. Elle est mobile quand elle est cultivée à 20-25°C grâce à la présence des flagelles péritriches, et immobile ou faiblement mobile à 37°C. (Figure 06)



Figure 04 : Caractères morphologiques de *Listeria monocytogenes* (coloration Gram) (Kaiser, 1998).

IV.5. Caractéristiques biochimiques

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. La xylose, raffinose, inositol, dulcitol, mannitol, adonitol ne sont pas fermentés. *Listeria* donne des résultats positifs en présence de rouge de méthyle et au test Voges Proskauer. Le catabolisme du glucose emprunte la voie d'Embden-Meyrhopf. En anaérobiose, le produit terminal est l'acide lactique; en aérobie, apparaissent le pyruvate, l'acétoïne, l'acide lactique (**Rocourt et Jacquet, 2000**).

Listeria innocua est capable de métaboliser le méthane, le soufre et l'azote, parmi beaucoup d'autres composés organiques et inorganiques. Ces organismes effectuent également de nombreuses voies biosynthétiques, y compris la synthèse peptidoglycane. *Listeria innocua*, comme d'autres membres de leur genre, sont des anaérobies facultatives, ce qui signifie qu'ils 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 4 et 5)

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 04: Caractères biochimiques différenciant les espèces de *Listeria* (Rocourt et Jacquet, 2000).

Espèces	Hémolyse	CAMP test*	CAMP test**	XYL	RHA	MDG	RIB	Man
<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	-	+

* *Staphylococcus aureus*; ** *Rhodococcus equi*; (+) réponse positive; (-) réponse négative
RHA: Rhamnose. XYL: D-xylose; RIB: Ribose; Man: Mannitol; MDG: α méthyl

Tableau 05 : Testes biochimiques réalisés en utilisant une galerie API *Listeria* (bioMérieux).

1. <i>Listeria innocua</i> 2. <i>Listeria ivanovii</i>	ATCC® 33090™ ATCC® BAA-139™	3. <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19115™						
ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.									
[DIM]	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
1.	+	+	+	-	+	+	-	-	-
2.	+	+	-	+	+	V	-	+	-
3.	-	+	+	+	-	+	-	-	-
* Occasionnellement (-).									

IV.6. Caractères cultureux

Listeria est aérobie microaéroophile. Les cultures sont plus abondantes sous une tension réduite en oxygène (O₂) (Doyle, 1988) et anaérobie facultative. Elle est mésophile mais avec un comportement souvent psychrotrophe (Djenane et al., 2006). Les colonies de *Listeria*

(24-48 h) sur gélose nutritive ont un diamètre de 0,5-1,5 mm; elles sont arrondies, translucides en goutte de rosée, faiblement convexes à marge entière. Les colonies paraissent grises bleutées par illumination normale et bleu vert par illumination oblique. Les colonies, parfois gluante, s'émulsifient facilement et peuvent laisser une trace de gélose. Les cultures plus âgées (3-7 jours) sont plus larges (3-5 mm de diamètre) avec un centre plus opaque et des formes "rough" peuvent apparaître. Quelques espèces sont β -hémolytiques sur gélose au sang.

Listeria, en gélose molle dans un tube, inoculée par piqûre centrale et incubée à 20°C, a une croissance visible sur toute la hauteur du tube, avec un trouble plus intense à quelques millimètres au-dessous de la surface du milieu; la mobilité se traduit par une image en parapluie caractéristique (**Larpen, 2004**).

IV.7. Caractéristiques antigéniques

Le genre *Listeria* comprend 15 antigènes somatiques (I à XV), et 5 antigènes flagellaires (A à E). La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars (**Catteau, 1991; Rocourt, 2002; Larpen, 2004**).

IV.8. Structure génomique de *Listeria innocua* :

Listeria innocua a un chromosome circulaire composé de 3 011 209 paires de base, avec une teneur en G + C de 37% (3). Seuls 2 973 gènes codant pour la protéine ont été découverts chez *L. innocua*, alors qu'aucune fonction ne pouvait être prédite pour 37% des gènes (**Glaser et al., 2001**). Le génome encode une grande variété de protéines régulatrices, de surface et de transport. Cela explique pourquoi les espèces de *Listeria* peuvent s'adapter et habiter un si large éventail d'environnements. On a trouvé 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 (**Buchrieser et al., 2003**).

IV.9. Pouvoir pathogène

IV.9.1. *Listeria monocytogenes*

a. *Listeria monocytogenes* un germe ubiquitaire

L. monocytogenes est présente dans de nombreuses niches écologiques. Elle est particulièrement répandue au niveau des sols, dans l'eau et la végétation en décomposition et est également présente dans les ateliers agro-alimentaires. La contamination de l'environnement résulte principalement du relargage de la bactérie via les excréments d'animaux qu'ils soient porteurs sains ou malades (Anses, 2011).

b. La listériose : une maladie atypique

-Listériose de l'adulte et de l'enfant : méningites, méningo-encéphalites, encéphalites, septicémie. La grande majorité de ces infections se produisent chez des malades porteurs de tares viscérales (cirrhose, cancers, etc...). La listériose de l'adulte atteint essentiellement les personnes âgées et immunodéprimées.

-Listériose de la femme enceinte : infection bénigne pour la femme, se traduisant souvent par une simple fièvre mais grave pour le fœtus, pouvant provoquer un avortement, la mort in utero ou l'accouchement prématuré.

-Listériose néonatale : septicémie, méningite secondaire à la contamination dans les jours qui précèdent l'accouchement ou au moment de l'accouchement (Jemmi T et Stephan R, 2006).

IV.9.2. *Listeria innocua*

Listeria innocua est considérée comme un saprophyte non hémolytique qui est largement distribué dans l'environnement naturel. Elle est capable de survivre dans des conditions extrêmes (pH élevé, températures élevées et basses, et concentrations élevées de sel). Elle a été isolée du sol, de l'eau de surface, des légumes en décomposition, des eaux usées et des denrées alimentaires (Moreno *et al.*, 2012). Elle est étroitement liée à *Listeria monocytogenes*, mais reste –généralement- considérée comme non pathogène. En fait, *L. innocua* ne semble pas porter les gènes associés à la virulence décrits chez *L. monocytogenes* et *Listeria ivanovii*. Néanmoins, certaines souches atypiques de *L. innocua* ressemblant aux souches hémolytiques de *L. monocytogenes* ont été décrites (Johnson *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2012). Ces souches atypiques présentaient certaines caractéristiques génétiques qui

permettent à cette bactérie de se multiplier à l'intérieur des cellules de certains mammifères. Ces souches 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 ces *L. innocua*.

IV.10. La formation de biofilm chez *Listeria*

a. *L. monocytogenes* :

L. monocytogenes est capable de former des biofilms et de persister pendant de longues périodes, favorisant la contamination des aliments. En raison de sa nature omniprésente, *L. monocytogenes* est fréquemment isolé de l'alimentation et des milieux de transformation des aliments (Moltz et Martin, 2005). Plusieurs travaux ont été réalisés sur la capacité de *L. monocytogenes* à former des biofilms sur différents types de surfaces tel que le polystyrènes, l'inox le plastique et le verre (Chae et Schraft, 2000) et 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* :

La capacité de *L. innocua* à former des biofilms a été étudié par plusieurs chercheurs car cette dernière présente les mêmes caractéristiques que *L. monocytogenes* sans qu'elle soit pathogène. Plusieurs études ont été réalisées sur différents types de surfaces (Jeon *et al.*, 2018). Les têt d'adhésion et de formation de biofilms les plus importante ont été observés sur le caoutchouc, suivie du polypropylène, du verre et de l'acier inoxydable (Hye Ri Jeon, *et al.*, 2018).

IV.11. Les Déterminants de la formation de biofilm chez *L. monocytogenes*

a. Polysaccharides

- ✓ **Molécules** : poly- β -(1,4) -N- acétylmannosamine (poly-NAM) Acides téichoïques (WTA et LTA). « WTA: Wall Teichoic Acids; LTA: Acides lipotéichoïques »
- ✓ **Caractéristiques** :
 - Les acides téichoïques sont le principal composant de la matrice biofilm listeriale. (Brauge *et al.*, 2016).
 - Les mutants *dltABCD* présentent une réduction de la capacité de formation de biofilm. (Alonso *et al.*, 2014).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- La biosynthèse du poly-NAM est activée par des niveaux élevés de c-di-GMP. «c-di-GMP: monophosphate de diguanosine cyclique»

b- Protéines

✓ **Molécules :** InlA, BapL, PlcA, FlaA PBP, ActA, Lmo2504.

✓ **Caractéristiques :**

- Le traitement par la protéinase K entrave le développement du biofilm, suggérant une implication des protéines dans l'attachement initial.

- Les protéines tronquées présentaient une capacité accrue de formation de biofilm.

- BapL peut contribuer à la fixation de certaines souches de *L. monocytogenes*.

- La motilité flagellaire a un rôle controversé dans la formation de biofilm (**Franciosa et al., 2009**).

c- ADN extracellulaire

✓ **Caractéristiques :**

- Le traitement par DNaseI a inhibé ou retardé la fixation initiale des bactéries sur les surfaces, suggérant une implication de l'ADN e dans la fixation initiale.

- Assurer l'intégrité structurelle du biofilm en coopération avec les protéines et les polysaccharides- Impliqué dans le transfert horizontal de gènes.

- Sert de source d'énergie et de nutrition.

- L'eDNA est libéré par des bactéries lysées (**Harmsen et al., 2010**).

V. La 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.

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.

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 de 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 employés 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 pollution 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 micro-organismes indésirables 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

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

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 (**Beauclair *et al.*, 2011**).

PARTIE EXPERIMENTALE

Les objectifs de ce travail sont répartis en deux grands axes :

-Le premier consiste à l'évaluation de la contamination des surfaces de l'abattoir par les bactéries *E. coli*, *L. monocytogenes* et *L. innocua*.

-Le deuxième consiste à l'étude de la capacité de ces bactéries à former des biofilms sur un support en plastique (cuves) en variant plusieurs paramètres : l'aérobiose et la microaérophilie, la charge bactérienne et les espèces bactériennes formant le biofilm.

Ces deux parties sont réalisées au laboratoire de microbiologie de la faculté de science de la nature et de la vie et science de la terre (Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira).

La confirmation des souches isolées en utilisant les galeries API (API 20^E et API *Listeria*) a été sous-traitée chez un laboratoire externe.

1. Matériels et méthodes :

1.1. Echantillonnage :

L'ensemble des prélèvements ont été réalisés au sein d'une unité d'abattage à Ain Bessem (abattoir bovin et ovin). Elle se situe à l'extrémité de la ville à environ de 1km, pas loin de la route nationale N°5. Ses caractéristiques sont les suivantes : elle s'étend sur une superficie globale de 500m², comprend deux salles de stabulation pour diète hydrique, une pour les bovins et l'autre pour les ovins ainsi qu'une grande salle équipées d'une chaîne d'abattage traditionnelle. Le sol est couvert de carrelage et les murs de faïence (à hauteur de deux mètres). Elle contient aussi, une chambre de refroidissement, une chambre de lavage des abats et un bureau pour le service vétérinaire. Les capacités de production de cette unité sont résumées dans le tableau 06.

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

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

a. Méthode d'échantillonnage :

Pour des raisons de commodité de travail, de simplicité, et de rapidité, nous avons choisi la technique d'écouvillonnage. Nous avons suivi 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

PARTIE EXPERIMENTALE

surfaces se rencontrant 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 :**

Dans une zone stérile, 10 ml de TSB (*tryp case soy broth*) sont versés dans le tube de l'écouvillon stérile. Ces derniers sont stockés à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation (une heure approximativement).

➤ **Technique d'écouvillonnage :**

L'analyse bactériologique 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 (dans le but d'évaluer la contamination croisée) 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, on appui son extrémité contre la paroi du tube pour éliminer l'excès de TSB.

La pointe de l'écouvillon est placée sur la surface à étudier, des stries couvrant une superficie de 10cm² sont réalisées en faisant tourner le tampon entre le pouce et l'index dans deux directions 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 surface prélevée.

Les écouvillons sont conservés à 4°C et acheminés directement au laboratoire pour analyse.

NB : les opérations de nettoyage et désinfection sont résumées à un simple rinçage à l'eau de l'ensemble des surfaces.

➤ **Nombre d'échantillons :**

Durant la période allant du 20 avril au 27 mai 2018, 80 prélèvements ont été recueillis de différentes surfaces de l'abattoir dont 70 ont été réalisés avant les opérations de nettoyage et désinfection et 10 après. Leur répartition selon la nature de la surface est résumée dans le tableau 07.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 07 : Répartition des échantillons selon la nature de la surface prélevée.

Surfaces prélevées	Nombre de prélèvements
Avant nettoyage et désinfection	
Remorques	04
Aiguiseurs	04
Crochets	04
Couteaux	10
Grands couteaux	04
Carcasses	02
Tables	09
Vêtements	02
Mures	13
Mains	18
Après nettoyage et désinfection	
Crochets	02
Couteaux	02
Tables	02
Mures	02
Mains	02

Pour notre étude, nous avons utilisée :

a/ ceux nécessaires pour la partie recherche et dénombrement :

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

b/ ceux nécessaires pour les tests d'adhésion et formation de biofilms :

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

PARTIE EXPERIMENTALE

1.1.1. Matériel :

Le matériel utilisé se compose de :

- Bain marin (Water Bath NB 20);
- Balance de précision (Scout™ SE) ;
- pH mètre (METTLER TOLEDO) ;
- Autoclave (DaiHanWAC-80, Korai) ;
- Etuve (Dlabtech LDO-080N) ;
- Spectrophotomètre (OPTIZEN 32200 UV) ;
- Densitomètre (bioMérieux) ;
- Micropipettes avec embouts jetables ;
- Ecouillons stériles ;
- Cuves en plastiques pour spectrophotomètres ;
- GENboxmicroaer ;
- GENbag ;
- Matériel usuel du laboratoire de microbiologie.

1.2.Méthodes

1.2.1. Isolement, identification et dénombrement :

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

PARTIE EXPERIMENTALE

Les colonies de *Listeria monocytogenes* présentent en plus 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 mode opératoire est représenté dans la figure 6.

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 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 βD-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 plupart des bactéries Gram positif est inhibée.

➤ **Mode opératoire :**

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 5.

c. Exploitation des résultats :

- Le nombre d'UFC dans les surfaces N_s est calculé selon la formule donnée par la norme **ISO 18593 de 2004**.

PARTIE EXPERIMENTALE

$$N_s = (N \times F) / A$$

N= Somme des colonies comptées sur la boîte retenues.

F = le volume en millilitre de la dilution mère.

A= surface écouvillonnée en cm².

- Si la surface écouvillonnée n'est pas précise, Le nombre d'UFC par écouvillon N_{SW} est calculé selon la formule :

$$N_{SW} = N \times F \times D$$

D= l'inverse de la dilution utilisée.

Le résultat est donné par écouvillon.

1.2.2. Méthodes pour la réalisation des tests d'adhésion et formation de biofilm :

Les testes d'adhésion et de formation de biofilm ont été réalisées selon les principes de la méthode de quantification de la biomasse décrite par Christensen *et al.*, (1985). Cette méthode a été modifiée et adaptée aux objectifs fixés (nature du support) et aussi aux moyens dispensés pour la réalisation de cette partie de l'étude. La lecture des cuves en utilisant le spectrophotomètre a pu se faire sans la réalisation de la coloration au Crystal violet car le milieu de culture utilisé (TSB) est de couleur jaune (spectre lisible).

L'estimation de la formation des biofilms a été faite selon la classification décrite par **Stepanovic *et al.* (2000)**. Les souches, compte tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en trois catégories : non adhérentes, faiblement adhérentes et hautement adhérentes (tableau 08).

Tableau 08 : Estimation de la formation des biofilm.

$DOs \leq D_{nc}$ (Témoin)	Bactérie non formatrice du biofilm
$DO_{nc} \times 2 \leq DOs \leq DO_{nc} \times 4$	Formation Modérée de biofilm
$DO_{nc} \times 4 \leq DOs$	Bactérie fortement formatrice du biofilm

-DOs : densité optique de souche

-DO_{nc} : densité optique de témoin (TSB)

➤ Repiquage et enrichissement :

Après la réalisation des tests de confirmation par galerie Api, 04 souches d'*E. coli*, 10 souches de *L. monocytogenes* et 2 souches de *L. innocua* ont fait l'objet d'un repiquage sur gélose TSA suivi d'un enrichissement sur TSB en vue de la réalisation des testes d'adhésion et de formation de biofilm (voir les figures 5 et 6).

PARTIE EXPERIMENTALE

➤ Préparation des suspensions :

A partir des tubes de TSB, des suspensions des souches et associations de souches sont préparées en ajustant la charge bactérienne à 1 McF et à 4 McF à l'aide d'un densitomètre selon le tableau 09.

Tableau 09: Souches et associations de souches préparées à 1 et à 4 McFarland.

Souches					
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	
Suspensions à 1 McF		10	2	4	
Suspension à 4 McF		10	2	4	
Associations de souches					
	Associations <i>L.m</i>	<i>L.m+E. coli</i>	<i>L.i+E. coli</i>	<i>L.m+L.i</i>	<i>L.m+L.i+E. coli</i>
Suspensions à 1McF	1	6	1	2	2
Suspension à 4McF	/	2	1	/	/

➤ Préparation des cuves en plastique :

Les cuves en plastique ont subi une désinfection en utilisant un désinfectant à base d'amine spécifique au secteur agro-alimentaire. Une solution à 1% est préparée (spectre : bacéricidie et fongicide). 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 paille dans le champ stérile du bec Bunsen.

➤ Remplissage des cuves et incubation:

A l'aide d'une micropipette, 250 µl de chaque souche est mise dans une cuve. Pour les associations de souches, 250 µl de chaque souche faisant partie de l'association sélectionnée est mise dans une cuve. (Tableau 09).

Cette opération est réalisée en duplicata. La moitié des cuves sont incubées en aérobiose à 37°C et l'autre moitié est incubée en microaérophilie en utilisant des Genbox microaer et des Genbag.

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

Deux premières lectures de la densité optique des souches (DOs) et d'un témoin négatif (DONc) (cuve rempli avec 250 µl de TSB) sont réalisées à 24h et à 48h pour évaluer l'adhésion. Deux autres lectures sont réalisées à 5 jours et à 6 jours pour évaluer la formation et

PARTIE EXPERIMENTALE

le développement des biofilm. Pour les associations de souches, une lecture est réalisée à 24h pour évaluer l'adhésion. Trois autres lectures sont réalisées à 4j, 5jours et à 6jours pour évaluer la formation et le développement des biofilm et cela en appliquant la classification suivante : pas de production de biofilm (**P**) si $ODs \leq ODnc$; production faible de biofilm (**Fa**) lorsque $ODnc < ODs \leq 2.ODnc$; production moyenne (**M**) de biofilm $2.ODnc < ODs \leq 4.ODnc$ et forte (**F**) production de biofilm $4.ODnc < ODs$ (**Rodrigues et al., 2010 ; Afreenish et al., 2011 ; Auger, 2012**).

1.2.3. Analyse statistique

L'analyse statistique de nos résultats a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat 2018 pour Windows. On utilise le test student.

Les résultats ont été considérés comme statistiquement différents pour des valeurs de $p < 0,05$.

PARTIE EXPERIMENTALE

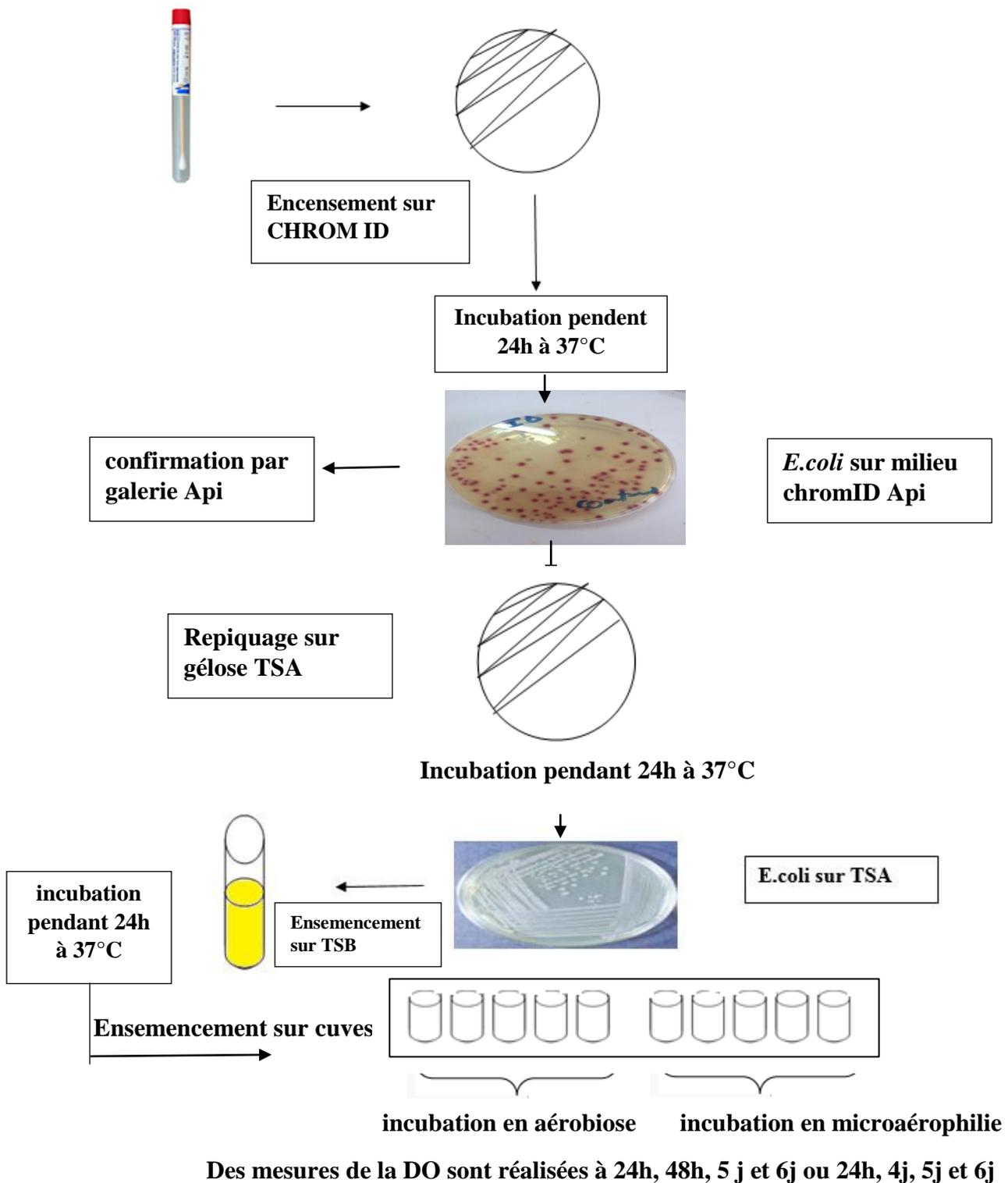


Figure 05: Organigramme de l'isolement, identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli*.

PARTIE EXPERIMENTALE

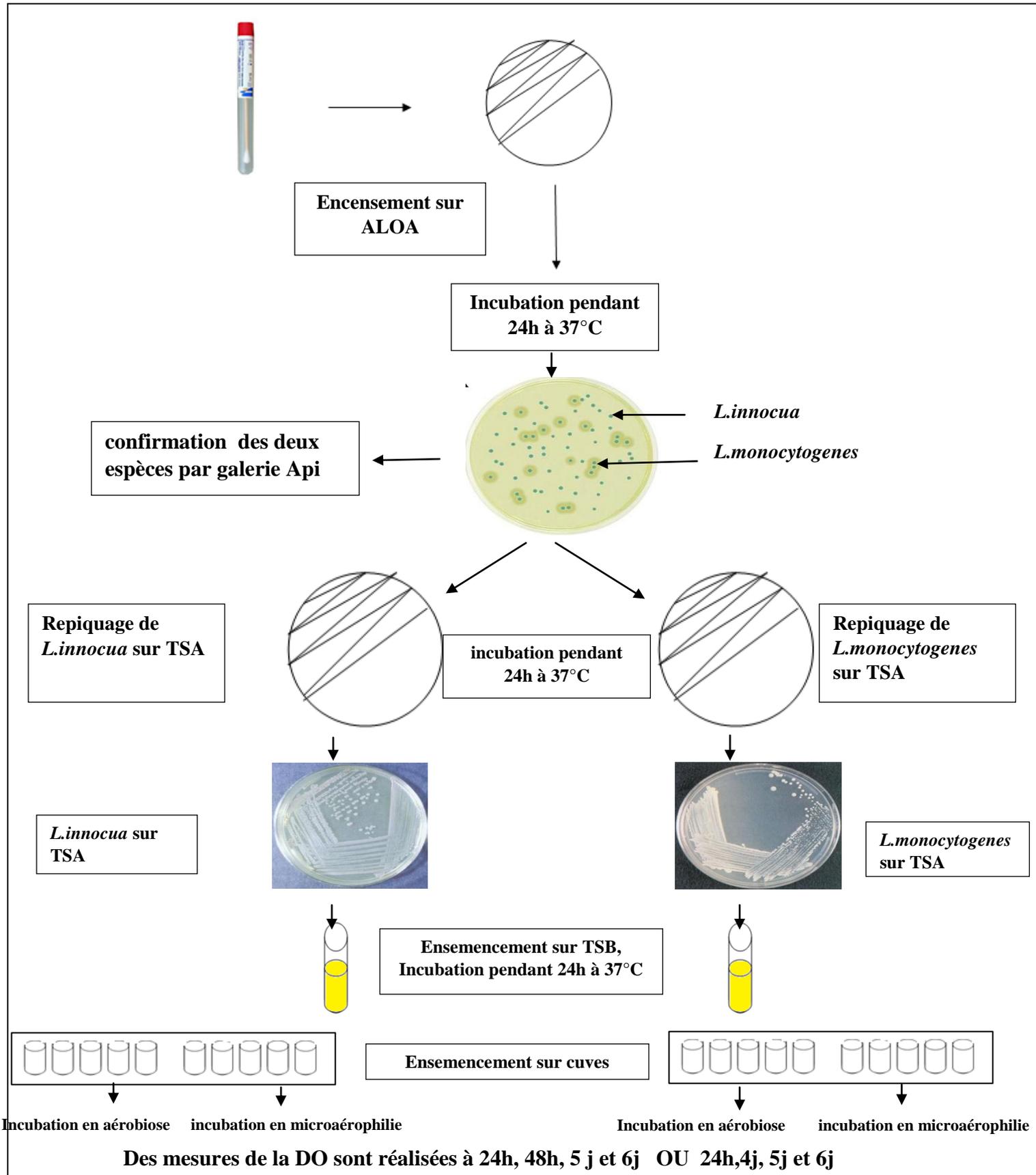


Figure 06 : Organigramme de l'isolement, identification et tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* et *L. innocua*.

PARTIE EXPERIMENTALE

Resultats et disscution

1. Isolement et dénombrement des *Listeria* :

Tous les échantillons analysés ont révélé la présence de *L. monocytogenes* et *L. innocua*. Des colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique du genre *Listeria* ont été observées. *Listeria monocytogenes* a formé des colonies rondes, régulières, de couleur bleue à bleu vert entourées d'un halo opaque. Les colonies de *Listeria innocua* ont présenté le même aspect que celle de *L. monocytogenes* mais sans la présence du halo opaque (figures 07).

Les résultats des dénombrements de chaque bactérie sur chaque type de surfaces (moyennes) sont résumés dans les tableaux 10 et 11.

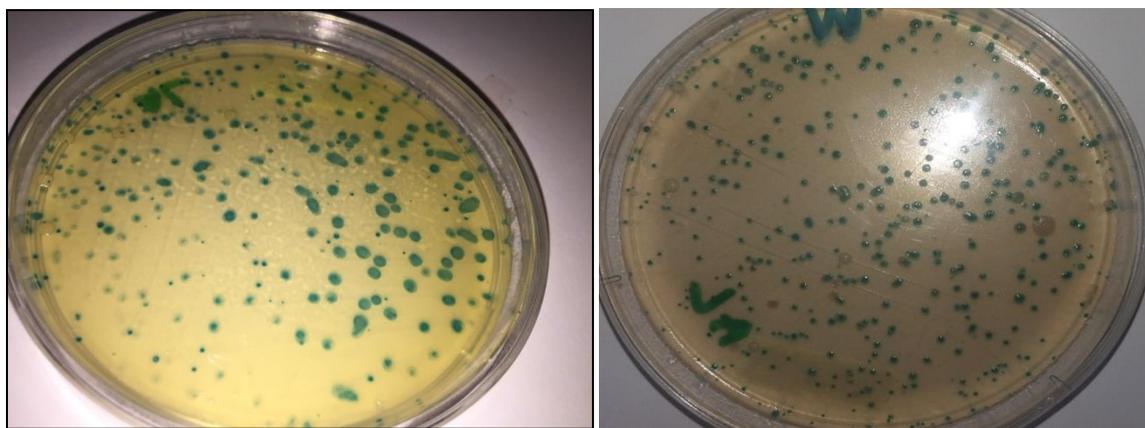


Figure 07: Aspect des colonies de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* et sur le milieu ALOA

Tableau 10 : Nombre des *Listeria monocytogenes* isolés par cm² ou par écouvillon.

Origine	Nombre de prélèvements	UFC /cm ² ou UFC /écouvillon
Avant nettoyage et désinfection		
Mains	9	300
Couteaux	5	260
Grands couteaux	2	160
Vêtements	2	200
Tables	4	150
Aiguiseurs	2	250
Crochets	2	50
Remorques	2	200
Carcasses	2	20

PARTIE EXPERIMENTALE

Mures	6	250
Après nettoyage et désinfection		
Crochets	1	50
Couteaux	1	200
Tables	1	147
Mures	1	70
Mains	1	200

Tableau 11 : Le nombre des *Listeria innocua* isolés par cm² ou par écouvillon.

Origine	Nombre des prélèvements	Li UFC /cm ² ou UFC /écouvillon
Avant nettoyage et désinfection		
Mains	9	30
Couteaux	5	40
Grands Couteaux	2	30
Vêtements	2	20
Tables	4	40
Aiguiseurs	2	40
Crochets	2	27
Remorques	2	30
Carcasses	2	5
Mures	6	70
Après nettoyage et désinfection		
Crochets	1	17
Couteaux	1	10
Tables	1	7
Mures	1	20
Mains	1	32

PARTIE EXPERIMENTALE

2. Isolement et dénombrement d'*E. coli* :

Tous les échantillons analysés ont révélé la présence de d'*E. coli* sur le milieu CHROMID.

Des colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique de l'espèce *E. coli* ainsi que d'autres coliformes ont été observées. *E. coli* a formé des colonies rondes, régulières de couleur rose, et les autres coliformes ont formé des colonies bleu/gris.

Les résultats des dénombrements des *E. coli* sur chaque type de surfaces (moyennes) sont résumés dans le tableau 12.

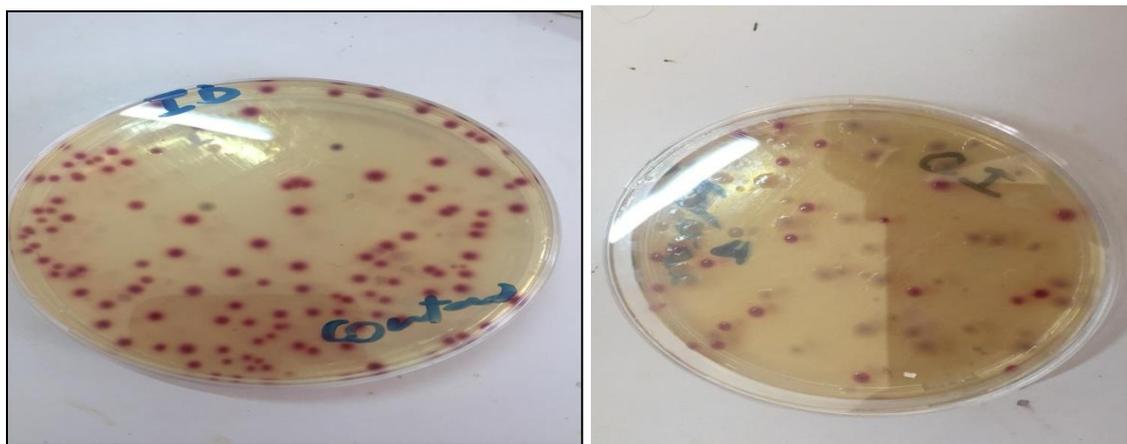


Figure 08 : Aspect des colonies d'*E. coli* sur le milieu CHROMID.

Tableau 12: Nombre d'*E. coli* isolés par cm² ou par écouvillon.

Origine	Nombre des prélèvements	UFC/cm ² ou ufc/écouvillon
Avant nettoyage et désinfection		
Couteaux	9	110
grands Couteaux	5	50
Vêtements	2	30
Tables	2	10
Aiguiseurs	5	60
Crochets	2	50
Remorques	2	160
Carcasses	2	250
Mures	2	40
Mains	7	60
Après nettoyage et désinfection		
Crochets	1	13
Couteaux	1	7

PARTIE EXPERIMENTALE

Tables	1	3
Mures	1	1
Mains	1	Abs

3. Interprétation des résultats de l'évaluation de la contamination des surfaces:

En comparant les résultats que nous avons obtenus aux recommandations des « **Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire** » du Québec page N° 31 (faute de normes algérienne), nous constatons que la présence de ces germes sur les différentes surfaces n'est pas conforme aux normes qui exigent l'absence de tout germe pathogène sur les surfaces pouvant rentrer en contact avec les denrées alimentaires.

La présence des trois espèces bactériennes sur les carcasses indique une contamination croisée qui témoigne du non-respect des bonnes pratiques d'hygiène et bonnes pratiques de fabrication.

La persistance des contaminants sur les surfaces après les opérations de nettoyage et désinfection indique que ces dernières sont inefficaces. Cela s'explique par le fait que ces opérations se résument à un simple rinçage des surfaces qui s'avère inefficace contre l'élimination des contaminants.

4. Repiquage sur TSA et enrichissement sur TSB:

Toutes les souches qui ont fait l'objet d'un repiquage sur TSA (04 souches d'*E. coli*, 10 souches de *L. monocytogenes* et 2 souches de *L. innocua*) ont bien poussé en donnant des colonies beiges (figures 09).

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

PARTIE EXPERIMENTALE



Figure 09 : Aspect des colonies sur gélose TSA.



Figure 10 : Tube TSB après incubation (apparition de trouble).

5. Résultats des tests d'adhésion et formation de biofilms :

La capacité de chaque souche à adhérer sur les cuves en plastique et à former un biofilm a été testée séparément et en association avec les autres souches. Ces tests ont été réalisés en aérobiose et en microaérophilie ; à 1 McFarland et à 4 McFarland.

5.1. Biofilm mono espèce : Solution à 1 McF:

a- *Listeria innocua* : incubation en aérobiose :

Après 24h de culture, il y a eu adhésion, suivie d'une augmentation significative des indices de formation de biofilm lorsque la durée d'incubation est prolongée.

Cette souche était fortement productrice de biofilm à 48h d'incubation. Ce têt a été maintenu à 5 j et à 6 j.

b- *Listeria innocua* : incubation en microaérophilie :

Après 24h de culture, il y a eu adhésion, suivie d'une formation importante de biofilm (la souche est qualifiée comme fortement productrices de biofilm à 48 h).

à 5j et 6j, une diminution de l'indice de formation des biofilm a été remarqué (production moyenne de biofilm).

Les résultats montrent que l'incubation en microaérophilie a conduit à une production moyenne de biofilm au bout de 6j comparé à une forte production de biofilm lors de l'incubation en aérobiose. (Figure 11)

Nos résultats montrent que *L. innocua* a la capacité de former des biofilm 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 la capacité de *L. innocua* à adhérer à plusieurs types de surfaces ainsi que la grande ressemblance de leur pouvoir d'adhésion avec les souches de *L. monocytogenes*.

Nos résultats montrent aussi que la microaérophilie a influencé la formation des biofilm en induisant une diminution du têt de formation à partir de 5j. ($p < 0,05$)

L. innocua est aéro anaérobie facultative, la diminution du têt de croissance en microaérophilie au bout de 5j d'incubation est probablement dû soit à une adaptation moyenne aux conditions d'incubation (préférence plutôt de l'aérobiose) ou bien à cause de la diminution des nutriments disponible au sein du biofilm.

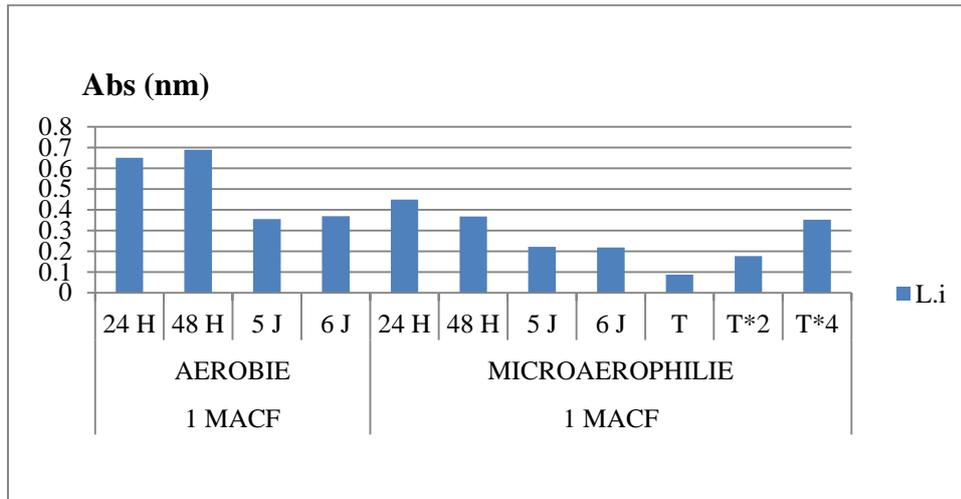


Figure 11: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. innocua* (solution à 1McF).

c- *Listeria monocytogenes* : incubation en aérobiose

Après 24h de culture, l'adhésion a été observée, suivi une production forte de biofilm à 48 h, 5j et 6j d'incubation.

d- *Listeria monocytogenes* : incubation en microaérophilie

Après 24h de culture, l'adhésion a été observée, suivi une production forte de biofilm à 48 h, 5j et 6j d'incubation.

Les résultats montrent que *L. monocytogenes* a la capacité d'adhérer et de former un biofilm sur un support en plastique (figure12).

Nos résultats corroborent ceux obtenus par **Monica et al. (2003) et Pan (2009)** qui ont constaté que les souches de *L. monocytogenes* avait une grande capacité à former des biofilms.

Les 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 ($p < 0,05$). Cela est probablement dû à la capacité des souches 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**).

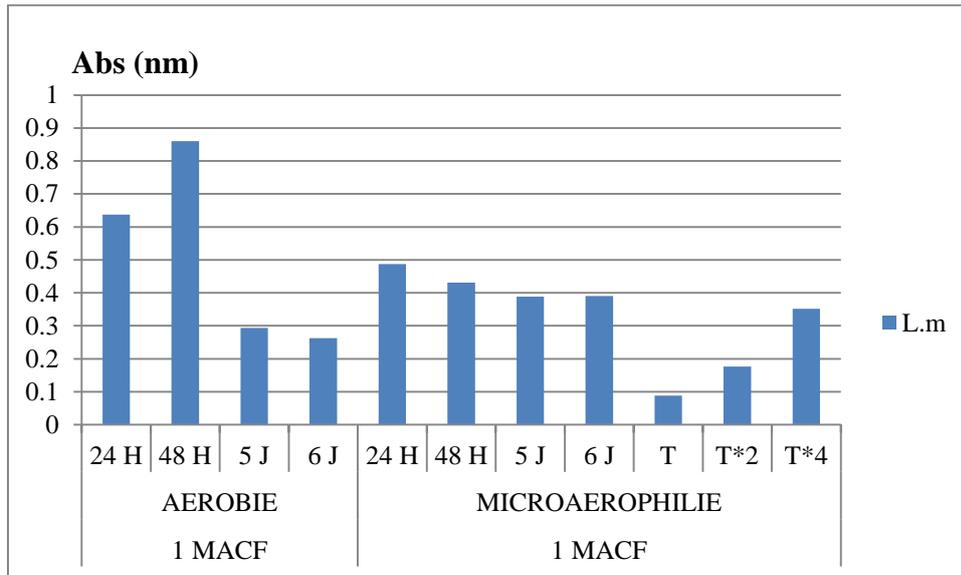


Figure 12 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* (solution à 1McF).

e- *E. coli* : incubation en aérobiose

Après 24h de culture, il y a eu adhésion. La bactérie s'est montrée fortement productrice de biofilm à 48h. L'indice de formation des biofilm a baissé à 5j et 6j avec une production moyenne de biofilm.

f- *E. coli* : incubation en microaérophilie

Après 24h de culture, une adhésion suivi d'une forte production de biofilm à 48h. Cette production est devenue moyenne à 5j et 6j d'incubation.

Les résultats montrent qu'*E. coli* a la capacité d'adhérer et de former un biofilm sur un support en plastique (figure 13).

Ces résultats corroborent ceux des études antérieures qui ont rapporté la capacité d'*E. coli* à former des biofilms sur différents support sous différentes conditions (**Azam et al., 2018**).

Les résultats montrent aussi que la microaérophilie n'a pas eu d'effet sur le développement des biofilms. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Auger (2012)**, qui a observé que l'incubation en anaérobiose ralentissait considérablement le développement des biofilms.

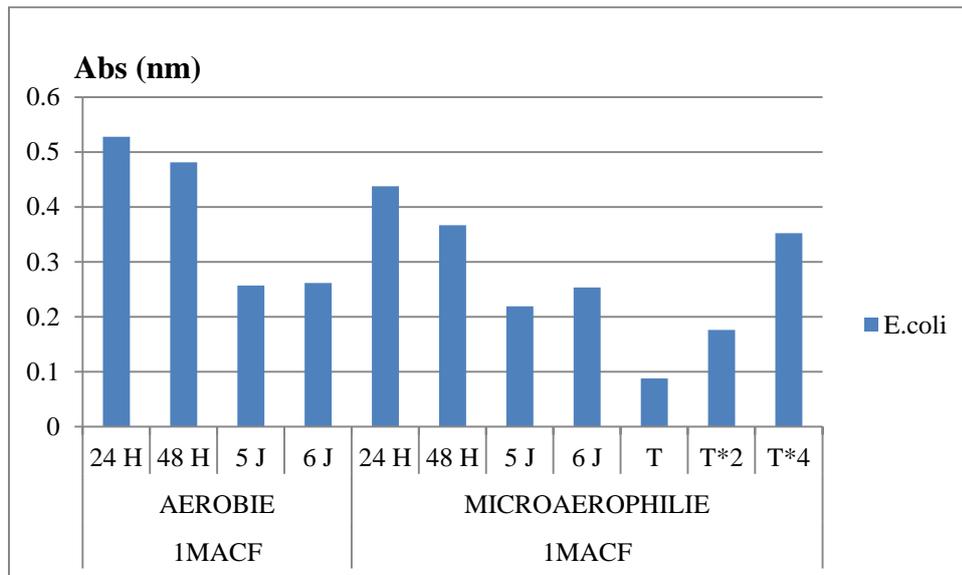


Figure 13 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli* (solution à 1McF).

5.2. Biofilm mono espèce : Solution à 4 McFarland

a-*Listeria innocua* : incubation en aérobiose

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 48 h et une production moyenne à 5j et 6j d'incubation.

b-*Listeria innocua* : incubation en microaérophilie

Après 24h de culture, une très forte adhésion a été observée suivi d'une très forte production de biofilm à 48 h, 5j et 6j d'incubation. Les résultats montrent que la microaérophilie a favorisé le maintien d'un bon indice de formation de biofilm. Cela est probablement dû au caractère microaérophile de *L. innocua* (figure 14).

A 4McF, *L. innocua* eu un comportement différent que celui observé en utilisant des solutions à 1McF indiquant que la charge microbienne associé à la modification de la teneur en oxygène et gaz carbonique ont induit une modification de la cinétique de la formation du biofilm.

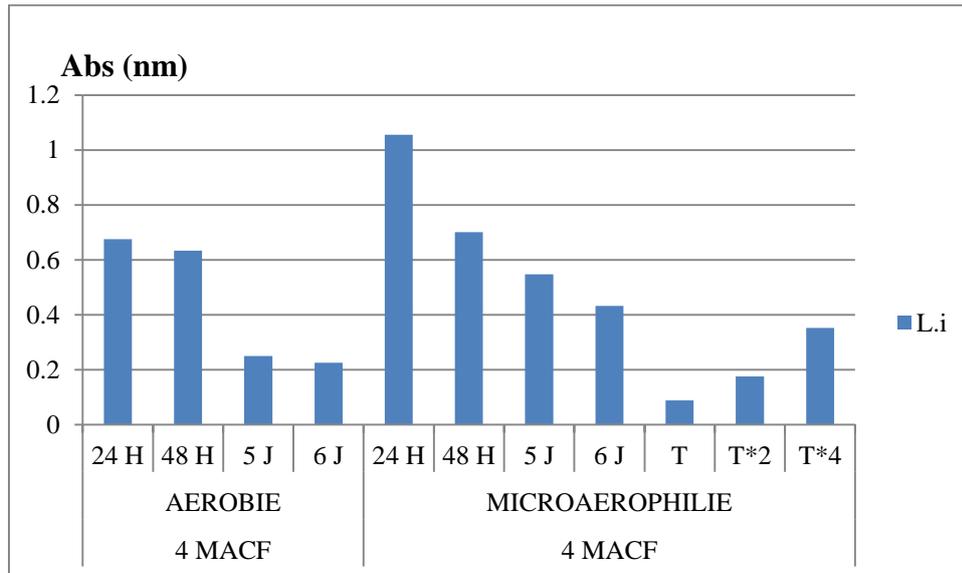


Figure 14: Résultats des tests d’adhésion et de formation de biofilm de *L. innocua* (solution à 4McF).

c-*Listeria monocytogenes* : incubation en aérobiose

Après 24h de culture, l’adhésion a été observée suivi d’une forte production de biofilm à 48 h et une production moyenne à 5j et 6j d’incubation. Cela est probablement dû à l’effet de la charge initiale élevée mis en contact de la surface qui à influencé le maintien du même têt d’adhésion durant toute la période d’incubation. ($p < 0,05$).

d-*Listeria monocytogenes* : incubation en microaérophilie

Après 24h de culture de très forts têt d’adhésion ont été observée suivi d’une forte production de biofilm à 48 h, 5j et 6j d’incubation. Les résultats montrent que la microaérophilie associée à une charge bactérienne élevée ont favorisé le maintien d’un bon indice de formation de biofilm. Une légère baisse est observée à 5j et 6j. Cela est probablement dû au manque de nutriments au sein du biofilm.

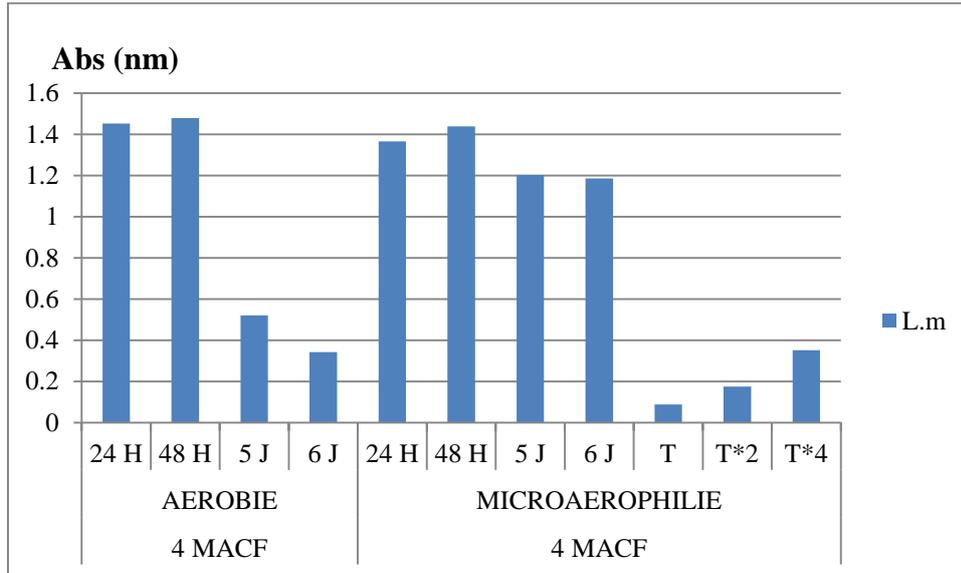


Figure 15 : Résultats des tests d’adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* (solution à 4 McF).

e- *E. coli* : incubation en aérobiose

Après 24h de culture, la bactérie à adhérer fortement à la surface et a montré une très forte production de biofilms à 48 h. La production est devenue moyenne à 5j et 6 j d’incubation.

g- *E. coli* : incubation en microaérophilie

Après 24h de culture, la bactérie à adhérer fortement sur la surface et a montré une très forte production de biofilms à 48 h, 5j et 6j.

Le développement de biofilm en microaérophilie était est plus important qu’en aérobiose ($p < 0,05$). Cela est probablement dû à l’augmentation du nombre des bactéries mis initialement en contact avec le support ainsi qu’une adaptation aux conditions de microaérophilie (figure 16).

E. coli à eu un comportement légèrement différent en augmentant la charge bactérienne à 4McF avec une croissance meilleure en microaérophilie.

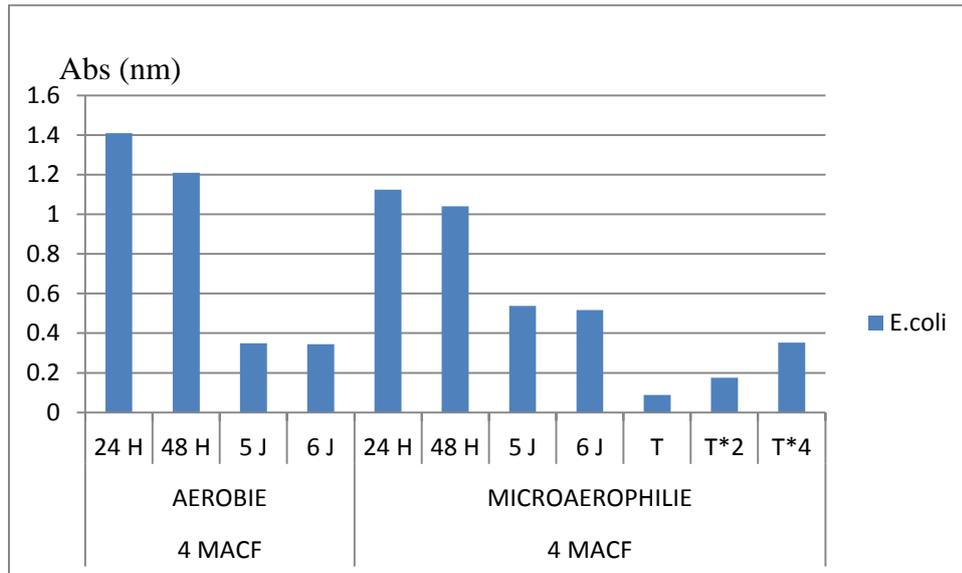


Figure 16: Résultats des tests d’adhésion et de formation de biofilm d’*E.coli* (solution à 4McF).

5.3. Biofilm multi espèces : solutions à 1 McF

- **Les associations de souches de *L.monocytogenes***

- a. **incubation en aérobiose**

Après 24h de culture, un faible têt d’adhésion a été observé suivi d’une forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d’incubation.

- b. **incubation en microaérophilie**

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d’une forte production de biofilm à 4j et 5j et 6j d’incubation.

Ces résultats montrent qu’en aérobiose, il y a eu un ralentissement dans le processus d’adhésion. Ce ralentissement a été rattrapé par la suite par une forte production de biofilm. Cela nous pousse à penser que les bactéries en eu besoins d’un temps d’adaptation pour adhérer sur la surface. Ce comportement est peut être dû à une différence des souches de *L. monocytogenes* qui était présent au sein du biofilm : facteur séroroupe.

Kalmokoff et al. (2001) et **Kadam et al., (2013)** ont montré que sous certaines conditions, la capacité des *L. monocytogenes* à adhérer aux surfaces pouvait être liée au facteur séroroupe avec une grande capacité des *L. monocytogenes* appartenant au serogroupe IIa à former des biofilm par rapport à celles appartenant au serogroupe IIb. Dans le cas de la présence des deux sérogroupes au sein du même biofilm, des phénomènes de ralentissement peuvent être observées.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les souches de *L. monocytogenes* testées ont eu le même comportement à 1 McF et à 4 McF avec une croissance meilleure à 4 McF (la présence des bactéries en grand nombre à favoriser la formation des biofilm).

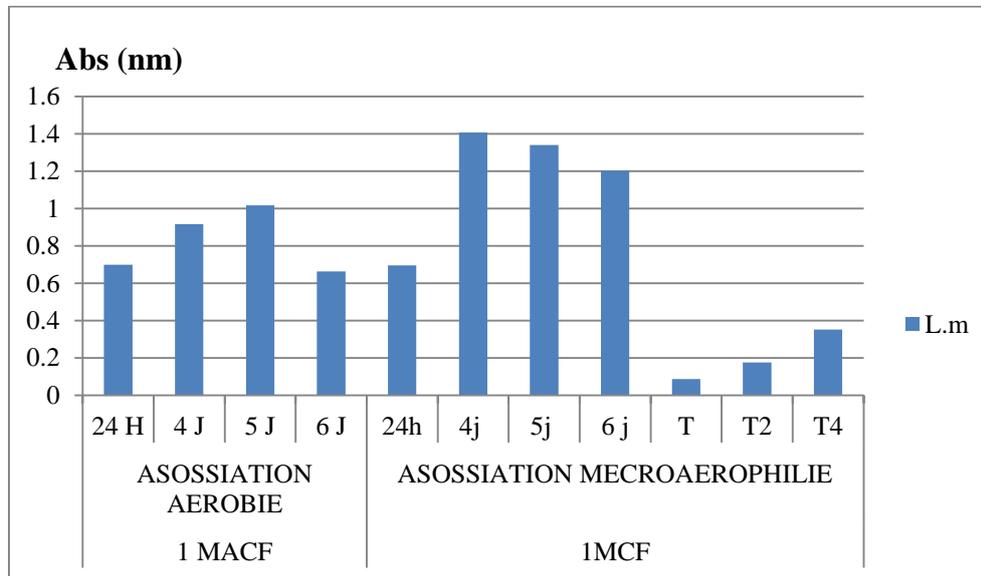


Figure 17: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* (solution à 1McF).

- **L'association *E. coli*+*L. monocytogenes***

- a. incubation en aérobiose :**

Après 24h de culture, l'adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

- b. incubation en microaérophilie :**

Après 24h de culture, une adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

Ces résultats montrent qu'il y a eu un effet de synergie entre les deux espèces. Les biofilms formés par *E. coli* seule avaient tendance à devenir moyens à 5j et 6j. Avec la présence de *L. monocytogenes*, l'indice de formation des biofilms a été maintenu durant toute la période d'incubation.

La capacité des souches de *L. monocytogenes* à se développer au sein d'un biofilm multi-espèce a été rapportée par **Buchanan et al. (2017)**. La capacité des souches d'*E. coli* à former des biofilms multi-espèces a été, quant à elle, rapportée par **Giaouris et al. en 2013** ainsi que par **Larsen et al. en 2014**. Ils ont décrit l'effet de synergie entre différentes

PARTIE EXPERIMENTALE

souches bactériennes composant un biofilm multi espèce parmi les quelles *L. monocytogenes* et *E. coli*.

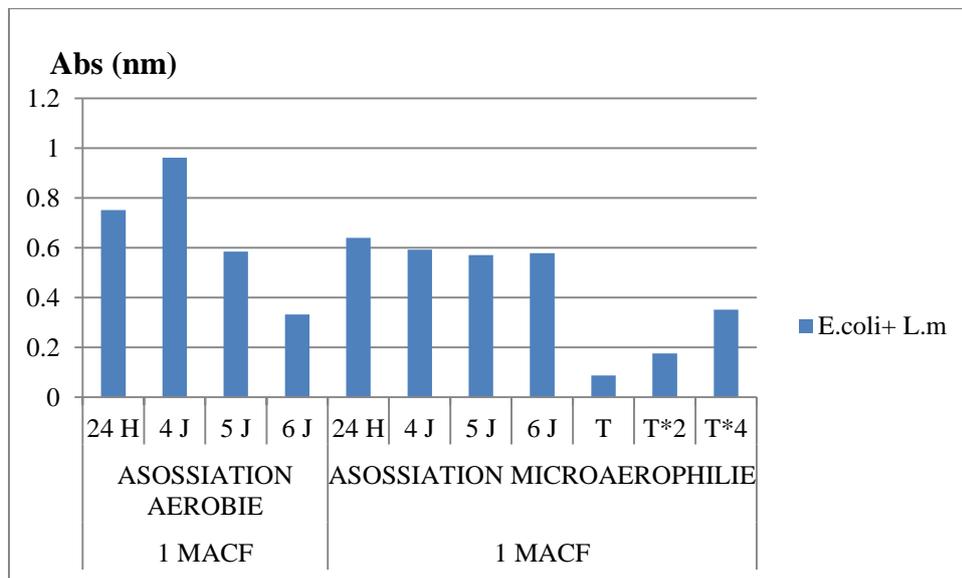


Figure 18 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm de *L. monocytogenes* +*E. coli* (solution à 1McF).

- **L'association *E. coli*+*L. innocua*,**

- a. incubation en aérobiose :**

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d'une moyenne production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

- b. L'association *E. coli*+*L.i*, incubation en microaérophilie :**

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 4j qui devient moyenne à 5j et 6j. Ces résultats montrent que les espèces testées se comportent pratiquement de la même manière qu'au sein d'un biofilm mono espèce. La croissance du biofilm en aérobiose a été probablement ralentie par la présence d'*E. coli*. En anaérobiose, il n'y a pas eu de différence avec les résultats obtenus pour les biofilm mono espèce.

Nous remarquons que l'association *E. coli* + *L. monocytogenes* a conduit à une formation plus importante de biofilms par rapport à l'association *E. coli*+ *L.innocua*.

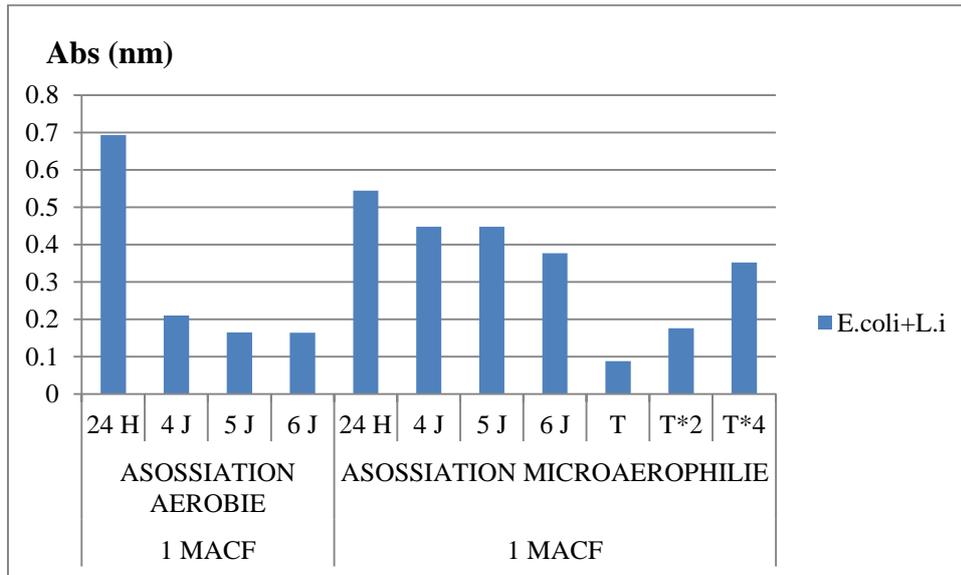


Figure 19: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E.coli+L. innocua* (solution à 1McF).

- **L'associations *E. coli+L. monocytogenes +L. innocua*,**

- a. incubation en aérobiose :**

Après 24h de culture, une très forte adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

- b. incubation en microaérophilie :**

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

Les résultats montrent que cette association a favorisé la croissance du biofilm en aérobiose et en micro aérophile. En comparant les résultats obtenus lors de cette association avec ceux de l'association *L. monocytogenes + E. coli* et *L.innocua + E. coli* , nous remarquons que la présence de *L. monocytogenes* au sein de l'association favorise une forte formation de biofilm qui se maintien durant toute la période d'incubation.

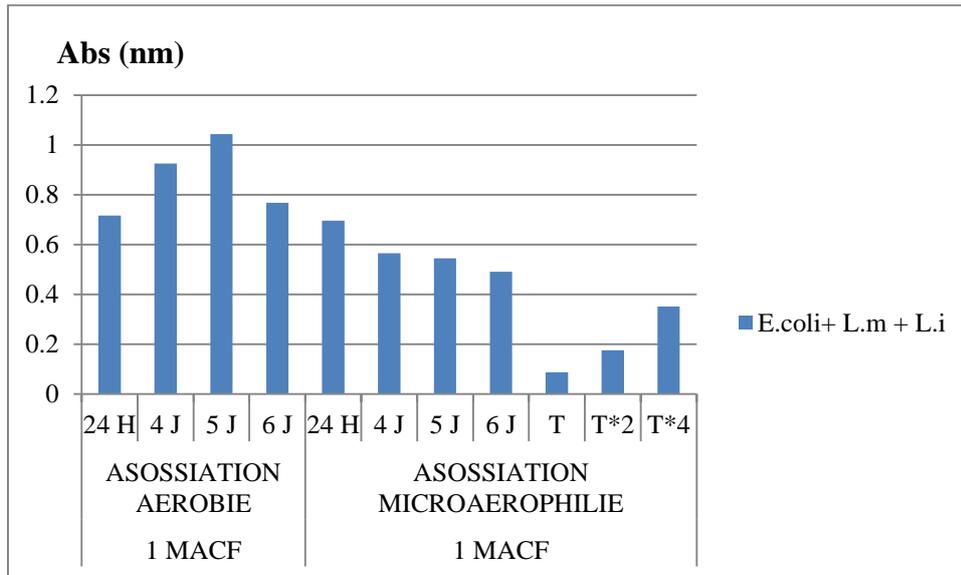


Figure 20 : Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm d'*E. coli*+*L. innocua* +*L. monocytogenes* (solution à 1McF).

- **L'association *L. monocytogenes* +*L. innocua*,**

- a. incubation en aérobiose :**

Après 24h de culture, une très forte adhésion a été observée suivi d'une très forte production de biofilm à 4j, 5j et à 6j d'incubation.

- b. incubation en microaérophilie :**

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d'une très forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

Nous remarquons un léger ralentissement dans le processus d'adhésion à 24 h qui a conduit par la suite à une forte production de biofilm. Cela est probablement causé par la présence de *L. innocua* qui s'est comporté en microaérophilie de la même manière que lors de sa présence au sein d'un biofilm mono espèce.

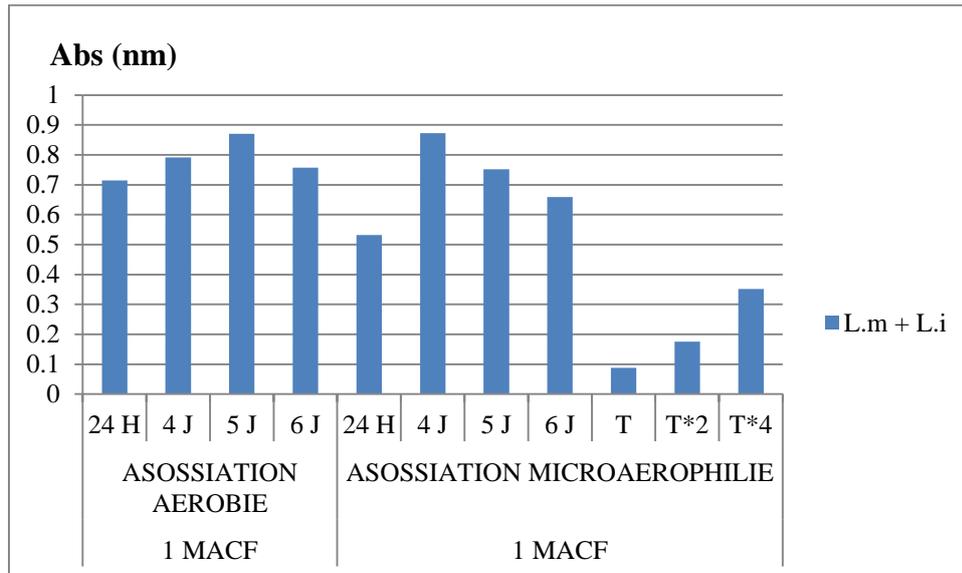


Figure 21: Résultats des tests d’adhésion et de formation de biofilm *L. monocytogenes* + *L. innocua* (solution à 1McF).

5.4. Les associations d’espèces : solution à 4 McF :

- **L’association *E. coli*+*L. innocua***

- a. incubation en aérobiose :**

Après 24h de culture, une forte adhésion a été observée suivi d’une forte production de biofilm à 4j. Celle-ci devient moyenne à 5j et 6j d’incubation.

- b. incubation en microaérophilie :**

Après 24h de culture, une très forte adhésion a été observée suivi d’une très forte production de biofilm à 4j, 5j et à 6j d’incubation.

Nous remarquons que les bactéries se sont comporter de la même manière que lors de leur présence dans le biofilm mono espèce.

En aérobiose, la production de biofilm est devenue moyenne à 5j et 6j. Cela est probablement dû à la présence d’ *E. coli* qui a causé la diminution de l’indice de formation du biofilm.

En micro aérophilie, le développement était très important, cela est probablement du d’une part à la charge bactérienne initiale élevée (4 McF) et d’autre part, à la présence simultanée de deux espèces fortement productrice de biofilm (dans ces conditions).

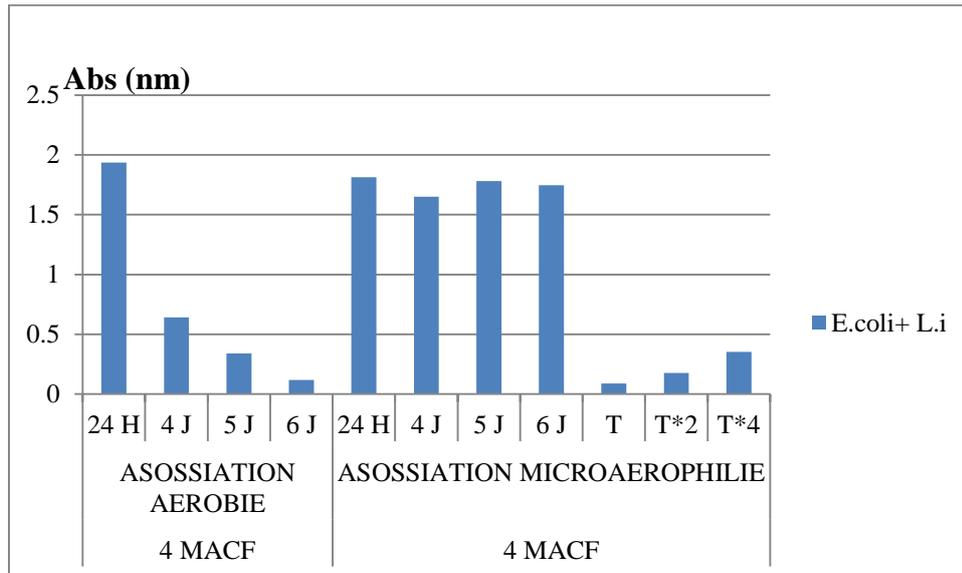


Figure 22: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm

E. coli+*L. innocua* (solution à 4McF).

- **L'association *E. coli*+*L. monocytogenes***

- a. incubation en aérobiose :**

Après 24h de culture, une très forte adhésion a été observée suivi d'une forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation. L'indice de formation de biofilm a tendance à baissé au fil du temps tout en restant à des valeurs qualifiants la production de biofilm de forte.

- b. incubation en microaérophilie :**

Après 24h de culture, une très forte adhésion a été observée suivi d'une très forte production de biofilm à 4j et à 5j et 6j d'incubation.

Nous remarquons que les espèces bactériennes se sont comportées de la même manière que lors de leur présence dans un biofilm mono espèce. En aérobiose, l'indice de formation de biofilm était élevé, cela est probablement dû à la charge initiale mise en contact avec la surface. Cet indice baissait avec le temps, cela est peut-être dû au faite que les souches bactériennes seules à 4McF avaient donné une moyenne production de biofilm à 5 j et à 6j.

En micro aérophilie, le développement était très important, cela est probablement du d'une part à la charge bactérienne initiale élevée et aussi, à la présence simultanée de deux espèces fortement productrice de biofilm (dans ces conditions).

PARTIE EXPERIMENTALE

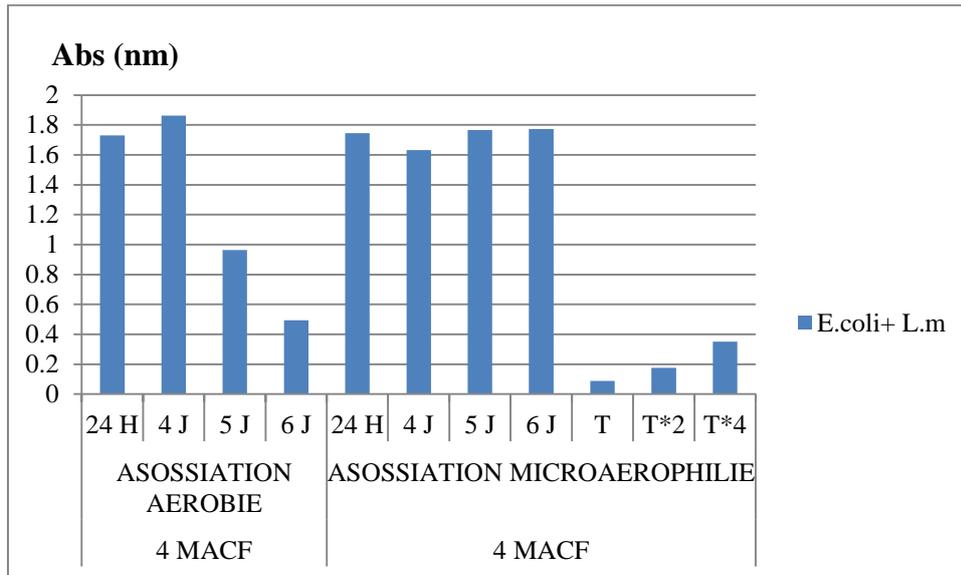


Figure 23: Résultats des tests d'adhésion et de formation de biofilm *E. coli*+ *L. monocytogenes* (solution à 4McF).

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 biofilm sur les surfaces des établissements agroalimentaire pose de réels problèmes car elle cause la persistance des bactéries dans l'environnement ; aussi, elle peut être à l'origine d'une contamination croisée des denrées alimentaires.

L'étude de la contamination des surfaces et un des moyens permettant l'évaluation de la persistance des bactéries dans les structures fabriquant ou traitant les denrées alimentaires.

Les résultats de notre étude ont révélés que les surfaces prélevées étaient contaminée par les trois espèces recherchées : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* et *E. coli*.

Ces bactéries persistaient sur les surfaces après les opérations de nettoyage et désinfection témoignant de leur inefficacité. Leur isolement, identification et la confirmation ont été réalisés dans le but de tester leur capacité à adhérer et à former des biofilms sur un support en plastique.

Les tests d'adhésion et formation de biofilm ont révélé que les trois espèces pouvaient adhérer et former des biofilms sur du plastique. Les indices de formation de biofilm variaient selon les conditions : espèce bactérienne formant le biofilm, l'aérobiose, l'anaérobiose, la charge bactérienne et la présence simultanée de plusieurs espèces au sein du biofilm.

L'espèce *L. monocytogenes* a montré particulièrement une grande capacité à former des biofilm sous les différentes conditions. Sa présence au sein d'un biofilm multi espèce favorisait sa formation.

L. innocua et *E. coli* ont montré une capacité grande à moyenne à former des biofilm. Leur présence au sein des biofilms multi espèces diminuait sous certaines conditions l'indice de formation des biofilm.

Perspectives

- Refaire les expériences que nous avons réalisé en augmentant le nombre d'essais
- Etudier l'influence de d'autres paramètres tel que la température et le renouvellement du milieu de culture.
- Réaliser des testes d'adhésion sur d'autres types de surfaces tel que l'inox.
- Réaliser un typage des bactéries testées et rechercher les facteurs intervenants dans la formation des biofilm.

Références bibliographiques

- **Afreenish Hassan, Javaid Usman, Fatima Kaleem, Maria Omair, Ali Khalid, Muhammad Iqbal.** (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*; **15**(4):305-311
- **Allerberger F, Wagner M., Schweiger P, Rammer Hp, Resch A, Dierich Mp.** (2001). *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill*.
- **Alonso AN, Perry KJ, Regeimbal JM, 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.
- **Ana Eliza Zeraik and Marcia Nitschke.** (2012). Influence of Growth Media and Temperature on Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. *An international journal*. Vol **55**, n° 4, pages 569-576.
- **Andres Rodriguez, Wesley R. Autio, 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.
- **Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L.** (2009). Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they dol, *Journal of Food Science*, Vol. **74** No. 1, pp. 24–37.
- **Anses.** (2011). *Listeria monocytogenes* : Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments. <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC2011sa0171Fi.pdf>.
- **Avril J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H.** (2000). *Bactériologie clinique*, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition. p171-211.
- **Baranyi J, Roberts Ta.** (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* ; **26** :199-218.
- **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.
- **Behlau, I. et Gilmore, M. S.** (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* **126**, 1572-1581.
- **Beloin, C., Roux, A. et Ghigo, J. M.** (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**, 249-289.

Références bibliographiques

- **Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., 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.
- **Bergey's Manual of systematic Bacteriology.** (2001). 2^{ème} Edition .vol **1**.
- **Bergey's manual.** (2012).
- **Bielaszewska M, Janda J, Blahova K, Minarikova H, Jikova E, Karmali Ma.** (1997). Human *Esherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect* **119**: 299-305.
- **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 Leila , Hamdi Taha M. , Naim Malek , Leclercq Alexandre , and Lecuit Marc.** (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., Leroyer R.** (2003). Anti-infective coated central venous catheters : technical aspects and clinical studies. *J. Pharm. Clinique* , , **22** (3), 159-167.
- **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-Poincare- Nancy I. 275p.
- **Brauge T., Sadovskaia I., Faille C., Benezech T., Maes E., Guerardel Y., 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.
- **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.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2501014&dopt=Citation>

Références bibliographiques

- **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. <<http://www.fems-microbiology.org/website/nl/default.asp>>.

- **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.

- **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.

- **Characklis WG, Marshall K.C.** (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

- **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.

- **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

- **CristianCarip.** (2008). Microbiologie hygiène-bases microbiologiques de la diététique. page 79.

- **De Chalvet De Rochemonteix A.** (2009). Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.

- **Djenane D., Martinez L., Sanchez A., Montanes L., Blanco D., Yanguela J., Beltran J.A., 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 Sci. Technol. Int., (in press).

Références bibliographiques

- **Dong Kwan Jeong and Joseph F. Frank.** (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in Biofilms with Microorganisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. *Journal of Food Protection*, Vol. **57**, No.7. Pages 576-586
- **Donlan RM.** (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal*. **8** (9): 881-890.
- **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.
- **Dupont GA.** (1997). Understanding dental plaque; biofilm dynamics. *Journal of Veterinary Dentistry*. Vol **14**, n°3. Pages 91-94.
- **E.C.R.Bonsaglia, N.C.C. Silva, Fernades Júnior, J.P.Araújo Júnior, M.H.Tsunemi, V.L.M. Ralla.** (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures, *Food Control*, vol **35**, pages 386-391.
- **NF EN 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.** (Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives)
- **NF ISO 4832.** (2006). Microbiologie des aliments-Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies.
- **Efstathios Giaouris, Even Heir, Michel Hébraud, Nikos Chorianopoulos, Solveig Langsrud, Trond Møretrø, Olivier Habimana , Mickaël Desvaux, Sandra Renier, George-John Nychas.** (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* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>. Pages 298-309.
- **Efstathios Giaouris, Even Heir, Mickaël Desvaux, Michel Hébraud, Trond Møretrø, Solveig Langsrud, Agapi Doulgeraki, George-John Nychas, Miroslava Kačániová, Katarzyna Czaczyk, Hülya Ölmez and Manuel Simões.** (2015). Intra- and inter-species

Références bibliographiques

interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens: underlying mechanisms and impact. *Frontiers in Microbial Physiology and Metabolism*.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>

- **Euzèby J.P., Tindall B.J.** (2004). Valid publications of new names or new combinations: making use of the Validation Lists. *ASM News*, **70**, 258-259.

- **Extremina, C. I., Costa, L., Aguiar, A. I., Peixe, L. & Fonseca, A. P.** (2011). Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods* **84**, 167-173.

- **Fabien S.** (2017). Analyses en microbiologie- environnement microbien (air, surfaces,eau); v2, P3355.

- **Fernanda Barbosa dos Reis-Teixeira, Virgínia Farias Alves, Elaine Cristina Pereira de Martinis.** (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol **48**. Pages 587–591.

- **FLAUDROIS JP.** (2004). Bactério Génè /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.

- **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

- **Franciosa G., Maugliani A., Scalfaro C., Floridi F., Aureli P.** (2000). Expression de la formation interne et biofilm parmi les isolats cliniques de *Listeria monocytogenes* . *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **22** : 183-193.

- **Gilles Robitaille, Sébastien Choinière, Timothy Ells, Louise Deschènes, and Akier Assanta Mafu.** (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.

Références bibliographiques

- **Glaser, P., Frangeul, L., Buchreiser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P. et autres auteurs.** (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849–852.

- **Goller C.C, Romeo T.** (2008). Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **322**: 37- 66

- **Gordon D. Christensen, W. Andrew Simpson, Janara J. Younger, Larry M. Baddour, Fred F. Barrett, Dennis M. Melton, AND Edwin H. Beachey.** (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

- **Govindaraj Dev Kumar, Sadhana Ravishankar, Jitendra Patel.** (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

- **Greathouse J .S., 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.

- **Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M. K., Scotti, 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.

- **Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., 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.

- **Harmsen M., Lappann M., Knochel S., 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. doi: 10.1128 / AEM.02361-09.

- **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.

Références bibliographiques

- **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. et Ala'Aldeen, D.** (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- **Høiby, 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
- **Honraet, K., Goetghebeur, E. & 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.
- **Hye Ri Jeon, Mi Jin KWON, and Ki Sun Yoon.** (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
- **Isabel C. Blackman and Joseph F. Frank.** (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. *Journal of Food Protection*, Vol **59**, No.8. Pages 827-831.
- **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.
<https://www.iso.org/fr/standard/39849.html>.
- **Jackson SG, Goodbrand RB, Johnson RP, Odorico VG, Alves D, Rahn K., ET AL.** (1998). *Escherichia coli* O157 :H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm. *Epidemiol Infect*; **120**: 17-20.
- **Jacobsen, S.M., Stickler, D.J. Mobley, M.L. & Shitliff, M.E.** (2008). Complicated Catheter-associated urinary tract infectious 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 Interfacell, *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85
- **Jay, James M., Loessner, Martin J., Golden, David A.** *Modern Food Microbiology*. Springer Science+Business Media. Inc. The 7th edition. 790 pages.
- **Jemmi, T., and Stephan, R.** (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Review Science Magazine*. Volume **25**. p. 571-80.

Références bibliographiques

- **Jin, Y., Samaranayake, L. P., Samaranayake, Y. et Yip, H. K.** (2004). Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* **49**, 789- 798.
- **Jingjin Wang, Andrea J. Ray, Susan R. Hammons and Haley F.** (1997). Oliver. 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.
- **Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Lye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S. et autres auteurs.** (2004). Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl Env Microbiol* **70**, 4256–4266.
- **Joseph F. Frank, Revis A. N. Gillett, and Glenn O. Ware.** 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.
- **Joshi, P., Wadhvani, 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.
- **Kaiser.** (1998). WWW. Bhphotovideo.com.
- **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
- **Katherine P. Lemon, Darren E. Higgins, and Roberto Kolter.** (2007). Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation *journal of bacteriology*, June p. 4418-4424 Vol. **189**, 2007.
- **Larpent J.P.** (2004). *Listeria*. Tec et Doc, 3ème éd., Lavoisier. Paris.
- **Laura Beatriz Rodrigues; Luciana Ruschel dos Santos ; Vinícius Zancanaro Tagliari ; Natalie Nadin Rizzo ; Graciela Trenhago ; Amauri Picollo de Oliveira ; Franciane Goetz ; Vladimir Pinheiro do Nascimento.** Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiologie*. Vol **41** n° 4. Pages 1082-1085.
- **Le minor L, Buttiaux R, Gaudier B, Le minor S, et Nicollep.** (1954). Epidemiologic research on gastroenteritis due to *Escherichia coli* in a Hospital in Northern France.

Références bibliographiques

- Levine M.** (1988). *Escherichia coli* that cause diarrhea: entérotoxigenic, entéroinvasive, entérohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*; **155** : 377-389.
- **LUNDE ÅN J.** (2004). Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Processing Plants, Helsinki, Yliopistopaino.
- **Kalmokoff, J.W. Austin, X.-D. Wan, G. Sanders, S. Banerjee and J.M. Farber.** (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, Vol **91**, pages 725–734.
- **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.
- **Mainil, J. G.** (2000). Le point des connaissances sur les entérites à *Escherichia coli* chez le veau. *Ann. Méd. Vét* **144**:121-136.
- **Marianne Halberg Larsen, Marion Dalmasso, Hanne Ingmer, Solveig Langsrud, Mindaugas Malakauskas, Annelise Mader, Trond Møretrø, Sonja Smole Mozina, Kathrin Rychli, Martin Wagner, R. John Wallace, Jurgen Zentek, Kieran Jordan.** (2014). Persistence of food borne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*. Vol **44**. Pages 92-109.
- **Maricarmen Iniguez-Moreno, Melesio Gutiérrez-Lomelí.** (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.
- **Martinez LR, Casadevall A.** (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*. 4592- 4601
- **Moltz, A. G., & Martin, S. E.** (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions *Journal of Food Protection*, **68**(1), 92-97.

Références bibliographiques

- **Monica K. Borucki, Jason D. Peppin, David White, Frank Loge, and Douglas R. Call.** (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. Applied and environmental microbiology. Pages 7336–7342 Vol **69**, No. 12.
- **Montet M.** (2009). Contamination des aliments par *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (stec) en France, et importance de l'acide-résistance de la souche. This ecole pratique des hautes etude. p72.
- **Moreno,L.Z.,Paixa ˆo, 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.
- **Mudsser Azam, Arif Tasleem Jan, Ashutosh Kumar, Kehkashan Siddiqui, Aftab Hossain Mondal , Qazi Mohd. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.001>.
- **Myriam Auger.** (2012). Formation de biofilm in vitro par des souches d'*Escherichia coli* : impacts de la modification des conditions expérimentales. 90 pages.
- **Naito M¹, Frirdich E, Fields JA, Pryjma M, Li J, Cameron A, Gilbert M, Thompson SA, Gaynor EC.** (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 J. B. Kaper.** (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201.
- **O'Toole G. A., Kaplan HB., 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.
- **Paton AW,Srimanote P,Woodrow MC, Paton JC.** (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans.infect Immun, **69** :69997009.

Références bibliographiques

- **Peeters E, Hans J. Nelis, Tom Coenye.** (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Microbiological Methods*. **72**: 157–165.
- **Peeters, E., Nelis, H. J. et Coenye, T.** (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**, 157- 165.
- **Pettit, R. K., Weber, C. A., Kean, M. J., Hoffmann, H., Pettit, G. R., Tan, R., Franks, K. S. et Horton, M. L.** (2005). Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2612-2617.
- **Pratt, L. A et 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 et 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.
- **Punithavathy, P. M., Nalina, K. et Menon, T.** (2012). Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J Pathol Microbiol* **55**, 72-74.
- **R.A.N. Chmielewski and J.F. Frank.** (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities comprehensive reviews in food science and food safety Vol. **2**, p 22-32.
- **Ran Han, Yaa Asantewaa, Kafui Klu Jinru Chen.** Attachment and Biofilm Formation by Selected Strains of *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of Fresh Produce Origin. *Journal of Food Science*. Vol **82**, issue 6. Pages 1461-1466.
- **Robert L. Buchanan , Leon G.M. Gorris , Melinda M. Hayman, Timothy C. Jackson, Richard C. Whiting.** (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.
- **Rocourt J.** (1999). Rapport d'activités du centre national de référence des *Listeria*, Institut Pasteur de Paris.
- **Rocourt J., 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.
- Rocourt, J, 1998. The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods. *Turk. J. Infection*. **2** (4) : 471 – 485.

Références bibliographiques

- **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
- **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.
- **Sachin R.Kadam, Heidy M.W.den Besten, Stijnvan der Veen, Marcel H.Zwietering, Roy Moezelaar, Tjakko Abee.** (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Microbiologie*. Vol **165**, Issue 3. Pages 259-264.
- **Sandrine Parot.** (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. L'institut National Polytechnique de Toulouse. 247 pages.
- **Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agno, M., Phillips, A. D. & Nataro, J. P.** (2001). Roles for Fis and Yafk in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**, 983- 997.
- **Spormann AM.** (2008). Physiology of microbes in biofilms stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*.5208- 5218.
- **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.
- **Steven L, Percival James T, Walker Paul Hunter.** (2000). Microbiological Aspects of Bifilms and Drinking water. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. p61.
- **Steven L, Percival James T, Walker Paul R.** (2000). Microbiological Aspects of Bifilms and Drinking water. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. p 164-168.
- **Stewart et al.** (2015). Plos Biology February.

Références bibliographiques

- **Sugiyama A, Iwade Y, Akachi S, Nakano Y, Matsuno Y, Yano T, et AL.** (2005). An outbreak of Shigatoxin – producing *Escherichia coli* O157:H7 in a nursery school in Mie Prefecture. *Jpn J Infect Dis* ; **58** :398-400.
- **Survillane E.** Surveillance des infections à *E. coli* entérohémorragiques(EHEC) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. DVG Commission des communautés européennes.
- **Talaro, Kathleen, Park.** (2008). *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGrawHill, New York.
- **Tenke, P. Kovacs, B., Jackel, M et Nagy, E.** (2006). The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* **24**, 13-20.
- Tereza Chylkova, Myrna Cadena, Aura Ferreira, and Maurice Pitesky. (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.
- **Thorene G.** (1994). Humoral immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* ; p43.
- **Tony Romeo.** (2008). *Current Topics in Microbiology and Immunology : Bacterial Biofilms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Volume **322**. 293 pages.
- Tote, K., Vanden Berghe, D., Maes, L. et Cos, P, 2008. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol* **46**, 249-254.
- **Van Houdt, R. et Michiels, C. W.** (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* **156**, 626-633.
- **Vernozy-rozand C, Montet MP, 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.
- **Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P.** (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules*, Vol. **14** No. 7, pp. 2535-2554.
- **Wirtanen G.** (1995). *Biofilm Formation and its Elimination from Food Processing Equipment*, VTT Publications 251, Espoo, VTT Offsetpaino.

Références bibliographiques

- **Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H.** (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* **78**:110-116.
- **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.
- **Zaika L.L., 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.
- **Zottola, E.A. et Sasahara, K.C.** (1994). Microbial Biofilms in the Food Processing Industry: Should They Be a Concern. *International Journal of Food Microbiology*, **23**, 125-148.

Annexe I

Composition des milieux de culture :

➤ **Gélose chromID™ Coli (COLI ID-F)**

- Peptone de gélatine (bovine ou porcine) (7 g)

-Extrait de levure (3 g)

-Chlorure de sodium (5g)

-Sels biliaires (bovin ou ovin) (1,5 g)

-Mélange des activateurs (0,3 g)

-Mélange chromogène (0,3 g)

-Agar (15 g)

-Eau purifiée (1 L)

-pH 7,2

➤ **ALOA®:**

-Digestat enzymatique de tissu animal (18,00 g)

-Digestat enzymatique de caséine (6,00 g)

-Extrait de levure (10,00 g)

-Pyruvate de sodium (2,00 g)

-Glucose (2,00 g)

-Glycérophosphate de magnésium (1,00 g)

-Sulfate de magnésium (0,50 g)

-Chlorure de sodium (5,00 g)

-Chlorure de Lithium (10,00 g)

-Hydrogenophosphate disodique anhydre (2,50 g)

-X-glucoside (0,05g)

-Agar (13,50g)

-Eau purifiée (1000 mL)

-Acide nalidixique P(a)P (0,02 g)

-Ceftazidime P(a)P (0,02 g)

-Polymyxine B P(a)P (76700 U)

-Amphotéricine B P(a)P (0,01 g)

-Phosphatidylinositol P(b)P (2,00 g)

➤ **BTS 3P irradié peptones Végétales (MFTVNC-D)**

-Peptones végétales (20 g)

-Chlorure de sodium (5 g)

-Phosphate bipotassique (2,5g)

-Glucose (2,5 g)

-Eau purifiée (1 L)

-pH 7,3

➤ **T.S.A (géllose)**

-Hydrolysate enzymatique de caséine (15,0 g/L)

-Peptone de soja (5,0g/L)

-Chlorure de sodium (5,0g/L)

-Agar A (12,0g/L)

-PH: 7, 3 ± 0, 2

Annexe II

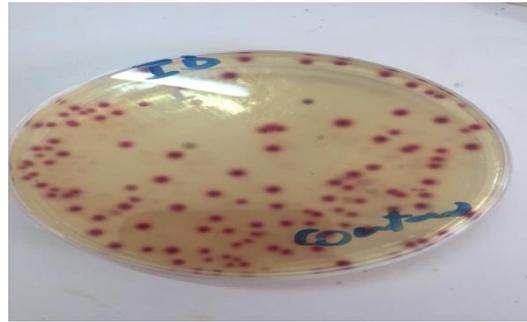
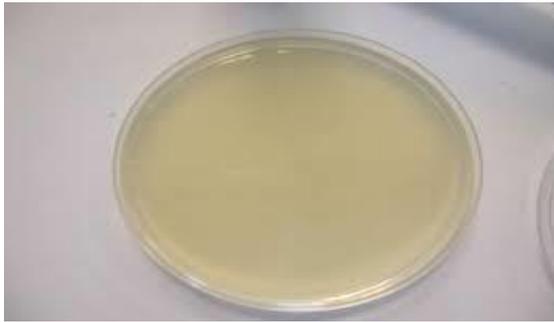


Figure 26 : Gélose chromID™ avant l'incubation. **Figure 27 :** *E coli* après l'incubation à 37°C Pd 24h sur le milieu chromID™ Coli (COLI ID-F).

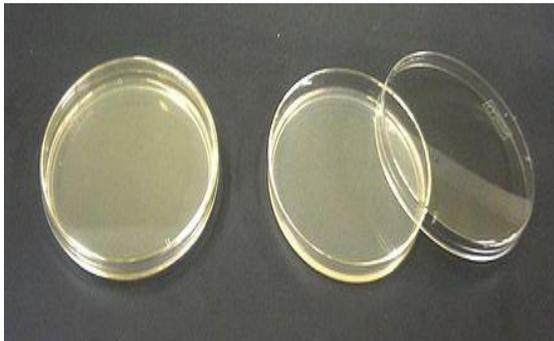


Figure 28 : Milieu ALOA® avant l'incubation. **Figure 29 :** *Listeria* après l'incubation à 37°C Pd 24h sur le milieu ALOA®.



Figure 30 : Milieu TSA après l'incubation à 37C Pd 24h (tapi jaune).



Milieu TSB avant incubation



Milieu TSB après incubation à 37°C Pd 24h

Figure 31 : Développement et aspects de *E. coli*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* sur différents milieux de culture.

Annexe III



Figure 32 : Différents surfaces de prélèvements des échantillons (photos personnelles).



Figure 33: les cuves des souches en aérobiose et en microaérophilie à 1 et 4 McF.

Annexe IV

Les appareille utilisés :



Figure 34 : Photos d'autoclave.



Figure 35 : Photos d'étuve.



Figure 36 : Photos de la balance.



Figure 37 : Photos de bain marin.

Résumé

Résumé:

Le but de cette étude est d'évaluer la contamination des surfaces d'un abattoir de viande rouge par *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* ; par un isolement et une identification de ces espèces et étudier leur capacité à former des biofilms sur un support en plastique sous différentes conditions (aérobiose, microaérophilie, charge bactérienne et espèces composant le biofilm).

Cette étude a mis en évidence la présence des espèces recherchées sur toutes les surfaces prélevées.

L'étude de la capacité des souches à former des biofilm a révélé que toutes les souches et associations de souches sont capables de produire des biofilm sur le support en plastique. L'indice de formation des biofilms change selon les différentes conditions testées.

Mot-clé: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, contamination des surfaces, biofilm.

Abstract:

This study was performed to the red meat slaughterhouse surfaces contamination by *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*; and species isolation and identification and to study their capacity to form biofilm on a plastic support under different conditions (aerobic, microaerophilic, bacterial load and species composing the biofilm).

This study highlighted the presence of the species sought on all the surfaces sampled.

The strains ability study to form biofilm revealed that all strains and strains associations are able to produce biofilm on the plastic support. The formation index of biofilms changes according to the different conditions tested.

Keyword: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *listeria innocua*, surface contamination, biofilm.

ملخص:

الغرض من هذه الدراسة هو تقدير تلوث أسطح مسلخ للحوم الحمراء ب: *E. coli* و *Listeria monocytogenes* و *Listeria innocua*.

لعزل والتعرف على هذه الأنواع ودراسة قدرتها على تشكيل بيوفيلم على مادة البلاستيك في ظل ظروف مختلفة: كمية عادية من الهواء، كمية قليلة من الهواء، كمية البكتيريا الموضوعة فوق السطح البلاستيكي وأنواع البكتيريا التي تشكل البيوفيلم.

أثبتت هذه الدراسة على وجود الأنواع التي كان المراد البحث عنها على جميع الأسطح المدروسة كما كشفت أيضا على قدرة السلالات على تشكيل بيوفيلم مع جميع السلالات منفردة أو مختلفة. القدرة على إنتاج البيوفيلم كانت تتغير بتغير الظروف التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: تلوث الأسطح، بيوفيلم، *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*.