



HAL
open science

Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens

Audrey Allion

► To cite this version:

Audrey Allion. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Sciences du Vivant [q-bio]. ENSIA (AgroParisTech), 2004. Français. NNT : 2004EIAA0140 . pastel-00003703

HAL Id: pastel-00003703

<https://pastel.hal.science/pastel-00003703>

Submitted on 2 Jun 2008

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

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

N° d'ordre

Ecole Nationale Supérieure
des Industries Agricoles et
Alimentaires

Année 2004

**Ecole Doctorale
Agriculture Biologie et Santé**

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

**Docteur de l'ENSIA
Spécialité : Sciences Alimentaires**

Soutenue publiquement par

Audrey ALLION

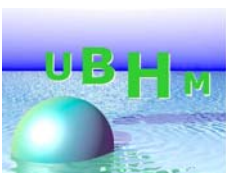
Le 1^{er} juin 2004

ENVIRONNEMENT DES BACTERIES ET SENSIBILITE AUX BIOCIDES

- Mise au point d'une technique rapide pour déterminer *in situ* l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens -

JURY :

Rapporteurs	Madame N. Orange Monsieur J.C. Darbord
Examineurs	Madame M.-N. Bellon-Fontaine Madame L. Boulangé-Petermann Monsieur P. Giampaoli Monsieur J. Criquelion



Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Directeur de Recherche à l'Unité de Recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (UBHM) de l'INRA de Massy, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné dans cette collaboration ainsi que pour ses compétences scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je remercie également très sincèrement Madame Nicole Orange, Professeur à l'Université d'Evreux et Monsieur Jacques Darbord, Professeur à l'Université Paris 5 pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs.

J'adresse également mes sincères remerciements à Madame Laurence Boulangé et Monsieur Pierre Giampaoli d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Messieurs Bertrand et Thierry Letartre d'avoir encouragé et soutenu ce projet, et de m'avoir accueillie au sein de leur entreprise.

Mes plus vifs remerciements vont également à Madame Françoise Durand pour son soutien en microbiologie, à Monsieur Gaëtan Rauwel pour son aide en chimie et à Monsieur Jacques Criquelion pour ses précieux conseils et nos réunions toujours fructueuses.

Je ne saurais oublier toute l'équipe de l'UBHM. Toute ma reconnaissance va à Madame Josette Rault et Mademoiselle Margareth Renault pour leur compagnie dans le bureau pendant ces années de thèse. Merci pour leur aide si précieuse, leur gentillesse, leur bonne humeur et leur patience, notamment dans la relecture assidue de ce manuscrit.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Romain Briandet pour sa disponibilité et sa compagnie toujours très agréable, à Monsieur Thierry Meylheuc pour m'avoir fait partagé son expérience de la désinfection et pour nos discussions toujours très enrichissantes, à Monsieur Jean-Marie Herry pour ses conseils en analyse d'images et en informatique et pour m'avoir initié à l'AFM. Que Mesdames Florence Dubois et Murielle Naïtali soient remerciées pour leur soutien, Madame Yvette Monfils pour son assistance technique et sa bonne humeur, Monsieur Gilles Gerlot pour sa disponibilité, Madame Francine Pépin pour sa gentillesse.

Merci à Marie-Céline, Youness, Armel, Angélique, Isabelle, Carine, Olivier et plus particulièrement à Abir Nazer pour leur solidarité dans le quotidien du thésard.

Je souhaite exprimer mon amitié à Natacha, Lionel, Sabrina, Suzane, Agnès, Peggy, Jean-Philippe, Mylène, Caroline, Sandrine, Hervé, Katherine, pour m'avoir écouté délirer pendant des heures sur mes travaux.

Un grand merci également à mes parents, à mon frère Romuald, à Karine et à Azélie, à mes beaux-parents, à Valérie et Christophe pour leurs encouragements affectueux pendant ces trois années.

Enfin, je dédie ces travaux à Laurent pour sa patience et sa compréhension permanentes pendant ces années de thèse qui m'ont permis de faire aboutir ce travail.

TABLE DES MATIERES

PRESENTATION GENERALE	12
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
LA DESINFECTION	16
I. DEFINITION	16
II. MODES D'ACTION DES DESINFECTANTS	16
II.1. Notion de désinfectant et d'antiseptique	16
II.2. Choix de l'agent antimicrobien	17
II.2.1. Réglementation	17
II.2.2. Activité bactéricide	18
II.2.3. Détermination de l'activité antibactérienne des désinfectants	18
II.2.3.1. Sur cellules planctoniques	18
II.2.3.2. Sur cellules fixées	19
II.3. Mécanisme d'action général	19
III. CLASSIFICATION DES PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS	22
III.1. Produits à action létale non spécifique	22
III.1.1. Oxydants	22
III.1.2. Halogènes et dérivés	23
III.1.3. Acides et bases	23
III.1.4. Alcools	23
III.1.5. Aldéhydes	24
III.2. Produits à action létale spécifique	24
III.2.1. Ammoniums quaternaires	24
III.2.2. Biguanides	26
III.2.3. Dérivés Phénoliques	28
IV. SENSIBILITE BACTERIENNE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS : NOTION DE RESISTANCE ET DE TOLERANCE	30
IV.1. Définition	30
IV.2. Résistance intrinsèque	30
IV.2.1. La paroi des bactéries à Gram positif	30
IV.2.2. La paroi des bactéries à Gram négatif	31
IV.3. Résistance acquise	32
IV.3.1. Résistance acquise chromosomique	32
IV.3.2. Résistance acquise plasmidique (ou extrachromosomique)	33
V. RESISTANCE LIEE A L'ETAT ADHERANT ET/ OU EN BIOFILM	34
V.1. Mécanisme général de l'adhésion	34
V.2. Interactions physico-chimiques non covalentes	36
V.2.1. Interactions électrostatiques	36

V.2.2. Interactions non-électrostatiques	38
V.2.2.1. Interactions de Lifshitz - van der Waals (LW)	38
V.2.2.2. Interactions Lewis acide-base (AB)	39
V.2.2.3. Interactions liées au mouvement Brownien(BR)	40
V.3. Evaluation de l'adhésion des micro-organismes aux surfaces	40
V.3.1. Dénombrement des cellules viables cultivables	41
V.3.2. Observation in situ	41
V.3.2.1. Flore totale	41
V.3.2.2. Différenciation entre cellules viables et cellules mortes	42
V.4. Facteurs susceptibles de modifier l'adhésion bactérienne	44
V.4.1. Caractéristiques des cellules bactériennes	44
V.4.2. Caractéristiques des supports solides	45
V.4.3. Caractéristiques des fluides environnants	46
V.4.4. Présence de matières interférentes	46
V.5. Adhésion et résistance aux agents antimicrobiens	47
V.5.1. Présence du glycocalyx	47
V.5.2. Etat physiologique des cellules adhérentes	48
V.5.3. Localisation au sein du biofilm	49
VI. CONCLUSION	50
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	51
I. SOUCHES BACTERIENNES	52
I.1. Souches testées	52
I.2. Conditions de conservation	53
I.3. Conditions de croissance	54
I.3.1. Croissance sur milieu solide (TSA)	54
I.3.2. Croissance en milieu liquide (TSB)	54
I.3.3. Préparation des suspensions bactériennes	54
I.4. Caractérisation physico-chimique de la surface des cellules bactériennes	54
I.4.1. La méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents)	54
I.4.2. Détermination de la charge de surface des bactéries par micro-électrophorèse	56
II. SUPPORTS SOLIDES	57
II.1. Supports testés	57
II.2. Préparation des échantillons solides	57
II.3. Caractérisation physico-chimique de la surface des supports solides	57
II.3.1. Energie de surface des supports solides	57
II.3.2. Caractérisation de la surface des matériaux inertes par microscopie de force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy)	59
III. CONDITIONNEMENT DES SUPPORTS SOLIDES	59
III.1. Liquides de suspension	60
III.2. Solutions conditionnantes	60

III.2.1. Solutions encrassantes (<i>Adaptées de la norme NF EN 1276, 1997</i>)	60
III.2.1.1. Solution protéique modèle	60
III.2.1.2. Souillure complexe	60
III.2.2. Principes actifs désinfectants	60
III.3. Protocole de conditionnement	61
IV. ADHESION DES MICRO-ORGANISMES AUX SUPPORTS SOLIDES	61
IV.1. Tests d'adhésion	61
IV.2. Dénombrement des cellules adhérentes	62
IV.2.1. Flore totale	62
IV.2.2. Flore viable cultivable	62
V. TESTS DE DESINFECTION SUR CELLULES PLANCTONIQUES	63
V.1. Agents antimicrobiens	63
V.2. Tests sur cellules planctoniques – application de la norme NF-EN 1040	63
V.2.1. Activité bactéricide des principes actifs	63
V.2.2. Témoin de non - toxicité et de neutralisation	64
VI. TESTS DE DESINFECTION SUR CELLULES ADHERENTES – MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE PERMETTANT D'EVALUER L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS	64
VI.1. Activité bactéricide des principes actifs	64
VI.2. Dénombrement des cellules viables cultivables	65
VI.3. Témoin de toxicité et de neutralisation	65
VII. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE RAPIDE PERMETTANT DE DETERMINER <i>IN SITU</i> L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS	66
VII.1. Mise au point de la coloration sur cellules planctoniques	66
VII.2. Témoin	67
VII.3. Test de désinfection sur cellules planctoniques	67
VII.4. Coloration des cellules adhérentes	67
VIII. ANALYSE STATISTIQUE	68
PARTIE III : RESULTATS – DISCUSSION	69
I. CONDITIONS DE CONSERVATION ET DE CROISSANCE DES SOUCHES BACTERIENNES	70
I.1. Impact sur les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes	70
I.1.1. Mobilité électrophorétique	70
I.1.2. Test MATS	73
I.2. Impact sur l'activité bactéricide des désinfectants	79
I.2.1. Test MATS	79
I.2.2. Activité antimicrobienne et détermination de la Concentration Minimale Bactéricide	82
I.2.2.1. Acide peracétique (APA)	82
I.2.2.2. Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA)	85
I.2.2.3. Poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB)	88
I.3. Conclusion	93
II. EVALUATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS SUR CELLULES ADHERENTES	94
II.1. Protocole d'adhésion microbienne aux surfaces	94

II.1.1. Caractérisation énergétique de la surface des supports solides	95
II.1.2. Adhésion bactérienne	96
II.1.2.1. Flore totale adhérente	97
II.1.2.2. Dénombrement des cellules viables cultivables	100
II.2. Désinfection des surfaces contaminées	103
II.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
II.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	104
II.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	106
II.3. Conclusion	110
III. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE RAPIDE PERMETTANT D'ÉVALUER <i>IN SITU</i> LA VIABILITE DES CELLULES ADHERENTES	111
III.1. Protocole de coloration des cellules bactériennes	111
III.1.1. Choix des fluorochromes	112
III.1.2. Mise en place du protocole	113
III.1.2.1. Coloration des micro-organismes	113
III.1.2.2. Essais sur cellules planctoniques	113
III.1.2.3. Coloration sur cellules adhérentes	116
III.2. Application à la désinfection des surfaces	117
III.3. Conclusion	123
IV. FILMS PRIMAIRES ET QUALITE DE L'EAU : IMPACT SUR LA BIOADHESION ET LA VIABILITE CELLULAIRE	124
IV.1. Détermination des caractérisation physico-chimiques de surface de l'acier conditionné ou non	124
IV.1.1. Conditionnement par un encrassement organique	125
IV.1.1.1. Influence de la qualité de l'eau	126
IV.1.1.2. Solution modèle : la SAB	126
IV.1.1.3. Solution complexe : le lait	127
IV.1.2. Adsorption des agents antimicrobiens	128
IV.2. Impact sur le comportement bioadhésif et la viabilité des micro-organismes adhérents	130
IV.2.1. Molécules encrassantes	130
IV.2.2. Principes actifs antimicrobiens	132
IV.3. Application à la désinfection	134
IV.4. Conclusion	137
SYNTHESE GENERALE	138
CONCLUSION - PERSPECTIVES	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
ANNEXES	160

ABREVIATIONS UTILISEES

APA	Acide peracétique
CDDMA	Chlorure de N, N-didécyl-N, N-diméthylammonium
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DO	Densité optique
γ	Energie de surface (mJ/m ²) ou tension de surface (mN/m) d'un corps
$\bar{\gamma}$	Caractéristique électron-donneur ou Lewis-base de la composante acide-base de l'énergie libre de surface.
γ^+	Caractéristique électron-accepteur ou Lewis-acide de la composante acide-base de l'énergie libre de surface
γ^{AB}	Composante polaire ou acide-base de l'énergie de surface (mJ/m ²)
γ^{LW}	Composante apolaire ou de Lifschitz van der Waals de l'énergie libre de surface (mJ/m ²)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
L₁₀₃₅₇₅	<i>Listeria monocytogenes</i> 103575
L_{177P}	<i>Listeria monocytogenes</i> 177P
MATS	Microbial Adhesion To Solvents
mN/m	Millinewtons par mètre
PHMB	Chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P_{A22}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22
P_{222P}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 222P
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
SAB	Sérum Albumine Bovine
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S₅₃₁₅₄	<i>Staphylococcus aureus</i> 53154
S_{221P}	<i>Staphylococcus aureus</i> 221P
θ	Angle de contact (°)
UFC	Unité(s) formant colonie(s)
v/v	Volume à volume

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX


Tableau I-1 : Concentrations minimales bactéricides (CMB) en ppm, selon la longueur de la chaîne carbonée (Reverdy, 1995a).	25
Tableau I-2: Synthèse du mécanisme de l'action antibactérienne d'antiseptiques et de désinfectants.	29
Tableau I-3 : Mécanismes possibles de résistance plasmidique (McDonnell et Russell, 1999).	34
Tableau I-4 : Longueur d'onde, λ , d'excitation et d'émission (nm) de quelques fluorochromes fréquemment utilisés (http://www.probes.com/handbook).	43
Tableau II-1 : Caractéristiques et origine des souches bactériennes.	52
Tableau II-2 : Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour le test MATS (Bellon-Fontaine <i>et al.</i> , 1996).	55
Tableau II-3 : Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électron (γ^+) et donneur d'électron (γ^-) de l'énergie libre de surface des trois liquides utilisés dans la méthode des angles de contact.	58
Tableau II-4 : Principes actifs et concentration d'utilisation des désinfectants.	61
Tableau II-5 : Maximum d'absorption et d'émission des fluorochromes sélectionnés.	66
Tableau II-6 : Caractéristiques des filtres utilisés pour les observation au microscope à épifluorescence.	67
Tableau II-7 : Observations au microscope à épifluorescence (obj.x40) de la flore totale adhérente et des cellules non viables avant et après désinfection avec l'acide peracétique.	68
Tableau III-1 : Mobilité électrophorétique (M.E.) sur une gamme de pH allant de 2 à 9 pour chacune des souches étudiées en fonction des conditions de conservation (à 4 et -80°C pendant  0, 1 et 2 mois) et de croissance (TSA et TSB).	71
Tableau III-2 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH: Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de <i>S. aureus</i> 53154 en fonction des conditions de conservation et de croissance.	74
Tableau III-3 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH : Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de <i>P. aeruginosa</i> A22 en fonction des conditions de conservation et de croissance.	74
Tableau III-4 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH : Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de <i>L. monocytogenes</i> 129P en fonction des conditions de conservation et de croissance.	75
Tableau III-5 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH : Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de <i>L. monocytogenes</i> 103575 en fonction des conditions de conservation et de croissance.	75
Tableau III-6 : Concentration minimale bactéricide (ppm) de l'acide peracétique en fonction de l'origine et des conditions de croissance des souches bactériennes.	84
Tableau III-7 : Concentration minimale bactéricide (ppm) de l'ammonium quaternaire en fonction de l'origine et des conditions de croissance des souches bactériennes.	86
Tableau III-8 : Concentration minimale bactéricide (ppm) de la PHMB en fonction de l'origine et des conditions de croissance des souches bactériennes (ND : Non Déterminée).	90

Tableau III-9 : Angles de contact mesurés (°) à l'eau, au formamide et au diiodométhane sur l'acier inoxydable AISI 316 et sur le PTFE.	95
Tableau III-10 : Observations au microscope à épifluorescence (obj. x 10) des souches de collection et sauvages adhérentes à l'acier inoxydable et au PTFE en fonction des conditions de croissance. Les cellules sont colorées à l'orangé d'acridine.	99
Tableau III-11 : CMB de chaque désinfectant pour <i>P. aeruginosa</i> A22 et 222P en suspension en fonction du milieu de croissance.	103
Tableau III-12 : CMB de chaque désinfectant pour <i>S. aureus</i> 53154 et 221P en suspension en fonction du milieu de croissance (ND : Non Déterminée).	104
Tableau III-13 : CMB de chaque désinfectant pour <i>L. monocytogenes</i> 103575 et 177P en suspension en fonction du milieu de croissance (ND : Non Déterminée).	106
Tableau III-14 : Observation en microscopie à épifluorescence (obj x 40) de <i>S. aureus</i> 53154, <i>L. monocytogenes</i> 103575 et <i>P. aeruginosa</i> A22 adhérentes à l'acier AISI 316 en fonction des conditions de croissance.	116
Tableau III-15 : Adhésion de <i>L. monocytogenes</i> 103575, <i>S. aureus</i> 53154 et <i>P. aeruginosa</i> A22 à l'acier inoxydable, observation au microscope à épifluorescence des cellules marquées avec le DAPI (flore totale).	121
Tableau III-16 : Angle de contact mesurés à l'eau (°) et observations en AFM de l'acier AISI 316 avant et après encrassement en fonction de l'eau utilisée (osmosée ou distillée).	125
Tableau III-17 : Angle de contact à l'eau (°) mesuré sur l'acier avant et après conditionnement par les agents antimicrobiens.	129
Tableau III-18 : Adhésion (T : Nombre total de cellules adhérentes par cm ²) et viabilité (M : Nombre de cellules mortes par cm ²) des souches de collection à l'acier encrassé ou non (observations au microscope à épifluorescence obj. x40).	131

FIGURES

Figure I-1 : Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes (d'après Crémieux et Freney, 1995).	21
Figure I-2 : Structure chimique des ammoniums quaternaires.	24
Figure I-3 : Formule chimique de la chlorhexidine.	26
Figure I-4 : Formule chimique du chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide).	27
Figure I-5 : Schéma des interactions entre la poly(hexaméthylène-biguanide) et la membrane cytoplasmique (d'après Broxton <i>et al.</i> , 1984).	28
Figure I-6 : Représentation schématique des enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (d'après Neidhardt <i>et al.</i> , 1994).	31
Figure I-7 : Etapes de la formation de biofilms microbiens (adapté de Bellon-Fontaine et Briandet, 2000).	35
Figure I-8 : Structure de la double couche ionique (d'après Hiemez, 1997).	36
Figure I-9 : Représentation schématique de la variation de potentiel en fonction de la distance de la particule chargée (d'après Adamson, 1990).	37
Figure I-10 : Formule chimique du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) et de l'orangé d'acridine.	42
Figure I-11 : Formule chimique du iodure de propidium (a) et du bromure d'éthyidium (b).	43
Figure I-12 : Représentation schématique de la fluorescence avec excitation par lumière réfléchie.	43
Figure I-13 : Schématisation de la résistance aux biocides des variants phénotypiques au sein des biofilms (d'après Drenkard, 2003).	49
Figure II-1 : Coloration de Gram de <i>S. aureus</i> (a), <i>L. monocytogenes</i> (b) et <i>P. aeruginosa</i> (c).	52
Figure II-2 : Schéma du protocole de conservation à -80°C.	53
Figure II-3 : Schéma du protocole de conservation à 4°C.	54
Figure II-4 : Représentation schématique du test MATS permettant la mesure de l'affinité de cellules microbiennes pour différents solvants.	55
Figure II-5 : Dispositif expérimental du zétamètre laser zétaphoremeter II®.	56
Figure II-6 : Représentation de l'angle de contact (θ) d'une goutte déposée sur une surface solide.	57
Figure II-7 : Goniomètre G40 (Krüss, Allemagne).	58
Figure II-8 : Représentation schématique d'un microscope de force atomique.	59
Figure II-9 : Schéma du protocole d'adhésion des micro-organismes aux surfaces.	62
Figure II-10 : Schéma du protocole de dénombrement des cellules adhérentes.	63
Figure II-11 : Protocole du test de désinfection sur cellules planctoniques (adapté de la norme AFNOR NF-EN 1040).	64
Figure II-12 : Schéma du protocole de désinfection sur cellules adhérentes.	65
Figure II-13 : Schéma de la double coloration.	66
Figure III-1: Mobilité électrophorétique à pH 4 de <i>S. aureus</i> 53154 conservée 1 mois à 4°C en fonction du mode de croissance.	73
Figure III-2: Mobilité électrophorétique à pH 4 de <i>S. aureus</i> 53154 conservée 1 mois à -80°C en fonction du mode de croissance.	73

- Figure III-3:** Analyse en composantes principales des propriétés physico-chimiques de surface (affinité aux solvants utilisés pour le test MATS et mobilité électrophorétique des micro-organismes) de chaque souche cultivée sur TSA ou en TSB à T 0, T 1 et T 2 mois de stockage à 4°C et à -80°C. 77
- Figure III-4 :** Affinité des souches pour les solvants (CH : chloroforme, HD : hexadécane, D : décane et AE : acétate d'éthyle) utilisés dans le test MATS en fonction des conditions de croissance (■ : TSA, □ : TSB). 80
- Figure III-5 :** Analyse en composantes principales des propriétés physico-chimiques de surface (affinité aux solvants utilisés pour le test MATS) des souches bactériennes en fonction des conditions de croissance (◇ : TSA ; ◆ : TSB). 82
- Figure III-6 :** Courbes de destruction par l'acide peracétique des souches sauvages et de collection en fonction des conditions de croissance (TSA : ◆ ; TSB : ◇). 83
- Figure III-7 :** Courbes de destruction par le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium des souches sauvages et de collection en fonction des conditions de croissance (TSA : ◆ ; TSB : ◇). 85
- Figure III-8 :** Concentration Minimale Bactéricide de l'ammonium quaternaire en fonction de l'affinité des cellules bactériennes pour le décane (◆). 88
- Figure III-9 :** Courbes de destruction par la PHMB des souches sauvages et de collection en fonction des conditions de croissance (TSA : ◆ ; TSB : ◇). 89
- Figure III-10 :** Relation entre les CMB déterminées pour la PHMB et le caractère hydrophobe de surface des cellules microbiennes (Affinité à l'hexadécane). 92
- Figure III-11 :** Caractéristiques énergétiques (mJ/m²) de l'acier inoxydable A316 (■) et du PTFE (□). 96
- Figure III-12 :** Comportement bioadhésif des souches cultivées sur TSA ou en TSB à la surface de supports d'acier inoxydable ou de PTFE. 97
- Figure III-13 :** Relation entre le nombre de cellules adhérentes dénombrées et le nombre de micro-organismes adhérents observés sur les échantillons d'acier (●) et de PTFE (◆). 101
- Figure III-14 :** Courbes de destruction de *P. aeruginosa* A22 (◆ et ◇) et 222P (● et ○) adhérentes à l'acier après croissance sur TSA (symboles pleins) et en TSB (symboles creux). 103
- Figure III-15 :** Courbes de destruction de *S. aureus* 53154 (◆ et ◇) et 221P (● et ○) adhérentes à l'acier après croissance sur TSA (symboles pleins) et en TSB (symboles creux). 105
- Figure III-16 :** Courbes de destruction de *L. monocytogenes* 103575 (◆ et ◇) et 177P (● et ○) adhérentes à l'acier après croissance sur TSA (symboles pleins) et en TSB (symboles creux). 106
- Figure III-17 :** Observation au microscope à épifluorescence (obj. x 40) de *Listeria monocytogenes* 10357 (A : Cellules en phase stationnaire de croissance; B : Témoin de désinfection ; C : Test de désinfection). 114
- Figure III-18 :** Dénombrement des cellules viables cultivables de *S. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 et *P. aeruginosa* A22 adhérentes à l'acier AISI 316 en fonction des conditions de croissance (■ : TSA, □ : TSB). 117
- Figure III-19 :** Evaluation de la viabilité des cellules de *P. aeruginosa* A22 et 222P adhérentes à l'acier après contact avec 5000 ppm de chacun des désinfectants. 118
- Figure III-20 :** Evaluation de la viabilité des cellules de *S. aureus* 53154 et 221P adhérentes à l'acier après 5 minutes de contact avec 5000 ppm de chacun des désinfectants. 119
- Figure III-21 :** Evaluation de la viabilité des cellules de *L. monocytogenes* 103575 et 177P adhérentes à l'acier après 5 minutes de contact avec 5000 ppm de chacun des désinfectants. 120

- Figure III-22** : Caractéristiques énergétiques de l'acier (■ γ_s , □ γ^{LW} , □ γ^- et ■ γ^+) suite à l'adsorption de molécules encrassantes en fonction de la qualité de l'eau : eau osmosée (A) ou en eau dure à 20°F (B). 126
- Figure III-23** : Schéma de l'adsorption moléculaire d'une solution pure (a) et d'une solution complexe (b). 128
- Figure III-24** : Caractéristiques énergétiques de l'acier ((■ γ_s , □ γ^{LW} , □ γ^- et ■ γ^+) suite à l'adsorption d'agents antimicrobiens en fonction de la qualité de l'eau : eau osmosée (A) ou eau dure à 20°F (B). 129
- Figure III-25** : Comportement bioadhésif (■ : bactéries totales) et viabilité (■ : cellules mortes) des micro-organismes sur les supports conditionnés avec les agents désinfectants. 133
- Figure III-26** : Influence du conditionnement de l'acier AISI 316 par la SAB sur la sensibilité de *S. aureus* 53154 à la désinfection avec la PHMB (% de cellules mortes). 134
- Figure III-27** : Influence du conditionnement de l'acier AISI 316 par la PHMB sur la sensibilité de *S. aureus* 53154 à la désinfection avec la PHMB (% de cellules mortes). 135

PRESENTATION GENERALE

PRESENTATION GENERALE.

L'hygiène des matériaux demeure une préoccupation constante des industriels de l'agro-alimentaire (IAA) ainsi que des responsables du secteur hospitalier ou du personnel médical. En effet, la contamination microbiologique de la surface des équipements des ateliers des IAA peut entraîner une altération de l'aliment en contact générant ainsi d'importants problèmes économiques couplés à d'éventuels problèmes de santé publique (Hood et Zottola, 1995). Dans le domaine hospitalier, c'est la contamination des dispositifs médicaux par des bactéries pathogènes (Man *et al.*, 1998) qui peut être à l'origine d'infections nosocomiales plus ou moins sévères (Darouiche, 2001 ; Donlan et Costerton, 2002).

Actuellement et quel que soit le secteur impliqué, pour assurer un statut hygiénique aux matériaux en contact, des traitements de désinfection sont régulièrement réalisés. Outre l'utilisation de procédés physiques (UV, traitement thermique...), on peut, dans le cas d'appareils thermosensibles par exemple, utiliser des agents chimiques. L'efficacité de ces agents reste toutefois variable d'une application à une autre. En effet, si près de 100% des cellules se trouvant à l'état planctonique peuvent être éliminées, ce rendement est moindre sur des cellules adhérentes ou en biofilms.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence de sensibilité des bactéries vis-à-vis de désinfectants. Tout d'abord, les tests utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des agents désinfectants restent aujourd'hui basées sur l'utilisation de cellules microbiennes en suspension ou déposées et séchées, conditions en fait très éloignées de celles généralement rencontrées *in vivo i.e.* cellules adhérentes ayant ou non intégré une matrice microbienne et synthétisé des polymères exocellulaires. Cette variation de réponse aux biocides peut également être liée à des modifications physico-chimiques de la surface des cellules microbiennes (Briandet, 1999), modifications pouvant être dues à un changement dans leur physiologie (production de composés extra-cellulaires, morphologie, expression génétique...) ou encore à leur histoire *i.e.* conditions de conservation et de mise en culture (Briandet, 1999). Par ailleurs, les souches de collection recommandées dans les normes de désinfection ne présentent généralement pas de tolérance particulière aux désinfectants et ne reflètent donc pas les problèmes de résistance retrouvés sur le terrain.

Dans ce contexte et afin d'améliorer l'efficacité de ses produits et/ou optimiser les procédures d'hygiène qui y sont associées, il est apparu nécessaire de mettre en place des méthodes tests permettant d'évaluer rapidement et *in situ* l'activité désinfectante de produits commercialisés ou non, dans des conditions proches de la réalité, et notamment sur des cellules adhérentes non déshydratées. A cette fin, quatre grandes étapes ont été définies :

I. Identification de souches « cibles » en fonction du secteur d'activité considéré et définition de conditions de conservation et de croissance des micro-organismes les mieux adaptées au problème posé,

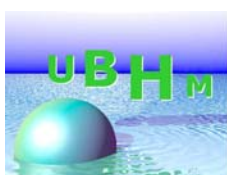
II. Mise au point d'un protocole de désinfection des surfaces contaminées afin d'évaluer la concentration efficace en agent antimicrobien. Cette étape a nécessité dans une première phase la standardisation des essais d'adhésion en conditions statiques sur supports conditionnés ou non, puis la définition des tests de désinfection sur cellules « fixées ».

III. Mise en place d'une technique rapide pour évaluer *in situ* la viabilité cellulaire après :

- Mise au point du protocole de coloration, et
- Application à la désinfection sur cellules adhérentes.

IV. Influence de la qualité de l'eau et de la présence d'un film primaire sur la viabilité cellulaire et sur la réponse à la désinfection.

Les résultats obtenus à chacune de ces étapes sont présentés dans la troisième partie du présent mémoire, la première partie étant consacrée à une étude bibliographique sur la sensibilité bactérienne vis à vis des désinfectants et la seconde à la description des matériels et méthodes utilisés. L'ensemble de ce travail s'inscrit dans le cadre d'une convention CIFRE impliquant les Laboratoires ANIOS (Lille-Hellemmes) et l'Unité de recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (INRA-Massy).



PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

LA DESINFECTION

I. DEFINITION

« La désinfection est une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes, en fonction des objectifs fixés » (Anonyme, 1998). Les traitements de désinfection visent donc à assurer l'hygiène des matériaux afin de limiter voir empêcher tout risque de contamination microbienne.

Cette destruction des germes indésirables portés par des matériaux inertes peut se faire soit par des procédés physiques (chaleur, ultra-sons, irradiation) ou chimiques (désinfectants) soit par une combinaison des deux (Russell, 1991). On peut néanmoins noter que pour des appareils thermosensibles tels que les endoscopes dans le secteur médical ou encore certaines lignes de production en industrie alimentaire, seuls des traitements chimiques peuvent être appliqués, justifiant la place prépondérante des agents antimicrobiens dans nombre d'opérations de stérilisation ou de pré-désinfection de supports inertes.

II. MODES D'ACTION DES DESINFECTANTS

II.1. NOTION DE DESINFECTANT ET D'ANTISEPTIQUE

Sous le terme d'agent antibactérien sont regroupées différentes molécules d'origine biologique, hémisynthétique ou de synthèse. Leur utilisation pour la thérapie des infections bactériennes (antibiotiques) ou encore pour la désinfection des matériels et milieux inertes (antiseptiques et désinfectants) est directement reliée à leur toxicité plus ou moins sélective.

Les antibiotiques sont, *sensu stricto*, des agents antimicrobiens d'origine biologique. Ils ont une activité létale sélectivement dirigée contre les micro-organismes, ce qui en fait des médicaments des infections systémiques (Block, 1977). A l'opposé, les antiseptiques et les désinfectants sont des agents antimicrobiens chimiques dont la toxicité est brutale et peu sélective vis à vis des cellules eucaryotes et procaryotes. Leur emploi est donc limité soit à un usage externe *in vivo* (antiseptiques) soit à une désinfection des surfaces inertes

(désinfectants) (Duval J., 1989). Nous nous intéresserons plus particulièrement au groupe des molécules désinfectantes.

II.2. CHOIX DE L'AGENT ANTIMICROBIEN

Pour assurer une bonne désinfection, le principe actif doit répondre aux exigences suivantes :

- large spectre d'activité et action durable,
- efficacité en présence de résidus de souillure,
- utilisation possible dans des conditions très différentes de pH et de dureté de l'eau,
- action non corrosive sur les supports,
- actif à faible concentration,
- facilement rinçable,
- ne présenter aucun danger, aux concentrations d'utilisation, pour le métabolisme humain,
- être peu coûteux.

Aucun produit désinfectant ne réunissant à ce jour l'ensemble de ces propriétés, le choix du principe actif s'effectue sur des critères législatifs puis en fonction du spectre d'activité recherché et des critères spécifiques d'utilisation (compatibilité avec les matériaux...) (Beerens, 1985).

II.2.1. Réglementation

Pour les surfaces en contact avec des aliments, l'utilisation des agents antimicrobiens dans les industries agro-alimentaires implique une inscription préalable sur une liste positive. L'arrêté du 15 juin 1993 (Barbusiaux *et al.*, 1993) modifiant et complétant l'arrêté du 27 octobre 1975 relatif aux produits de nettoyage du matériel pouvant se trouver au contact des denrées alimentaires, précise la liste exacte des molécules pouvant être utilisées pour des opérations de désinfection, ainsi que les molécules entrant dans la catégorie des agents de surface cationiques.

Concernant le domaine hospitalier, les produits antimicrobiens utilisés pour la décontamination du matériel médical sont également inscrits sur une liste positive après proposition et accord écrit du fabricant. Les critères d'inclusion dans cette liste sont basés sur les normes françaises et européennes en vigueur *i.e.* Normes AFNOR « Antiseptiques et Désinfectants » série NF T 72 et NF EN. Depuis 1999, « ne sont pris en compte que les

produits dont la concentration d'usage annoncée par le fabricant est supérieure ou égale à la concentration active pour la norme la plus défavorable » (Société Française d'Hygiène Hospitalière, 2003).

II.2.2. Activité bactéricide

D'une manière générale, l'activité d'un désinfectant peut être définie *in vitro* par deux valeurs : la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), plus faible concentration du produit inhibant totalement en 18 ou 24 heures la multiplication des micro-organismes, et la Concentration Minimale Létale (CML), plus faible concentration du produit capable de détruire un certain nombre de cellules microbiennes dans un temps déterminé (Joly, 1995). La CML est définie pour chaque micro-organisme. Ainsi, selon l'AFNOR, la bactéricidie ou Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la plus faible concentration du composé engendrant 5 réductions décimales d'une population initiale de 10^8 ufc/mL en 5 minutes à 20°C. La détermination de la CMB répond à des protocoles standardisés décrits par la norme T72-150 (Anonyme, 1987) ou plus récemment par la norme NF-EN 1040 (Anonyme, 1997). Cette mesure permet donc de connaître le spectre d'activité des désinfectants afin de pouvoir les sélectionner en fonction de l'usage souhaité et du micro-organisme à éliminer.

II.2.3. Détermination de l'activité antibactérienne des désinfectants

Pour vérifier que les désinfectants atteignent leur objectif, il est nécessaire de déterminer si les bactéries sont tuées ou éliminer sous leur action. Ainsi, le pouvoir bactéricide d'un agent antimicrobien est généralement évalué à partir d'essais réalisés *in vitro*. La réalisation de ces tests de désinfection est complexe car plusieurs paramètres doivent être définis : choix des germes, préparation des suspensions bactériennes, élimination ou neutralisation du désinfectant. Différentes méthodes ont ainsi été développées et certaines d'entre elles sont aujourd'hui standardisées. Nous avons choisi de ne présenter que celles susceptibles de nous intéresser pour la suite de l'étude.

II.2.3.1. Sur cellules planctoniques

Deux des normes les plus largement utilisées pour déterminer l'activité bactéricide d'un produit en l'absence ou en présence de substances interférentes (albumine bovine et extrait de levure, Ca^{2+} , Mg^{2+}) sont les normes NF EN 1040 et NF EN 1276. Les essais de désinfection, effectués sur 4 (activité bactéricide spectre 4) ou 5 espèces bactériennes différentes (activité

bactéricide spectre 5), sont réalisés selon la méthode dite de dilution-neutralisation. Après 5 min.± 5s de contact à 20°C, l'activité bactéricide du produit est stoppée par dilution de la suspension bactérienne dans un neutralisant adapté pendant 5min. Le dénombrement des cellules viables cultivables est alors réalisé par ensemencement en gélose nutritive.

II.2.3.2. Sur cellules fixées

A ce jour, aucune norme n'a été développée pour tester l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens sur des cellules adhérentes ou en biofilms. La seule norme actuellement disponible est la norme AFNOR NF EN 72-190, dite « méthode des porte-germes » (Anonyme 1998). Elle permet de déterminer l'activité de désinfectants, utilisés à l'état liquide et miscibles à l'eau, sur des bactéries fixées artificiellement (séchage à 45°C pendant 30min.) sur des supports non poreux de nature variée (verre de montre, acier, matières plastiques...). Après un temps de contact donné avec 0,2 mL de désinfectant, les portes-germes sont transférés avec le produit désinfectant dans 100 mL de liquide de récupération, agités, grattés et si besoin, soumis aux ultra-sons. L'action du désinfectant est ensuite stoppée par une série de dilutions et de filtrations successives. Les micro-organismes viables et cultivables sont alors dénombrés après ensemencement en gélose nutritive.

Bien que l'évaluation du taux de destruction des micro-organismes adhérents soit possible, certaines bactéries sessiles peuvent être éliminées par les lavages successifs des supports contaminés. Il est à noter que la déshydratation que subissent les cellules microbiennes peut entraîner l'apparition d'un stress « hydrique » induisant de potentielles erreurs d'interprétation des résultats. De plus, cette technique n'est pas applicable pour l'étude de l'activité bactéricide des désinfectants sur des cellules simplement adhérentes (quelques heures d'adhésion) ou en biofilms.

II.3. MECANISME D'ACTION GENERAL

Quelle que soit l'entité microbienne considérée et la molécule désinfectante utilisée, on sait aujourd'hui que l'action des biocides peut se caractériser par les trois phases suivantes (Pieto et Bardoneschi, 1988 ; McDonnell et Russell, 1999) :

- i)* adsorption du désinfectant à la surface de l'enveloppe microbienne, phénomène de nature physico-chimique dépendant notamment de la concentration et du mouvement brownien des bactéries.

- ii)* pénétration de l'agent antimicrobien dans la cellule. La solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique des molécules antibactériennes sont des facteurs clé de cette phase.
- iii)* action proprement dite du principe actif. Elle peut avoir lieu au niveau de différentes cibles cellulaires possibles (Figure I-1), telle que la membrane cytoplasmique dont l'altération de structure provoque une désorganisation du métabolisme, une fuite de substances, et la dégénérescence de la cellule et finalement sa mort ; ou encore le cytoplasme et plus précisément les protéines cytoplasmiques, les acides nucléiques ou les ribosomes (Hugo, 1992).

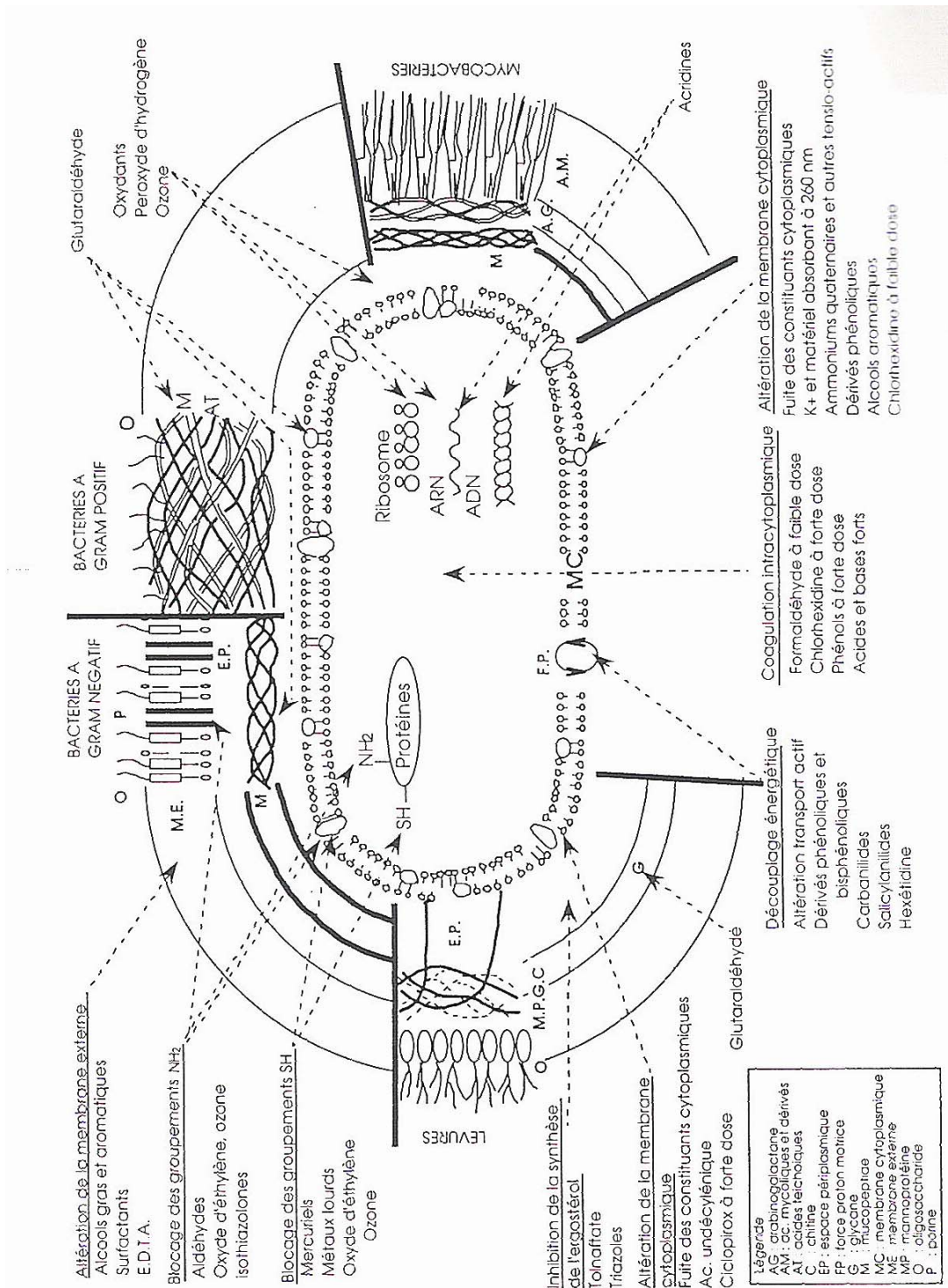


Figure I-1 : Sites d'action des molécules antiseptiques et désinfectantes selon les micro-organismes (d'après Crémieux et Freney, 1995).

Ainsi, pour être actif, l'agent antibactérien doit pouvoir s'adsorber sur l'enveloppe microbienne et la traverser. Ces phénomènes sont donc fortement dépendants d'une part de la composition de la paroi bactérienne et d'autre part de la structure de la molécule désinfectante (Joly, 1995).

III. CLASSIFICATION DES PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS

Comme indiqué précédemment, ces agents antimicrobiens peuvent être classés en deux groupes *i.e.* les produits potentiellement létaux et ceux, non létaux, mais inhibiteurs de croissance (Crémieux et Freney, 1995).

Le premier groupe se divise lui-même en deux catégories :

- Les composés chimiquement très réactifs tels que l'eau oxygénée, les halogénés, les acides et bases fortes, les aldéhydes, se caractérisant par une action brutale, rapide, temporaire et souvent non spécifique.

Des composés chimiquement stables à action plus spécifique. Ce groupe comprend entre autres les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques, la chlorhexidine et ses dérivés.

Les produits non létaux mais seulement inhibiteurs de croissance comprennent essentiellement les métaux (mercuriels, dérivés du cuivre, du zinc, de l'argent...) et les colorants.

Compte tenu des finalités d'application choisies dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement au premier groupe de produits.

III.1. PRODUITS A ACTION LETALE NON SPECIFIQUE

III.1.1. Oxydants

Les agents oxydants les plus utilisés sont l'ozone (O₃), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide peracétique (CH₃-CO-O-OH). Leur mode d'action est basé sur la libération d'oxygène entraînant l'oxydation des systèmes enzymatiques. Ainsi, les agents oxydants tel que l'acide peracétique, agissent sur les lipides, les liaisons sulfurées, les acides nucléiques et les systèmes enzymatiques (Bartoli et Dusseau, 1995). Ils entraînent une désorganisation de la membrane cellulaire (Maris, 1995).

Ces composés oxydant ont l'avantage de présenter un large spectre d'activité, une absence de résidus finaux, un faible pouvoir corrosif aux concentrations d'usage et ils sont facilement éliminables par rinçage. Ils sont cependant toxiques aux fortes concentrations et instables pendant leur stockage.

III.1.2. Halogènes et dérivés

L'un des composés les plus couramment utilisés comme désinfectant en milieu industriel, hospitalier, domestique ainsi que dans les collectivités est l'hypochlorite de sodium. Il possède une puissante activité désodorisante ainsi qu'un large spectre d'activité sur les micro-organismes (Trueman, 1971). Son activité bactéricide est liée à la libération de l'acide hypochloreux (HOCl) lors de sa dissociation dans l'eau. Cet agent antimicrobien pénètre facilement à travers les parois et les membranes de cellules microbiennes. Il agit par un mécanisme rapide d'oxydation générale entraînant la dénaturation des protéines (Maris, 1995). En conséquence, l'arrêt des réactions du métabolisme conduit à la mort cellulaire (Trueman, 1971).

L'un des principaux inconvénients des solutions d'hypochlorite de sodium est leur rapide dégradation sous l'action de la chaleur et de la lumière.

III.1.3. Acides et bases

L'efficacité de ces composés est liée aux concentrations en ions H^+ et OH^- . Les ions H^+ agissent sur les liaisons aminoacides des acides nucléiques, modifiant le pH cytoplasmique et précipitant les protéines. Les ions OH^- , en saponifiant les lipides membranaires, entraînent la destruction de ces structures (Maris, 1995).

III.1.4. Alcools

L'éthanol, l'isopropanol et le *n*-propanol sont les alcools les plus couramment utilisés, particulièrement en Europe. Leur activité antimicrobienne est rapide et à large spectre incluant notamment les formes végétatives des bactéries (dont les mycobactéries), les virus et les moisissures. Bien qu'ils puissent inhiber leur sporulation et leur germination, ils ne sont pas létaux pour les spores bactériennes (McDonnell et Russell, 1999). Ils sont généralement plus actifs sur les bactéries à Gram négatif que sur celles à Gram positif (Crémieux et Freney, 1995).

Leur mécanisme d'action est encore mal connu mais leur efficacité bactéricide est favorisée en présence d'eau (Hamilton, 1971). Ces agents antimicrobiens perturbent le métabolisme bactérien en induisant des lésions au niveau de la membrane et par dénaturation des protéines. Leur activité est optimale pour une concentration en alcool comprise entre 60 et

90%. Ils sont souvent utilisés en synergie avec d'autres désinfectants, et en particulier avec la chlorhexidine.

III.1.5. Aldéhydes

Le glutaraldéhyde est l'aldéhyde le plus couramment employé, en milieu hospitalier pour des opérations de désinfection à basse température pour la stérilisation des endoscopes et du matériel chirurgical (McDonnell et Russell, 1999). Cette molécule antimicrobienne est active sur les formes végétatives et sporulées des bactéries ainsi que sur les virus. C'est un puissant agent réducteur qui réagit de manière irréversible avec les groupements aminés ($R-NH_2$) des protéines cellulaires. Ainsi, en se liant, entre autres, à ces groupements présents à la surface de l'enveloppe bactérienne, cet agent antibactérien inhibe les systèmes enzymatiques et de transport transmembranaire entraînant ainsi la mort cellulaire ; il dénature également les acides nucléiques par alkylation. Son activité est optimale à pH alcalin (McDonnell et Russell, 1999). Il est à noter que la présence de matières organiques diminue son efficacité bactéricide.

Les aldéhydes ont l'avantage de présenter un large spectre d'activité et d'être peu corrosifs ; leur point faibles résident dans leur forte toxicité, leur action lente et leur difficulté d'élimination par rinçage.

III.2. PRODUITS A ACTION LETALE SPECIFIQUE

III.2.1. Ammoniums quaternaires

La structure chimique générale des sels d'ammonium quaternaire est présentée sur la figure I-2. Les hydrogènes sont substitués par des groupements alkyles (R), l'anion (X^-) est généralement un atome de chlore ou de brome.

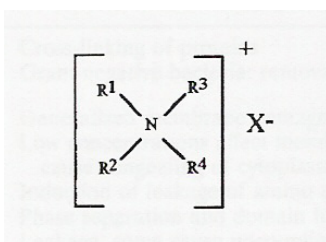


Figure I-2 : Structure chimique des ammoniums quaternaires.

Les ammoniums quaternaires sont des composés bipolaires comportant un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile chargé positivement permettant à la molécule de s'adsorber aux surfaces inertes. Ce caractère amphiphile donne à ce type de molécules des propriétés détersives en plus de son activité bactéricide (Reverdy, 1995a). Ils sont généralement plus efficaces sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif ; ils n'ont pas d'action sur les mycobactéries ni sur les formes sporulées des bactéries et sont fongicides à hauteur de 0,1% (v/v).

De part leurs propriétés physico-chimiques, ces molécules peuvent s'adsorber de manière irréversible aux phospholipides et aux protéines de l'enveloppe bactérienne ; cette adsorption entraîne alors des changements de perméabilité puis des lésions de la membrane cytoplasmique conduisant à une fuite des constituants cytoplasmiques (notamment les ions potassium). leur balance hydrophile-lipophile déterminée par la longueur de la chaîne alkylée est un facteur clé de leur efficacité. Ainsi, l'activité est maximale pour les molécules en C14 et minimale pour celles qui contiennent 8 et 18 atomes de carbones (Tableau I-1).

Nombre de carbone	CMB <i>S. aureus</i>	CMB <i>S. typhosa</i>	CMB <i>P. aeruginosa</i>
8	300	4500	6000
12	45	40	120
14	15	12	40
16	30	25	200
18	450	60	1000

Tableau I-1 : Concentrations minimales bactéricides (CMB) en ppm, selon la longueur de la chaîne carbonée (Reverdy, 1995a).

L'efficacité bactéricide des ammoniums quaternaires est également dépendante du pH, leur maximum d'activité se situe à pH neutre et sont inactives aux $\text{pH} \leq 3,5$.

Ils sont généralement employés comme détergents / désinfectants dans les industries agro-alimentaires. Il est à noter que dans les laiteries, seul le chlorure de didécyl diméthylammonium est autorisé (Barbusiaux et al., 1993). Dans les hôpitaux, ils sont souvent utilisés en solution alcoolique. Ils peuvent également être employés comme conservateurs dans les produits cosmétiques. (Reverdy, 1995a).

Leur faible toxicité, leur stabilité et leur caractère non corrosif en font des désinfectants de choix. Cependant, leur efficacité bactéricide est atténuée par la présence de matières organiques et par l'eau dure (Merianos, 1991).

III.2.2. Biguanides

Cette famille est composée entre autres de la chlorhexidine et des polyhexaméthylènes biguanides (PHMB), polymères formés de groupes biguanides liés par des chaînes hexaméthylène. Ce sont des substances cationiques.

La chlorhexidine (ou 1,6 dichlorophényl diguano-hexane) (Figure I-3) est probablement l'un des biocides les plus utilisés dans les produits antiseptiques.

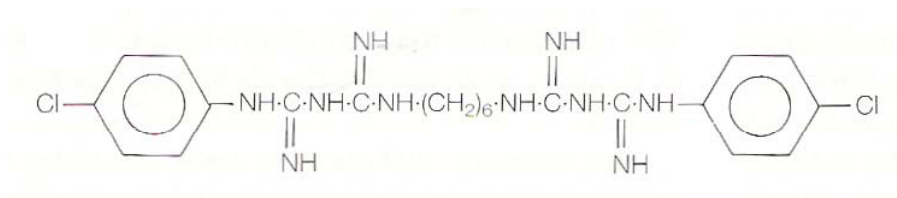


Figure I-3 : Formule chimique de la chlorhexidine.

La chlorhexidine en solution aqueuse est active sur la majorité des formes végétatives des bactéries à Gram positif et négatif (Hugo et Russell, 1992), mais n'a pas d'activité antimicrobienne sur les mycobactéries ni sur les spores. Lorsque la concentration est faible (20 à 50 mg/L), il y a altération de la membrane cytoplasmique par désorganisation de la bicouche lipidique provoquant la fuite des constituants cytoplasmiques de faible poids moléculaire donnant ainsi à la cellule l'aspect de « fantôme ». A forte concentration (supérieure à 100 mg/L), il y a précipitation et coagulation du cytoplasme (Maris, 1995). Afin d'atteindre sa cible *i.e.* le cytoplasme, elle traverse la membrane externe ou la paroi bactérienne par diffusion passive (McDonnell et Russell, 1999). Son efficacité bactéricide, dépendante du pH, est optimale entre pH 5,5 et 7. Il est à noter que le calcium et le magnésium ainsi que les matières organiques diminuent son action létale.

Les sels de poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB) (Figure I-4), quant à eux, sont utilisés dans les industries alimentaires ainsi que pour la désinfection des piscines. Les solutions commerciales sont des mélanges hétérodispersés de PHMB dont le poids moléculaire moyen est de 3 kDa (McDonnell et Russell, 1999).

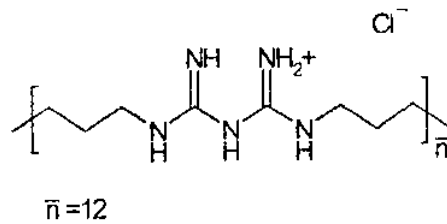


Figure I-4 : Formule chimique du chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide).

Comme la chlorhexidine, la PHMB est active sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et n'est pas sporicide. La PHMB a pour cible les membranes bactériennes (cytoplasmique et externe). En formant des domaines avec les phospholipides acides de la membrane bactérienne (Figure I-5), cet agent antimicrobien entraîne une modification de la perméabilité membranaire ainsi qu'une altération de certaines enzymes qui y sont associées.

Ainsi, McDonnell et Russell (1999) ont décomposé l'action de la PHMB sur *E. coli* en plusieurs étapes :

- i)* rapide attraction de la PHMB aux surfaces bactériennes chargées négativement et adsorption spécifique aux composés contenant des phosphates,
- ii)* déstabilisation de l'intégrité membranaire ; la PHMB est alors attirée vers la membrane interne,
- iii)* liaison de la PHMB aux phospholipides membranaires, couplée à une augmentation de la perméabilité membranaire (fuite des ions K^+),
- iv)* et enfin, perte des fonctions membranaires et précipitation des constituants intracellulaires entraînant la mort cellulaire.

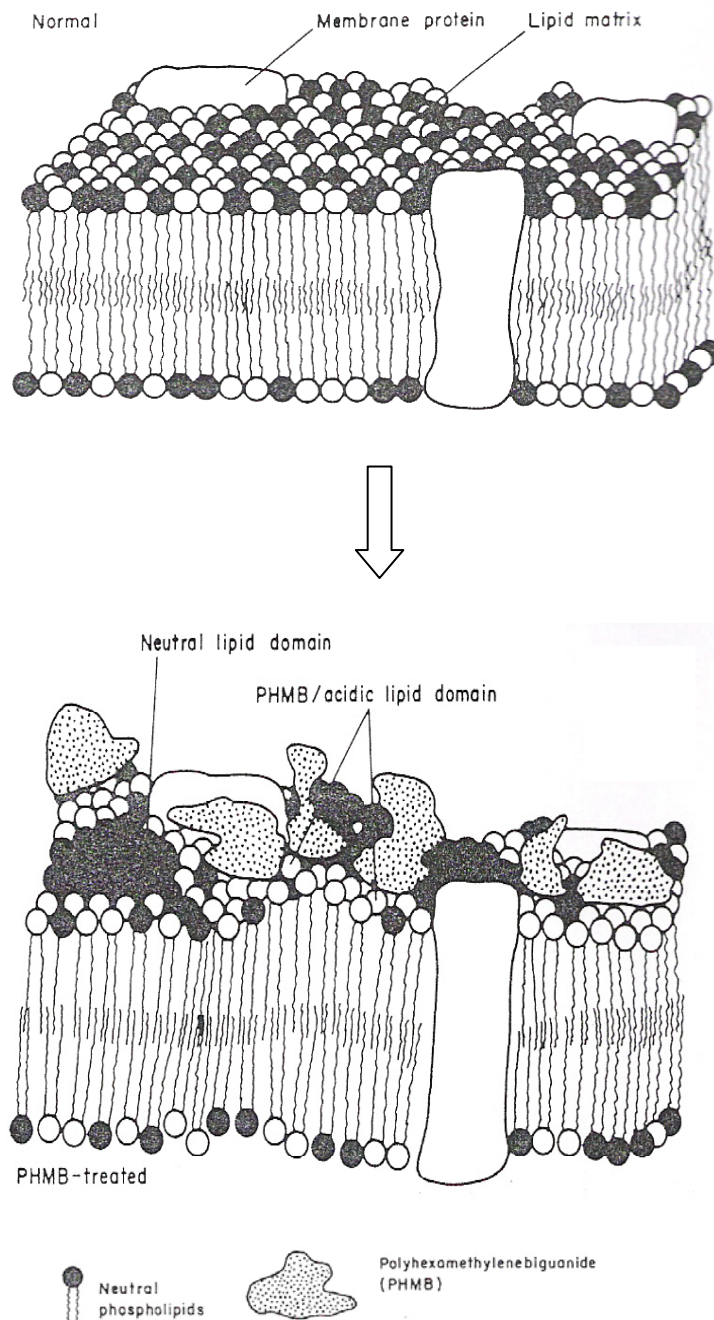


Figure I-5 : Schéma des interactions entre la poly(hexaméthylène-biguanide) et la membrane cytoplasmique (d'après Broxton *et al.*, 1984).

III.2.3. Dérivés Phénoliques

Ces antimicrobiens sont actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais n'ont pas d'activité létale sur les spores. Ils agissent sur la membrane cellulaire et inactivent les enzymes cytoplasmiques par formation de complexes instables. Aux faibles concentrations, les constituants cellulaires sont libérés dans le milieu extérieur; aux fortes concentrations, il y

a dénaturation des protéines et lyse de la membrane cellulaire (Maris, 1995). Leur efficacité est dépendante du pH et de la présence de matières organiques (Freney, 1995).

Ainsi, selon la molécule considérée, l'activité bactéricide peut affecter différents constituants cellulaires. De plus, et comme mentionné précédemment, l'efficacité des différentes molécules désinfectantes peut varier en fonction des micro-organismes *i.e.* en fonction de la structure et de la composition cellulaire ainsi qu'en fonction de la physiologie des cellules microbiennes.

Produit	Utilisation	Mode d'action	Cibles
Oxydants	Désinfection	Oxydation	Lipides, liaisons sulfurées, acides nucléiques et systèmes enzymatiques
Halogènes et dérivées	Antiseptie	Oxydation générale	Protéines
	Désinfection		
Acides	Désinfection	Précipitation des protéines par modification du pH.	Liaisons aminoacides des acides nucléiques,
Bases	Désinfection	Saponification des lipides membranaires	Membranes cellulaires
Alcools	Antiseptie	Dénaturation des protéines	Protéines
	Désinfection		
Aldéhydes	Désinfection	Agent réducteur	Protéines, ARN et ADN
Ammoniums quaternaires	Désinfection	Perméabilisation de la membrane cytoplasmique	Phospholipides membranaires
	Antiseptie		
Biguanides	Antiseptie	Modification de la perméabilité membranaire	Membranes bactériennes
	Désinfection		
Dérivés phénoliques	Antiseptie	Formation de complexes instables	Membrane cellulaire et enzymes cytoplasmiques

Tableau I-2: Synthèse du mécanisme de l'action antibactérienne d'antiseptiques et de désinfectants.

IV. SENSIBILITE BACTERIENNE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS : NOTION DE RESISTANCE ET DE TOLERANCE

IV.1. DEFINITION

D'après Joly (1995), une population microbienne est dite résistante à un antiseptique ou à un désinfectant lorsque la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ce produit vis à vis de la population considérée est significativement plus élevée que les CMB de ce produit vis à vis de la plupart des populations microbiennes.

Deux types de résistance aux antimicrobiens peuvent alors être distingués : la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

IV.2. RESISTANCE INTRINSEQUE

La résistance intrinsèque ou naturelle est une caractéristique innée et stable des cellules appartenant à une espèce microbienne ou à un groupe d'espèces vis à vis d'un antimicrobien. Etant stable, elle permet de définir le spectre d'activité d'un biocide *i.e.* ensemble de micro-organismes naturellement sensibles ou résistants à un antimicrobien ou groupe d'antimicrobiens donné.

Comme mentionné précédemment, la structure et la composition de la surface des micro-organismes jouent un rôle important dans leur résistance naturelle.

IV.2.1. La paroi des bactéries à Gram positif

Si l'on considère la paroi des bactéries à Gram positif, représentée Figure I-6, on peut noter qu'elle est principalement constituée de la muréine (ou peptidoglycane), elle-même formée de chaînes polysaccharidiques linéaires dont l'unité de base est une alternance régulière de deux sucres aminés, la N-acétyl glucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM) liés à un peptide (Hancock, 1991). Ce peptidoglycane assure la rigidité de la cellule et représente 30 à 50% du poids sec de la paroi cellulaire. A cette muréine, sont associés, en quantité moindre, d'autres polymères dispersés, en particulier des acides teichoïques, téichuroniques et lipotéichoïques et des protéines de surface (Neidhardt *et al.*, 1994).

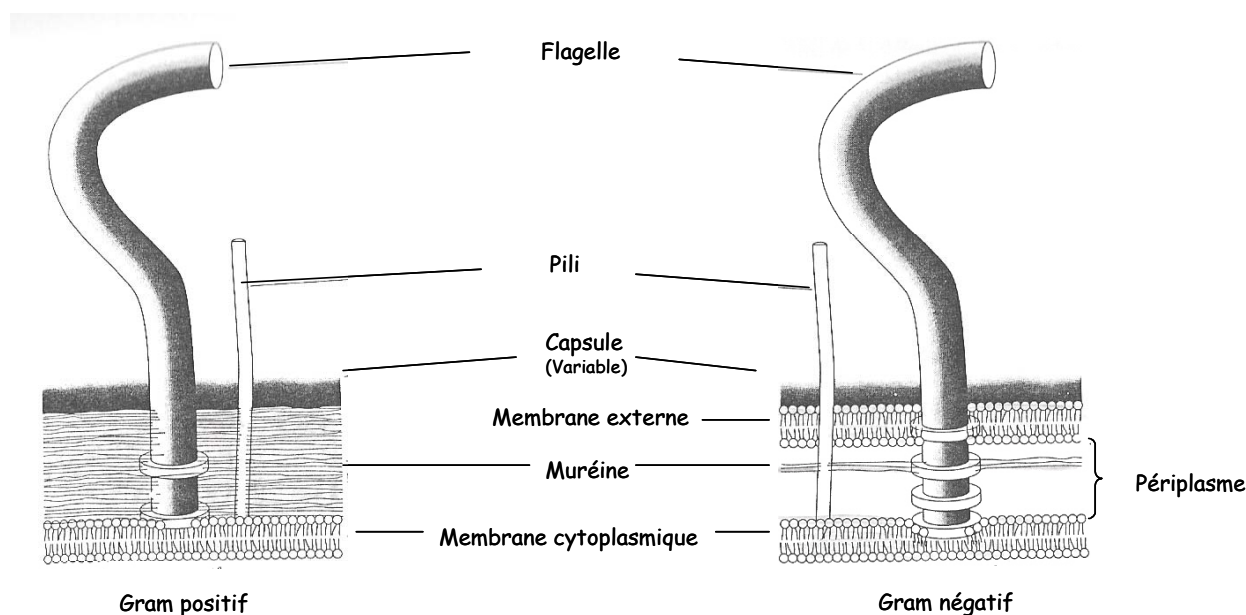


Figure I-6 : Représentation schématique des enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (d'après Neidhardt *et al.*, 1994).

IV.2.2. La paroi des bactéries à Gram négatif

La paroi des bactéries à Gram négatif (Figure I-6), généralement plus mince, est, quant à elle, constituée du peptidoglycane, recouvert d'une membrane externe dans laquelle peuvent s'insérer des protéines, des lipoprotéines et des lipopolysaccharides (LPS) (Hancock, 1991 ; Neidhardt *et al.*, 1994). La partie polysaccharidique des LPS, extrêmement hydrophile, est orientée vers l'extérieur des cellules. Il est à noter que certaines bactéries à Gram négatif peuvent s'avérer être très hydrophobes, caractère relié à la présence de protéines de surface.

Par conséquent, les différences de composition de l'enveloppe bactérienne entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais également au sein d'une même espèce bactérienne entraînent une sensibilité variable des micro-organismes aux agents désinfectants. Ainsi, l'enveloppe des bactéries à Gram positif ne possède pas de récepteurs spécifiques ou de perméases facilitant la pénétration des biocides dans les cellules (Russell, 1991). Concernant les bactéries à Gram négatif, la membrane externe de la paroi peut jouer un rôle de barrière vis à vis des agents chimiques (Joly, 1995). Il est à noter que chez les bactéries à Gram négatif, les petites molécules antimicrobiennes hydrophiles pourront pénétrer dans les cellules par la voie hydrophile via les porines (Hancock, 1998) alors que les composés lipophiles tels que les ammoniums quaternaires emprunteront la voie hydrophobe (diffusion à travers la membrane par les lipides et le lipopolysaccharide) (Joly, 1995).

La cible de la plupart des antiseptiques et des désinfectants étant la membrane cytoplasmique, la résistance intrinsèque peut donc être corrélée avec son degré de protection. Ainsi, la présence d'une enveloppe externe (bactérie à Gram négatif), d'une couche de cires (mycobactéries) ou de tuniques sporales augmentera généralement la résistance des cellules microbiennes aux désinfectants (Joly, 1995 ; Reverdy, 1995b).

Il est à noter que la résistance naturelle des bactéries aux biocides peut également être due à la présence de systèmes enzymatiques tels que la catalase ou la super oxyde dismutase chez *E. coli* permettant de détruire l'agent oxydant avant que la dégradation bactérienne n'ait eu lieu ou participant aux mécanismes de réparation cellulaire. D'autres systèmes enzymatiques *i.e.* pompes d'efflux, permettent le « rejet » des agents désinfectants hors de la cellule (Russel, 1997).

IV.3. RESISTANCE ACQUISE

La résistance acquise est due à un événement imprévisible qui, au sein d'une espèce, a pour conséquence l'apparition d'une ou plusieurs souches ayant une résistance plus élevée à un antimicrobien (Joly, 1995). Une sélection de cette souche est ainsi possible quand les concentrations d'utilisation habituelles du produit sont inférieures à la concentration active. Ce phénomène étant connu, il est donc surveillé.

Cette résistance est le résultat de modifications génétiques soit sur le noyau de la cellule (résistance acquise chromosomique) soit apportées par un plasmide (résistance acquise plasmidique). Ces mutations génétiques peuvent alors se traduire par des évolutions biochimiques du micro-organisme déterminant ainsi l'intensité et la spécificité de la résistance.

IV.3.1. Résistance acquise chromosomique

Il s'agit d'une mutation stable et héréditaire d'un gène du chromosome et le produit du gène muté est ainsi lui-même modifié. Généralement, la résistance est acquise lorsque la mutation concerne un ou plusieurs gènes structuraux de la cellule, codant soit pour un élément cible de l'antimicrobien, soit pour un élément de fixation ou de pénétration du désinfectant. Ainsi, le mécanisme biochimique de base de la résistance chromosomique bactérienne peut

être lié à une modification de la membrane cellulaire empêchant ainsi la fixation et la pénétration du produit (Joly, 1995).

De nombreuses études (Reverdy, 1995a, Jones *et al.*, 1989 ; Thomas *et al.*, 2000 ; Lundén *et al.*, 2003) ont montré que la croissance d'une souche sensible avec des concentrations sublétales d'un désinfectant pouvait entraîner l'acquisition d'une résistance à cet antimicrobien. Cette diminution de sensibilité s'accompagne généralement d'une évolution de l'enveloppe bactérienne et plus particulièrement de la composition lipidique membranaire des bactéries à Gram négatif (Méchin *et al.*, 1999 ; Langsrund *et al.*, 2003 ; Tabata *et al.*, 2003) et des bactéries à Gram positif (To *et al.*, 2002).

Ces variations de composition de la paroi cellulaire (teneur en acides gras, lipides, protéines) peuvent ainsi engendrer une évolution des propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes *i.e.* hydrophobie, charge de surface (Loughlin *et al.*, 2002) entraînant donc une modification des interactions entre cellules microbiennes et agents antimicrobiens (Sakagami *et al.*, 1989).

Cependant, cette résistance peut être réversible (Jones *et al.*, 1989). Il s'agit alors d'un phénomène adaptatif gouverné par des gènes chromosomiques.

IV.3.2. Résistance acquise plasmidique (ou extrachromosomique)

Les micro-organismes ayant acquis une résistance extrachromosomique hébergent des plasmides R (facteurs de résistance) véhiculant des gènes dont le produit confère la résistance à un ou plusieurs antimicrobiens. Ce phénomène, fréquent et varié, a été largement étudié dans le cas des antibiotiques. Des plasmides induisant une augmentation de résistance à certains agents désinfectants (ammonium quaternaire, chlorhexidine, bromure d'éthydiu et acridines) ont également pu être mis en évidence chez des souches responsables d'infections nosocomiales (Russell, 1997).

Ainsi, chez des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (MRSA), les gènes *qac A*, *qac B*, *qac C* et *qac D* portés par un plasmide pSK ont été mis en évidence. Ils codent pour la résistance aux ammoniums quaternaires ainsi que pour la chlorhexidine (McDonnell et Russell, 1999). Le produit de ces gènes est une protéine provoquant l'efflux de l'agent antimicrobien. Par leur capacité de transfert entre bactéries, cette résistance peut être étendue à d'autres micro-organismes ; cependant, la présence de ce plasmide n'a été constaté que chez les staphylocoques (Russell, 1997).

D'autres mécanismes biochimiques de résistance bactérienne tels que l'inactivation de l'agent antimicrobien (cas des sels de mercure) et l'altération de la surface cellulaire (modification de la synthèse des protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) (Russell, 1997), peuvent également être liés à ces plasmides (Tableau I-3).

Agents chimiques	Mécanismes de résistance
Sels de Chlorhexidine	Efflux augmenté
Ammoniums Quaternaires	Efflux augmenté
Formaldéhyde	Inactivation par la formaldéhyde déshydrogénase Modifications de surface des cellules microbiennes
Dérivés de l'argent	Diminution de la pénétration
Sels d'acridine	Efflux augmenté
Bromure d'éthidium	Efflux augmenté
Sels de mercure	Inactivation

Tableau I-3 : Mécanismes possibles de résistance plasmidique (McDonnell et Russell, 1999).

V. RESISTANCE LIEE A L'ETAT ADHERANT ET/ OU EN BIOFILM

Dans la plupart des environnements, les bactéries existent le plus souvent au sein de biofilms. Les communautés bactériennes ainsi formées peuvent être considérées comme des « refuges » vis à vis des phénomènes de compétition, de prédation et des conditions environnementales défavorables (Korber *et al.*, 1995). Ce mode fixé confère donc aux micro-organismes des avantages particuliers tels qu'un apport plus important de molécules nutritives venues s'adsorber sur les surfaces, une modification de l'activité métabolique, la création d'une micro-zone favorisant les échanges, et comme évoqué précédemment un effet protecteur des exopolysaccharides muqueux produits après l'adhésion (Ashter *et al.*, 1990 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1991).

V.1. MÉCANISME GÉNÉRAL DE L'ADHÉSION

Comme schématisé sur la figure I-7, la formation d'un biofilm « mature » sur une surface s'effectue généralement selon les quatre étapes successives suivantes (Busscher, 1995) :

1 - **transport** des cellules vers le support solide par sédimentation (due aux forces de gravité), mouvement Brownien (mouvement perpétuel aléatoire), turbulence du liquide de suspension ou encore motilité des micro-organismes (cas des bactéries ciliées ou flagellées) (Korber *et al.*, 1995).

2 - **adhésion initiale**, par interactions physico-chimiques entre micro-organismes et support récepteur (Busscher et Weerkamp, 1987 ; van Loosdrecht *et al.*, 1990 ; An et Friedman, 1997).

3 - **consolidation de l'adhésion** par l'intermédiaire d'interactions moléculaires plus spécifiques entre le micro-organisme et le support (An et Friedman, 1995). Les structures polymériques permettant ces interactions moléculaires sont la capsule, le slime, le glycocalyx, les exopolymères, les fimbriae ou pili.

4 - **colonisation de la surface**. Cette colonisation résulte de la multiplication des micro-organismes. La croissance et la division des micro-organismes sont possibles principalement grâce aux nutriments *i.e.* protéines adsorbées à l'interface solide-liquide (van Loosdrecht *et al.*, 1990). Les bactéries adhérant à la surface sécrètent des polymères extracellulaires (EPS) ou glycocalyx qui emprisonnent les bactéries et les nutriments dans une matrice (Brading *et al.*, 1995). Cette couche muqueuse et les bactéries forment ainsi un biofilm (Korber *et al.*, 1995).

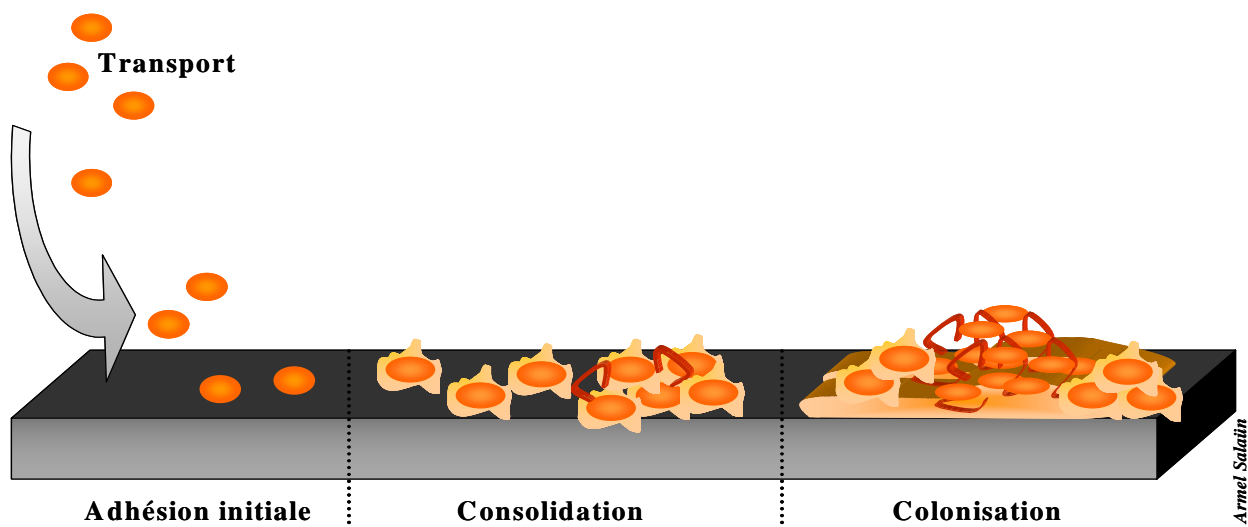


Figure I-7 : Etapes de la formation de biofilms microbiens (adapté de Bellon-Fontaine et Briandet, 2000).

L'adhésion est donc l'étape clé de la contamination des matériaux. Comme mentionné précédemment, la bioadhésion est le résultat d'interactions physico-chimiques non covalentes entre les macromolécules présentes à la surface des cellules microbiennes et le support

récepteur. Ces interactions non covalentes comprennent les interactions électrostatiques (EL), van der Waals (LW), Lewis acide-base (électron-donneur/électron-accepteur) (AB) ainsi que les interactions liées au mouvements brownien (BR) (van Oss *et al.*, 1988).

V.2. INTERACTIONS PHYSICO-CHIMIQUES NON COVALENTES

V.2.1. Interactions électrostatiques

Immergée dans un fluide, une particule, une bactérie ou une surface plane, acquiert une charge de surface provoquée par l'adsorption ionique ou l'ionisation des groupements chargés présents en surface (James, 1991). On observe alors une accumulation de contre-ions dans la zone entourant la particule, accumulation qui se traduit par la formation d'une double couche électrique (Figure II-2.).

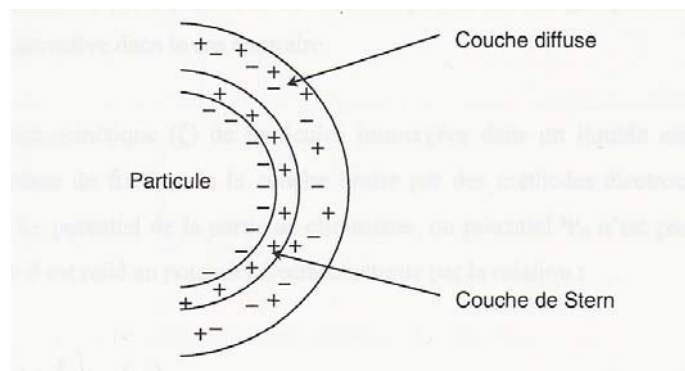


Figure I-8 : Structure de la double couche ionique (d'après Hiemez, 1997).

La première couche ou couche de Stern (approximativement de l'épaisseur d'un ion) est constituée d'ions fortement adsorbés sur la surface. Dans cette région, le potentiel (Ψ) est inversement proportionnel à la distance de séparation avec la surface (Figure II-3). La seconde couche, dite couche diffuse, s'étend jusqu'à la phase liquide. Dans cette zone, l'excès de contre-ions diminue progressivement lorsqu'on s'éloigne de la surface chargée, jusqu'à retrouver l'équilibre ionique de la phase aqueuse. Dans cette couche, le potentiel (Ψ) décroît exponentiellement avec la distance (Figure II-3).

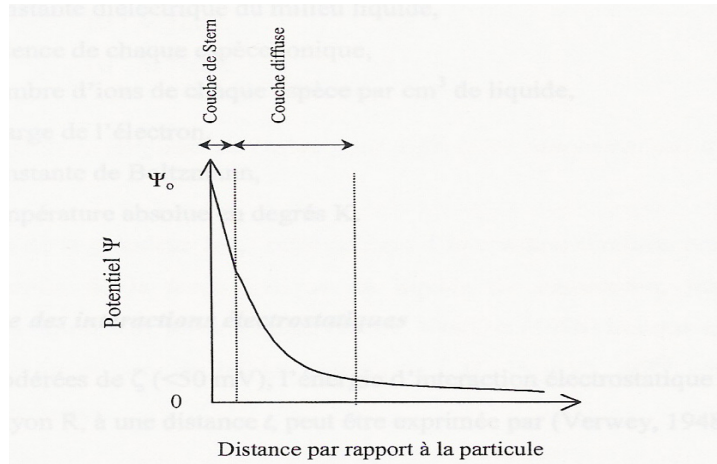


Figure I-9 : Représentation schématique de la variation de potentiel en fonction de la distance de la particule chargée (d'après Adamson, 1990).

Les interactions électrostatiques intervenant entre la surface d'un micro-organisme et la surface réceptrice sont dues au recouvrement de la double couche ionique associé aux groupements chargés présents à la surface des deux corps (Rutter, 1980). Cette interaction est répulsive pour deux corps portant des charges de surface de même signe et attractive dans le cas contraire.

L'énergie libre due aux interactions électrostatiques (ΔG^{EL}) entre une sphère de rayon R et une surface plane, peut être obtenue par la relation suivante (Visser, 1976) :

$$\Delta G^{EL} = R \Psi_0^2 \varepsilon \ln [1 + \exp(-\kappa \mathcal{L})] \quad [2]$$

où \mathcal{L} est la distance mesurée à partir du bord extérieur de la sphère ; Ψ_0 , le potentiel de surface ; ε , la constante diélectrique du milieu liquide et $1/\kappa$ la longueur de Debye.

Le potentiel Ψ_0 (ou potentiel de surface de la particule) n'est pas directement mesurable, mais on peut le déterminer via la mesure du potentiel zêta (ζ) (potentiel électrocinétique à la surface de friction de la couche limite par des méthodes électrocinétiques *i.e.* électrophorèse par la relation :

$$\Psi_0 = \zeta \left(1 + \frac{z}{a}\right) \exp(\kappa z) \quad [3]$$

avec :

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\varepsilon kT}{4 \pi e^2 \sum_i v_i^2 n_i}} \quad [4]$$

$1/\kappa$ correspond à la longueur de Debye (épaisseur de la couche ionique diffuse)

et z : distance entre la surface de la particule et la surface de friction,

a : le rayon de la particule,

ε : la constante diélectrique du milieu liquide,

v_i : la valence de chaque espèce ionique,

n_i : le nombre d'ions de chaque espèce par cm^3 de liquide,

e : la charge de l'électron,

k : la constante de Boltzmann,

T : la température absolue (K).

ΔG^{EL} étant fonction de la grandeur $1/\kappa$, cette énergie d'interaction diminue progressivement avec une augmentation de la force ionique du liquide de suspension, jusqu'à devenir négligeable dans les liquides de force ionique élevée.

De plus, en considérant l'expression [2], il est à noter que ΔG^{EL} diminue exponentiellement avec la distance de séparation (l) entre les deux corps.

V.2.2. Interactions non-électrostatiques

V.2.2.1. Interactions de Lifshitz - van der Waals (LW)

L'effet cumulatif de ces différentes interactions est groupé sous le terme d'interactions Lifshitz – van der Waals dans le cas d'un système macroscopique (Lifshitz, 1955).

L'énergie d'interaction liée aux forces de van der Waals entre deux corps 1 et 2, plongés dans le vide, est définie par l'équation de Dupré (1869) :

$$\Delta G_{12}^{LW} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_1^{LW} - \gamma_2^{LW} \quad [5]$$

La tension interfaciale liée aux forces de van der Waals entre ces deux corps, est donnée quant à elle par la relation (Good, 1960) :

$$\gamma_{12}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 \quad [6]$$

soit

$$\gamma_{12}^{LW} = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad [7]$$

La combinaison des équations [5] et [7], permet d'obtenir l'énergie d'interaction due aux forces de van der Waals :

$$\Delta G_{12}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad [8]$$

Ainsi, quelles que soient les valeurs de γ_1^{LW} et γ_2^{LW} (composantes van der Waals de la tension de surface des corps 1 et 2), ΔG_{12}^{LW} est négative, indiquant une attraction entre les deux corps.

Dans le phénomène d'adhésion de cellules microbiennes, trois corps sont généralement en présence ; il faut alors déterminer l'énergie d'interaction entre le micro-organisme (1) et le support (2) immergés dans un liquide (3). Dans ce cas, l'équation de Dupré peut alors s'écrire :

$$\Delta G_{132}^{LW} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_{13}^{LW} - \gamma_{23}^{LW} \quad [9]$$

En développant les valeurs de tensions interfaciales à l'aide de l'équation [7], on obtient :

$$\Delta G_{132}^{LW} = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} - \gamma_1^{LW} - \gamma_3^{LW} + 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_3^{LW}} - \gamma_2^{LW} - \gamma_3^{LW} + 2\sqrt{\gamma_2^{LW}\gamma_3^{LW}} \quad [10]$$

soit :

$$\Delta G_{132}^{LW} = 2\left(\sqrt{\gamma_3^{LW}} - \sqrt{\gamma_1^{LW}}\right)\left(\sqrt{\gamma_2^{LW}} - \sqrt{\gamma_3^{LW}}\right) \quad [11]$$

Dans ce cas, ΔG_{132}^{LW} est positif (interaction répulsive) pour $\gamma_1^{LW} < \gamma_3^{LW} < \gamma_2^{LW}$ ou $\gamma_1^{LW} > \gamma_3^{LW} > \gamma_2^{LW}$ et négatif dans les autres cas (interaction attractive). Dans le cas de deux corps immergés dans un liquide, il peut donc exister, sous certaines conditions, des interactions répulsives liées aux forces de van der Waals.

V.2.2.2. Interactions Lewis acide-base (AB)

L'énergie d'interaction liée aux forces acido-basiques de Lewis ΔG_{12}^{AB} entre deux corps 1 et 2 plongés dans le vide peut également être décrite par l'équation de Dupré :

$$\Delta G_{12}^{AB} = \gamma_{12}^{AB} - \gamma_1^{AB} - \gamma_2^{AB} \quad [12]$$

van Oss *et al.* (1988) expriment la tension de surface liée aux interactions Lewis acide-base d'un corps i par la relation :

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad [13]$$

et la tension superficielle liée aux interactions Lewis acide-base entre deux corps 1 et 2 par la relation :

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-}\right) \quad [14]$$

où γ^+ représente le paramètre accepteur d'électrons et γ^- le paramètre donneur d'électrons de la tension superficielle des corps 1 et 2.

En combinant les équations [12], [13] et [14], on obtient :

$$\Delta G_{12}^{AB} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}\right) \quad [15]$$

ΔG_{12}^{AB} est toujours négatif, traduisant ainsi une attraction entre les deux corps plongés dans le vide.

L'expression de l'énergie d'interaction entre deux corps 1 et 2 immergés dans un liquide 3 (cas de l'adhésion microbienne) peut être définie par :

$$\Delta G_{132}^{AB} = \gamma_{12}^{AB} - \gamma_{13}^{AB} - \gamma_{23}^{AB} \quad [16]$$

En introduisant les valeurs développées des tensions de surface liée aux forces Lewis acide-base à l'aide de l'équation [14], on obtient :

$$\Delta G_{132}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_3^+}\left(\sqrt{\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_3^-}\right) + \sqrt{\gamma_3^-}\left(\sqrt{\gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_3^+}\right) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}\right) \quad [17]$$

Il est important de souligner qu'en fonction des valeurs γ^+ et γ^- des trois corps en présence, ΔG_{132}^{AB} peut prendre des valeurs négatives (attraction) ou positives (répulsion).

V.2.2.3. Interactions liées au mouvement Brownien (BR)

Chaque molécule ou particule, immergée dans un milieu liquide, est dotée d'une énergie libre brownienne (BR) de $3/2 kT$ (van Oss, 1996), k étant la constante de Boltzmann et T la température absolue en degrés K. A condition que l'énergie d'attraction entre les molécules ou particules immergées dans le liquide soit inférieure à $3/2 kT$, l'énergie libre brownienne maintient les molécules en solution ou en suspension.

Toutes les entités immergées dans un liquide étant dotées d'une énergie BR de $3/2 kT$, cette contribution joue le plus grand rôle pour les particules de faible surface de contact. En effet, de par leur taille, elles sont moins susceptibles d'interagir avec les autres molécules par le biais d'interactions LW, AB ou EL.

V.3. EVALUATION DE L'ADHESION DES MICRO-ORGANISMES AUX SURFACES

L'adhésion des micro-organismes aux surfaces est réalisée par mise en contact d'une surface réceptrice avec une suspension microbienne titrée. Après un temps de contact défini,

le support solide est rincé afin d'éliminer les cellules microbiennes « simplement déposées ». Les micro-organismes adhérents sont alors dénombrés.

V.3.1. Dénombrement des cellules viables cultivables

Pour dénombrer les cellules viables adhérentes, il faut les décrocher du support solide soit par traitement aux ultra-sons soit en « grattant » les surfaces. Les micro-organismes ainsi récupérés sont alors ensemencés en gélose nutritive et incubés, généralement à leur température optimale de croissance. Cette technique ne permet cependant de déterminer que les formes viables et cultivables (Heidelberg, 1997). De plus, il est à noter que la remise en suspension des cellules décrochées implique une dilution et augmente ainsi le seuil de sensibilité de cette méthodologie. D'autres techniques doivent donc être mises en œuvre afin de compléter l'étude du comportement bioadhésif des micro-organismes aux surfaces.

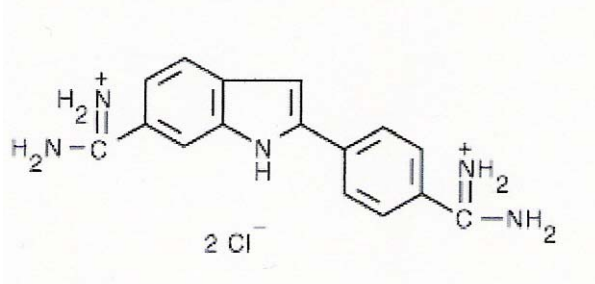
V.3.2. Observation *in situ*

L'observation microscopique des surfaces contaminées permet de déterminer la flore adhérente totale (micro-organismes viables - cultivables, viables non cultivables et mortes) ainsi que sa répartition sur les matériaux. Il est à noter que l'utilisation du microscope à transmission n'est possible que pour des matériaux transparents tels que le verre ou le polystyrène. De nombreux matériaux étant opaques, d'autres outils microscopiques doivent alors être employés. La microscopie à épifluorescence est donc très largement utilisée en microbiologie.

V.3.2.1. Flore totale

De nombreux colorants sont disponibles pour l'énumération de la flore totale. Parmi ceux-ci, l'orangé d'acridine et le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Figure II-10), sont les plus couramment employés.

DAPI



Orangé d'acridine

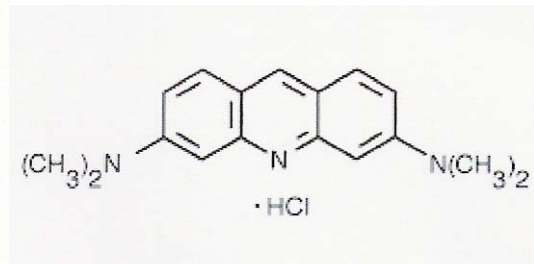


Figure I-10 : Formule chimique du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride) et de l'orangé d'acridine.

Le DAPI se lie spécifiquement à l'ADN alors que l'orangé d'acridine peut se fixer à l'ADN et aux ARN cellulaires (Mc Feters *et al.*, 1995).

Il est à noter que des techniques de marquage des cellules par des anticorps fluorescents permettent également de distinguer certaines espèces bactériennes au sein de populations plurimicrobiennes (Shapiro, 2000).

V.3.2.2. Différenciation entre cellules viables et cellules mortes

Afin de différencier les micro-organismes vivants et les micro-organismes morts, de nombreux marqueurs de viabilité sont actuellement proposés (Langsrud et Sundheim, 1996 ; Bunthof *et al.*, 1999 ; Mortimer *et al.*, 2000). Ces marqueurs de viabilité peuvent être classés en deux catégories (King, 2000) :

- indicateurs d'une activité métabolique : ces molécules en interagissant avec les systèmes enzymatiques cellulaires permettent la détection du fluorochrome dans les micro-organismes. C'est le cas notamment pour le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium (CTC) ou de la Rhodamine 123 (Lisle *et al.*, 1999 ; Suller et Lloyd, 1999).
- indicateurs d'intégrité membranaire tel que l'iodure de propidium ou encore le bromure d'éthidium (Figure II-11). Ces marqueurs ne pénètrent que dans les micro-organismes dont la membrane est lésée (King, 2000).

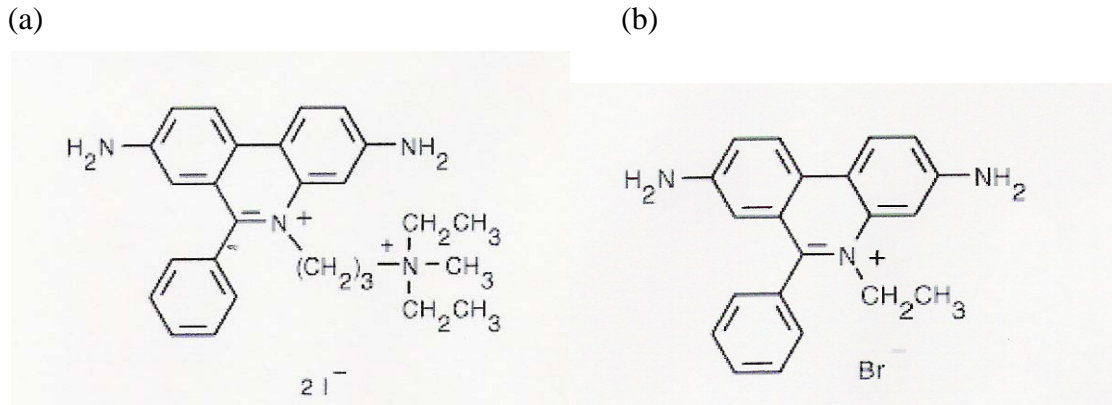


Figure I-11 : Formule chimique du iodure de propidium (a) et du bromure d'éthidium (b).

Compte-tenu de la diversité des molécules fluorescentes et des longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui leur sont associées (Tableau II-4), le choix des filtres permettant la sélection de ces longueurs d'onde restent une des étapes clé de l'adaptation des microscopes à épifluorescence à chaque fluorochrome (Figure II-12).

Fluorochrome	λ Excitation	λ Emission	Couleur émise
DAPI	358	461	Bleue
Orangé d'acridine	500	526	Verte (liaison à l'ADN)
	460	650	Orange (liaison aux ARN)
Iodure de propidium	535	617	Rouge
Bromure d'éthidium	518	605	Rouge

Tableau I-4 : Longueur d'onde, λ , d'excitation et d'émission (nm) de quelques fluorochromes fréquemment utilisés (<http://www.probes.com/handbook>).

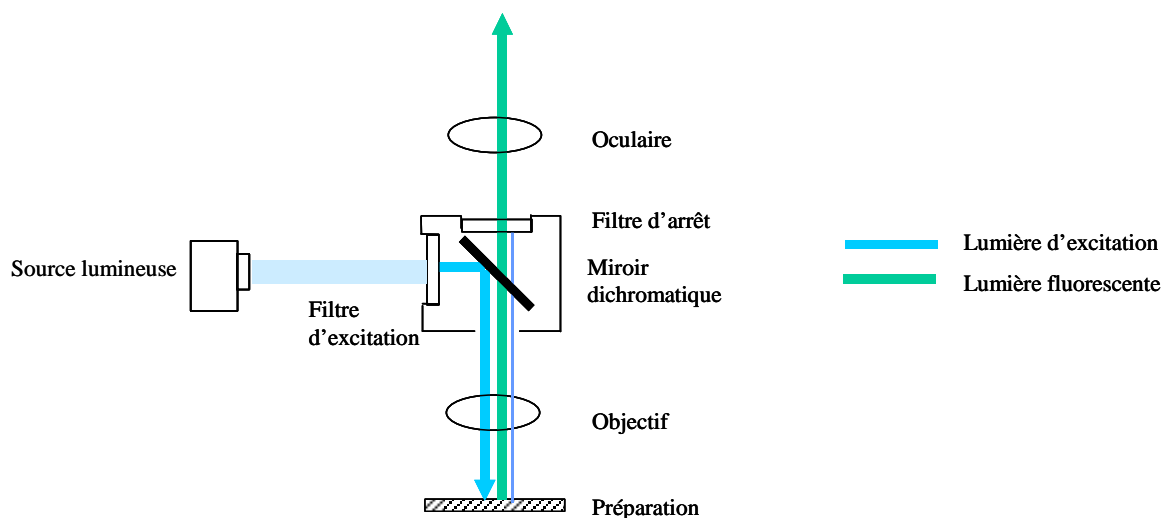


Figure I-12 : Représentation schématique de la fluorescence avec excitation par lumière réfléchie.

Le filtre d'excitation permet de sélectionner parmi les diverses longueurs d'onde de la source lumineuse uniquement celle qui sert à l'excitation de la fluorescence.

Le miroir dichroïque réfléchit le rayon d'excitation de courte longueur d'onde vers la préparation, mais se laisse traverser par la fluorescence de longueur d'onde plus grande.

Le filtre d'arrêt permet de stopper la lumière d'excitation, que la préparation réfléchit et renvoie vers l'objectif. Il est cependant parfaitement adapté aux rayons fluorescents spécifiques de la préparation.

V.4. FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER L'ADHESION BACTERIENNE

Comme nous l'avons précédemment décrit, la bioadhésion est dépendante de l'énergie d'interaction entre les corps en présence i.e. micro-organismes, substrat récepteur et fluide environnant. Ainsi, tous les paramètres susceptibles de modifier ces interactions peuvent potentiellement influencer l'adhésion microbienne sur un support solide en milieu aqueux.

V.4.1. Caractéristiques des cellules bactériennes

L'architecture et la nature des groupements chimiques présents à la surface des cellules microbiennes sont à l'origine de leurs propriétés physico-chimiques de surface (charge de surface, caractère Lewis acide-base et van der Waals) (van der Mei *et al.*, 1988 ; Hancock, 1991 ; Reid *et al.*, 1999).

La charge de surface des bactéries, généralement liée aux groupements ionisés (phosphates, carboxyliques, sulfates, amines) des macromolécules présentes à la surface des bactéries (Rijnaarts *et al.*, 1995) dépend de leur environnement aqueux (Mafu *et al.*, 1990). A quelques exceptions près (Jucker *et al.*, 1996), les bactéries sont généralement chargées négativement au pH physiologique.

Il est à noter que la synthèse de la plupart des constituants de la paroi cellulaire est spécifique à chaque souche et qu'elle peut évoluer en fonction de l'état physiologique des cellules (température de croissance, stade de croissance...), en modifiant ainsi leurs propriétés physico-chimiques de surface et donc leur comportement bioadhésif (Mc Eldowney et Fletcher, 1986b). Ainsi, les travaux de Garry (1997) et de Peng *et al.* (2001) ont mis en évidence une adhésion différente des formes sporulées de *Bacillus* comparativement aux formes végétatives.

De plus, il semblerait que la capacité d'adhésion des micro-organismes aux surfaces soit dépendante de leur capacité à synthétiser des polymères extracellulaires (Mafu *et al.*, 1990 ; Sasahara et Zottola, 1993). Cette caractéristique est d'autant plus importante que les cellules sont soumises à un flux hydrodynamique (Sasahara et Zottola, 1993 ; Vacheethasane *et al.*, 1998).

Enfin, la synthèse d'appendices exocellulaires (flagelles dans le cas de *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa*) peut faciliter le déplacement des micro-organismes favorisant ainsi le contact avec les surfaces réceptrices. Vatanyoopaisarn *et al.* (2000) ont ainsi mis en évidence une diminution d'un facteur 10 du niveau d'adhésion à l'acier inoxydable pour un mutant flagelline (-) comparativement à la souche sauvage *L. monocytogenes* NCTC 7973 cultivée à 22°C.

V.4.2. Caractéristiques des supports solides

Les micro-organismes parmi lesquels *L. monocytogenes*, peuvent adhérer à une grande variété de matériaux (Blackman et Franck, 1996) mais, en fonction des caractéristiques de surface de supports inertes, ce comportement bioadhésif peut varier. Ainsi, en étudiant la bioadhésion d'une espèce marine de *Pseudomonas* à différentes surfaces solides, Fletcher et Loeb (1979) ont pu classer les supports inertes en trois groupes en fonction de leur hydrophobicité de surface :

- le premier groupe comprend des polymères non-polaires.
- le second groupe est celui des polymères ayant des groupements polaires.
- le troisième groupe comprend les matériaux hydrophiles inorganiques.

Leurs résultats montraient une relation inversement proportionnelle entre l'adhésion bactérienne et la « mouillabilité » des supports. Il est à noter que pour des supports hydrophiles chargés négativement, l'adhésion était négligeable et inversement pour ceux chargés positivement. Leurs travaux mettaient ainsi en évidence l'importance de la charge électrique des supports hydrophiles et l'impact des interactions hydrophobes des polymères sur l'adhésion bactérienne. De même, Bellon-Fontaine *et al.* (1990) ont montré que l'adhésion de *S. thermophilus* variait en fonction du polymère synthétique utilisé, et qu'elle était reliée aux caractéristiques physico-chimiques de surface des différents supports.

Il est à noter qu'un traitement plasma (John *et al.*, 1996) ou encore une simple procédure de nettoyage (Boulangé-Petermann, 1993), en modifiant les propriétés physico-chimiques de

surface des matériaux inertes (hydrophobie, caractéristiques Lewis acide-base ou encore charge de surface), peuvent modifier l'adhésion bactérienne.

V.4.3. Caractéristiques des fluides environnants

Comme décrit précédemment, la force ionique du fluide environnant influence le comportement adhésif des cellules bactériennes aux surfaces inertes (van Loosdrecht, 1989). Ainsi, une concentration importante d'électrolytes ou la présence de contre-ions polyvalents induira une diminution des interactions électrostatiques et donc l'adhésion bactérienne sera modifiée (Piette et Idziak, 1992).

Outre la concentration, la nature des ions présents dans le liquide de suspension peut modifier l'adhésion bactérienne. En effet, Mc Eldowney et Fletcher (1986) ont montré que la nature et la valence des électrolytes présents dans le milieu de culture influençaient plus ou moins fortement l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* et *Enterobacter cloacae* à la surface de supports hydrophobes et hydrophiles.

Il est à noter que le pH de la solution environnante peut également avoir des répercussions directes sur l'adhésion bactérienne en modifiant, entre autres les caractéristiques électriques des différents corps en présence. Fletcher (1988) a ainsi constaté une augmentation de l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* au verre en milieu acide. Selon cet auteur, l'abaissement du pH, en réduisant la dissociation des groupements anioniques, diminuerait les répulsions électrostatiques existant entre les bactéries et le support.

V.4.4. Présence de matières interférentes

Dans l'environnement naturel des cellules microbiennes, des matières interférentes tels que des protéines, des résidus de produits de nettoyage, vont pouvoir s'adsorber aux interfaces solide/liquide et ainsi influencer le comportement bioadhésif des micro-organismes en modifiant les propriétés physico-chimiques de surface des supports solides (van Oss, 1996). Les interactions responsables de la bioadhésion ne se feront alors plus entre les micro-organismes et le support solide mais entre les bactéries et les molécules adsorbées.

Ainsi, Al-Makhlafi *et al.* (1994) ont observé que l'adsorption de β -lactoglobuline sur des surfaces de silice augmentait l'adhésion de *L. monocytogenes*. En revanche, l'adsorption de sérum albumine bovine (Allion, 2000 ; Chevallier, 2002 ; Rubio, 2002) ou de protéines d'origine laitière (Bower *et al.*, 1998 ; Barnes, 1999) en modifiant les caractéristiques

physico-chimiques de surface des matériaux (caractère hydrophile, Lewis acide/base) peut diminuer l'adhésion des micro-organismes aux surfaces réceptrices.

De plus, il est à noter que ces matières interférentes, présentes dans le fluide environnant, peuvent s'adsorber à la surface des cellules bactériennes et, en changeant leurs propriétés de surface, influencer leur comportement bioadhésif (Fletcher, 1976). Ainsi, la sérum albumine bovine, adsorbée à la surface de *Lactococcus lactis*, entraîne une diminution de l'hydrophilie de surface de cette souche et par conséquent une réduction de son niveau d'adhésion au verre. (Allion, 2000).

Enfin, la synthèse et l'excrétion de molécules tensioactives (biosurfactants) par certaines espèces bactériennes, en modifiant les caractéristiques physico-chimiques des interfaces vont également pouvoir modifier l'adhésion bactérienne (Meylheuc, 2000).

Compte tenu d'un environnement différent comparativement à l'état planctonique, cet état adhérent pourra alors entraîner une évolution du comportement physiologique des bactéries et notamment une augmentation de leur résistance aux agents désinfectants.

V.5. ADHESION ET RESISTANCE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS

Différentes études (Best *et al.*, 1990 ; Baillie et Douglas, 1998 ; Joseph *et al.*, 2001 ; Aaron *et al.*, 2002 ; Campanac *et al.*, 2002) ont montré que les micro-organismes adhérents ou en biofilm pouvaient être 10 à 1000 fois plus résistants aux agents antimicrobiens que leurs homologues planctoniques. La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens est multifactorielle. Elle dépend notamment de la présence et de la composition du glycocalyx, de l'état physiologique des bactéries ou encore de leur localisation des cellules au sein du biofilm, facteurs décrits ci-après.

V.5.1. Présence du glycocalyx

Les biofilms bactériens sont caractérisés par une « proche juxtaposition » des cellules entre elles et généralement par la présence d'une matrice exopolysaccharidique. Ce glycocalyx peut avoir un rôle protecteur en limitant l'accès des antimicrobiens aux micro-organismes ou en « consommant » les agents désinfectants avant qu'ils n'atteignent les cellules microbiennes (De Beer *et al.*, 1994). Ainsi, Samrakandi *et al.* (1997) ont observé que l'efficacité bactéricide

du chlore variait en fonction du contenu extracellulaire en polysaccharides de biofilms de *E. coli*.

Cette efficacité moindre peut s'expliquer par une diffusion limitée des désinfectants au sein des biofilms. En effet, Guiot *et al.* (2002) ont pu, par spectroscopie à corrélation de fluorescence, mettre en évidence une diffusion différente de particules de latex (de taille et de charge de surface variables) dans des biofilms synthétisant peu (*Lactococcus lactis*) ou au contraire beaucoup (*Stenotrophomonas maltophilia*) d'exopolysaccharides.

Anderl *et al.* (2000) ont quant à eux étudié la diffusion de l'ampicilline et de la ciprofloxacine au sein de biofilms de *K. pneumoniae*. Ils ont pu observer que l'ampicilline ne pouvait pas diffuser dans les biofilms quand les cellules synthétisaient l'enzyme de dégradation de cet antibiotique (une β -lactamase). En revanche, il est à noter que même si la diffusion n'était pas gênée pour le mutant déficient en β -lactamase, ou pour la ciprofloxacine quelle que soit la souche, ces agents antibactériens n'étaient pas capables de tuer toutes les cellules du biofilm. Ces résultats suggèrent donc que des mécanismes autres qu'une diffusion limitée puissent être impliqués dans la résistance des micro-organismes « biofilmés » aux agents antimicrobiens.

V.5.2. Etat physiologique des cellules adhérentes

Différentes études ont mis en évidence que l'adhésion des micro-organismes aux surfaces pouvait s'accompagner d'importantes modifications phénotypiques des cellules microbiennes. Ainsi, les travaux de Williams *et al.* (1999) et de Luppens *et al.* (2002) ont mis en évidence une augmentation du temps de génération des cellules de *S. aureus* suite à leur adhésion ainsi qu'une diminution de leur taille. Des études ont montré que cet état « fixé » entraînait une modulation de l'expression des gènes bactériens (Stanley *et al.*, 2003) et par conséquent une variation de la synthèse de nombreux constituants cellulaires. Ainsi, des protéines de surface, des exopolysaccharides (Davies *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1993 ; Takeo *et al.*, 1994) peuvent être surexprimés chez des cellules adhérentes. En revanche les cellules fixées synthétiseraient peu ou pas certains appendices cellulaires tels que les flagelles, nécessaires à leur mobilité (McCarter *et al.*, 1988). L'augmentation de résistance à la désinfection des cellules adhérentes comparativement aux cellules planctoniques peut alors être liée à une modification des interactions entre les micro-organismes et les agents désinfectants suite à cette évolution phénotypique.

V.5.3. Localisation au sein du biofilm

Les conditions environnementales à la surface et au sein des biofilms sont différentes de celles de la phase aqueuse. Ces différences concernent le pH, les concentrations en ions, l'osmolarité, la viscosité, la disponibilité des nutriments et les échanges gazeux (Prigent-Combaret et Lejeune, 1999). En effet, l'oxygénation et la disponibilité en nutriments ne sont pas équivalentes en tous points des biofilms bactériens. Ainsi, Xu *et al.* (1998) ont montré que l'activité physiologique des cellules coïncidait avec le gradient d'oxygène établi au sein d'un biofilm de *P. aeruginosa*. De même, la disponibilité en nutriments, variant au sein des micro-colonies, conduit également à une hétérogénéité spatiale de l'activité métabolique des bactéries (Huang *et al.*, 1998). Les micro-organismes synthétisent donc leurs constituants cellulaires en fonction de leur localisation au sein des biofilms et donc de leur temps de génération (Choo-Smith *et al.*, 2001).

Si la sensibilité à certains agents antibactériens est affectée par ce taux de croissance cellulaire, les micro-organismes situés au centre des biofilms, ayant une croissance ralentie comparativement aux cellules en périphérie pourront être moins sensibles à ces agents bactéricide (Walters III *et al.*, 2003).

Ces variations phénotypiques ont également pu être mises en évidence à différentes phases du développement des biofilms (Sauer *et al.*, 2002). Ces multiples phénotypes bactériens au sein des biofilms, en modifiant les interactions possibles avec les agents désinfectants pourront donc entraîner une diminution de la sensibilité bactérienne.

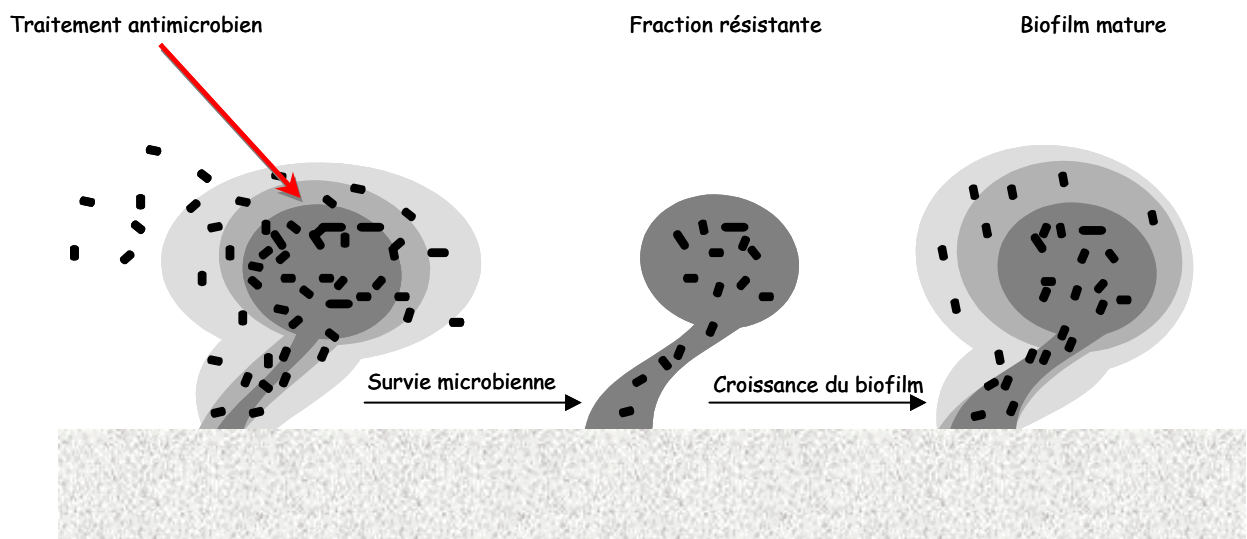


Figure I-13 : Schématisation de la résistance aux biocides des variants phénotypiques au sein des biofilms (d'après Drenkard, 2003).

Comme mentionné précédemment, l'activité bactéricide des agents antimicrobiens est dépendante de la structure du biofilm. Ainsi la multiplication des phénotypes bactériens au sein des biofilms couplé à une diminution de l'accès des désinfectants aux cellules (problème de diffusion, surface de contact entre les molécules désinfectantes et les cellules plus faible) pourra augmenter la résistance des micro-organismes aux traitements de désinfections. Une fraction de la population microbienne pourra ainsi survivre et se multiplier entraînant par conséquent des contaminations « chroniques » des matériaux (Figures I-7).

VI. CONCLUSION

L'adhésion des micro-organismes aux surfaces, facteur non négligeable dans la résistance microbienne aux désinfectants, est comme cette dernière dépendante de l'espèce bactérienne considérée mais également de l'origine de la souche et de ses conditions de croissance. Compte tenu des différents facteurs décrits précédemment, les micro-organismes adhérents et/ou en biofilms sont très difficiles à éliminer et sont donc une source récurrente de contamination des aliments dans le secteur agro-alimentaire et d'infection nosocomiales dans le domaine hospitalier.

Or, comme nous l'avons mentionné, il n'y a pas de protocole standardisé pour évaluer l'activité bactéricide des désinfectants sur cellules adhérentes et/ ou en biofilm. De plus, les techniques actuellement disponibles pour tester le pouvoir bactéricide de produits antimicrobiens sont longues et lourdes à mettre en œuvre. Ainsi, afin d'améliorer l'efficacité des formulations antimicrobiennes, il semble donc essentiel d'établir i) un protocole reproductible d'adhésion et de ii) mettre en place une technique rapide d'évaluation de l'activité bactéricide des désinfectants in situ, protocole applicable dans des conditions modèles mais également en présence de matières encrassantes simulant les situations réelles d'utilisation.

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

I. SOUCHES BACTERIENNES

I.1. SOUCHES TESTEES

Comme indiqué dans le tableau II-1, l'ensemble des travaux a été réalisé avec 3 espèces bactériennes pathogènes pour l'homme et fréquemment rencontrées dans le domaine médicale ou dans les industries agro-alimentaires : un coque à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus*) (Figure II-1a), un bacille à coloration de Gram positive (*Listeria monocytogenes*) (Figure II-1b) et un bacille à coloration de Gram négative (*Pseudomonas aeruginosa*) (Figure II-1c).

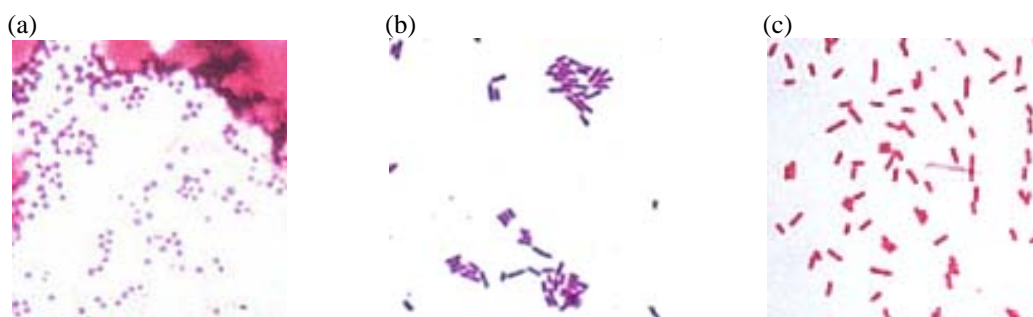


Figure II-1 : Coloration de Gram de *S. aureus* (a), *L. monocytogenes* (b) et *P. aeruginosa* (c).

<http://www.pasteur.fr/infosci/biblio/phototheque.html>.

Coloration de Gram	Identification	Origine de la souche
-	<i>P. aeruginosa</i> CIP A22	Institut Pasteur
-	<i>P. aeruginosa</i> 222P	Isolat clinique
+	<i>S. aureus</i> CIP 53154	Institut Pasteur
+	<i>S. aureus</i> 221P	Isolat clinique (résistant à la méticilline)
+	<i>L. monocytogenes</i> CIP 103575	Institut Pasteur
+	<i>L. monocytogenes</i> 129P	Industrie Agro-Alimentaire
+	<i>L. monocytogenes</i> 177P	Industrie Agro-Alimentaire

Tableau II-1 : Caractéristiques et origine des souches bactériennes.

Trois souches de collection ont ainsi été utilisées : *L. monocytogenes* 103575, *P. aeruginosa* A22 et *S. aureus* 53154 (ces deux dernières souches servent à déterminer l'activité bactéricide des produits utilisés comme désinfectants selon l'association française de normalisation).

A ces trois souches de collection a été ajoutée, pour compléter la première partie de ce travail, une souche sauvage psychrotrophe isolée de l'industrie alimentaire, *L. monocytogenes* 129P.

Enfin, les tests de désinfection sur cellules planctoniques et adhérentes ont été étendus à trois souches sauvages isolées du secteur agro-alimentaire ou médical comme indiqué dans le tableau II-1.

I.2. CONDITIONS DE CONSERVATION

Pour chacune de ces souches et conformément à la norme NF EN 12353 (Anonyme, 2000), deux types de stocks de travail ont été réalisés, l'un conservé à -80°C et l'autre à 4°C .

Le stock à -80°C a été réalisé par mise en suspension des micro-organismes dans du TSB (Tryptone Soja Bouillon, Biomérieux, France) avant étalement sur gélose TSA (Tryptone Soja Agar, Biomérieux, France). Après 24h d'incubation à 37°C , le tapis bactérien ainsi formé était récupéré dans 10 mL de solution cryoprotectrice (extrait de bœuf : 3 g/L, tryptone digestion pancréatique : 5 g/L et glycérol 150 g/L). La suspension bactérienne obtenue était alors diluée au $1/10^{\text{ème}}$ avec la même solution cryoprotectrice puis incubée 30 minutes à 20°C . Elle était ensuite répartie par aliquotes de 200 μL en cryotubes avant stockage à -80°C , comme indiqué sur la figure II-2.

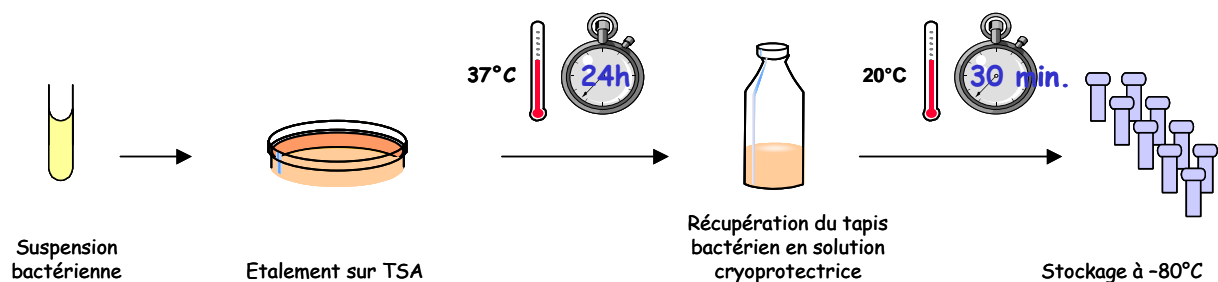


Figure II-2 : Schéma du protocole de conservation à -80°C .

Le stock à 4°C était quant à lui obtenu à partir de cultures bactériennes stockées à -80°C . Un isolement était réalisé sur gélose TSA avant d'être incubé 24h à 37°C . Après formation des colonies, les géloses étaient conservées à 4°C (Figure II-3).

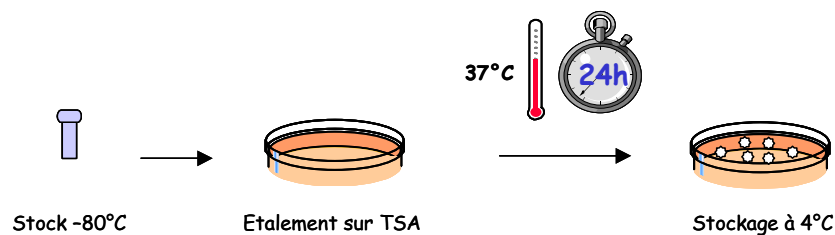


Figure II-3 : Schéma du protocole de conservation à 4°C.

I.3. CONDITIONS DE CROISSANCE

I.3.1. Croissance sur milieu solide (TSA)

Les cultures de travail étaient obtenues après 3 repiquages successifs de 24h à 37°C sur gélose en pente des micro-organismes conservés à -80°C ou à 4°C.

I.3.2. Croissance en milieu liquide (TSB)

Pour les croissances en bouillon nutritif, les cellules bactériennes (100 µL du stock à -80°C ou une colonie du stock à 4°C) étaient remises en suspension dans 9 mL de TSB. Après 24h d'incubation à 37°C, 1 mL de ces suspensions bactériennes était réensemencé dans 9 mL de TSB stérile puis incubé à 37°C pendant 8h. La culture de travail était obtenue par ensemencement d'un millilitre du second repiquage dans 100 mL de TSB suivi d'une incubation à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance.

I.3.3. Préparation des suspensions bactériennes

Les cultures bactériennes étaient récupérées et lavées par une succession de trois centrifugations (7000g, 10 min., 4°C) et de remises en suspension dans le liquide approprié à la technique mise en œuvre *i.e.* NaCl 150 mM, NaCl 1,5 mM ou eau dure à 20°F (Annexe I).

I.4. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SURFACE DES CELLULES BACTERIENNES

I.4.1. La méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents)

Le caractère hydrophobe/hydrophile et les propriétés Lewis acide-base des cellules bactériennes ont été déterminées par la méthode MATS (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Cette méthode est basée sur la comparaison de l'affinité d'une souche pour un solvant apolaire et un solvant monopolaire. Le solvant monopolaire peut être acide ou basique (au sens de Lewis), mais les deux solvants doivent posséder la même énergie libre de surface liée au caractère de Lifshitz-van der Waals (Tableau II-2). Sur cette base, deux couples de solvants ont été

choisis : le couple chloroforme (Sigma), solvant accepteur d'électrons/ hexadécane (Sigma) et le couple acétate d'éthyle (Sigma), solvant donneur d'électrons/ décane (Sigma).

Solvants	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,7	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0

Tableau II-2 : Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour le test MATS (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Expérimentalement, 2,4 mL de suspension bactérienne ajustée à une densité optique d'environ 0,8 (soit 10⁹ UFC/mL) à 400 nm (A_0) avec une solution de NaCl 150 mM étaient vortexés avec 0,4 mL de chacun des solvants pendant 2 minutes afin d'obtenir une émulsion (Figure II-4). Après 15 minutes de décantation, la densité optique de la phase aqueuse (A_1) était mesurée à 400 nm.

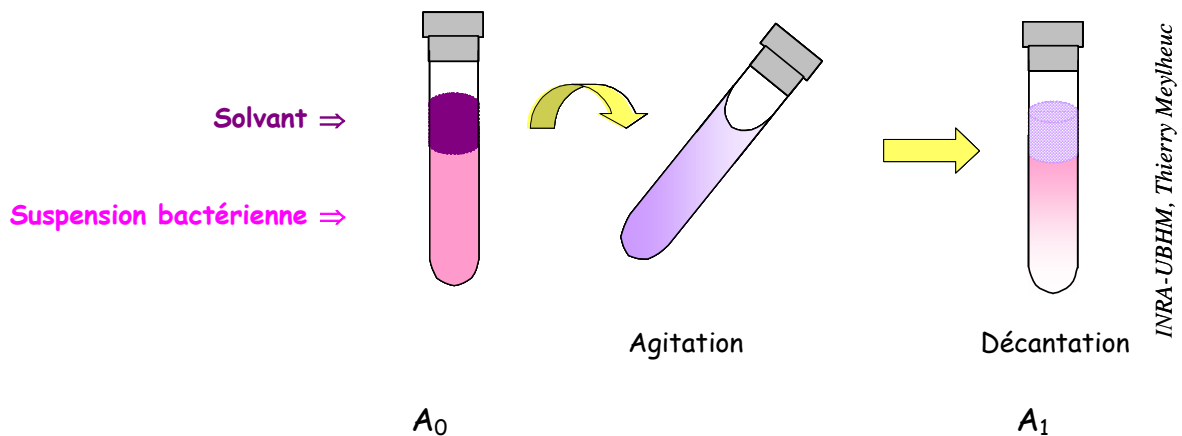


Figure II-4 : Représentation schématique du test MATS permettant la mesure de l'affinité de cellules microbiennes pour différents solvants.

Le pourcentage d'affinité des bactéries aux solvants était déduit de la relation [1].

$$\text{Affinité (\%)} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad [1]$$

I.4.2. Détermination de la charge de surface des bactéries par micro-électrophorèse

Les propriétés électriques des micro-organismes ont été évaluées par des mesures de mobilité électrophorétique des bactéries dans du NaCl 1,5 mM sur une gamme de pH allant de 2 à 9. Le pH était ajusté par ajout de KOH ou de HNO₃. Les mesures étaient réalisées sous un champ électrique de 50 Volts à l'aide d'un Zêtamètre laser (CAD Instrumentation, France) couplé à un microscope BX 40 (Olympus, France) et à un système d'analyse d'images (Figure II-5).

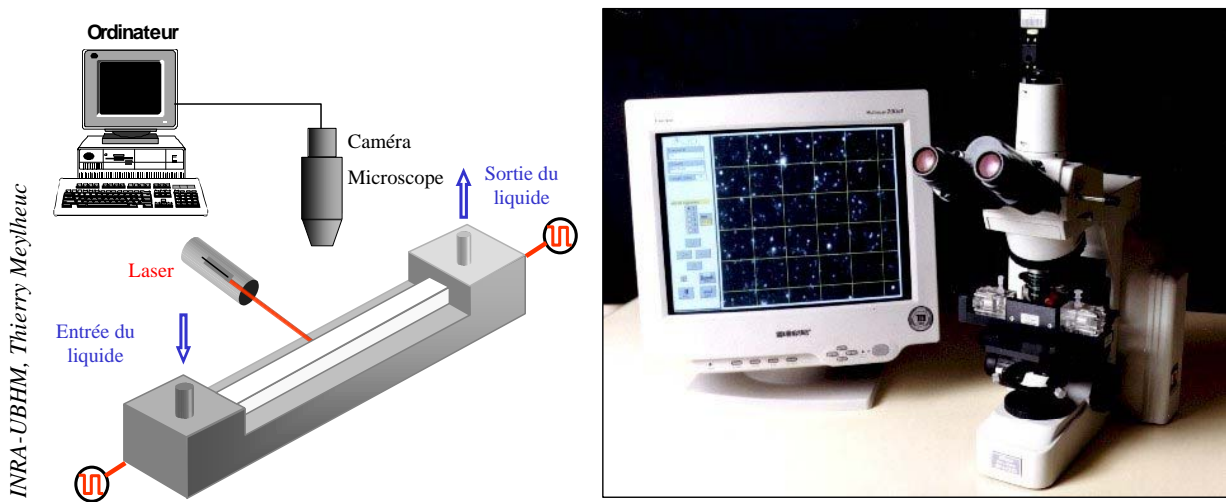


Figure II-5 : Dispositif expérimental du zêtamètre laser zétaphoremeter II®.

Le sens du déplacement des micro-organismes permet de déterminer le signe de leur charge globale de surface alors que leur vitesse de déplacement (V) sous l'action d'un champ électrique (E) peut être reliée à la mobilité électrophorétique (ME) selon l'équation:

$$ME = V/E \quad [2]$$

où V est exprimée en m/s et E en V/m.

Afin de s'affranchir de la mobilité autonome des cellules de *P. aeruginosa* (présence de flagelles polaires), un traitement de 15 minutes des cellules par une solution de formaldéhyde, à la concentration finale de 0,7% (v/v) était réalisé préalablement à la préparation des suspensions bactériennes comme préconisé par Bouttier *et al.* (1997).

II. SUPPORTS SOLIDES

II.1. SUPPORTS TESTES

Deux types de matériaux couramment employés dans le secteur médical et dans les industries agro-alimentaires ont été sélectionnés pour cette étude : un support moyennement hydrophile, l'acier inoxydable AISI 316 (Goodfellow, Angleterre) dont la composition est donnée en annexe et un matériau hydrophobe, le PTFE ou PolyTétraFluoroEthylène encore appelé Téflon[®] (Goodfellow, Angleterre).

II.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS SOLIDES

Avant utilisation, les échantillons étaient nettoyés par immersion dans un bain de RBS 35 (Société des Traitements Chimiques de Surface, Lille) à 2% (v/v) dans de l'eau chaude, sous agitation douce pendant 15 minutes. Cette étape de nettoyage était suivie de 5 rinçages de 5 minutes dans de l'eau chaude et de 5 rinçages de 5 minutes dans de l'eau osmosée (Infilco, Angleterre) à température ambiante. Enfin, les échantillons étaient séchés sous hotte à flux laminaire pour éviter tout risque de contamination.

Pour la préparation de l'acier inoxydable, une étape préliminaire de dégraissage était réalisée avec un mélange acétone / éthanol à 50% (v/v).

II.3. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SURFACE DES SUPPORTS SOLIDES

II.3.1. Energie de surface des supports solides

Les caractéristiques énergétiques de surface des supports plans ont été obtenues à partir de mesures d'angles de contact par la méthode de la goutte posée (Figure II-6) à l'aide d'un goniomètre (G40, Krüss, Allemagne) (Figure II-7).

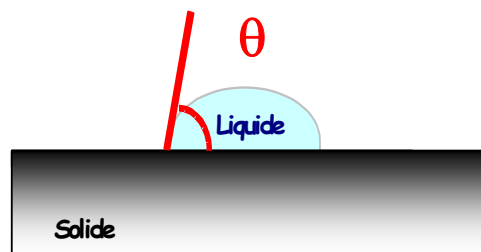


Figure II-6 : Représentation de l'angle de contact (θ) d'une goutte déposée sur une surface solide.

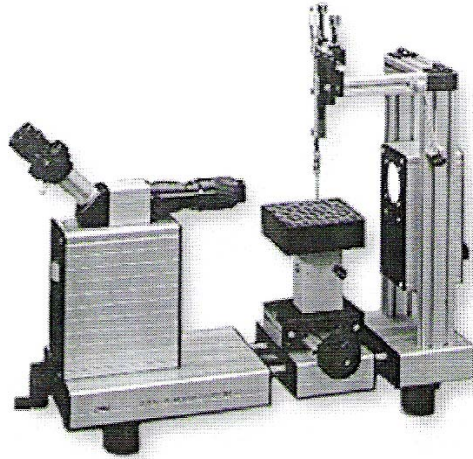


Figure II-7 : Goniomètre G40 (Krüss, Allemagne).

Les angles de contact, θ , étaient mesurés avec trois liquides purs de caractéristiques énergétiques connues (Tableau II-3) : l'eau distillée (Infilco), le formamide (Sigma) et le diiodométhane (Sigma). L'énergie de surface des supports γ_s , ainsi que leurs composantes van der Waals γ^{LW} , donneur d'électrons (ou Lewis-base) γ^- et accepteur d'électrons (ou Lewis-acide) γ^+ étaient déterminées à partir de l'équation de Young - van Oss (van Oss, 1988) :

$$\gamma_L \left(1 + \cos \theta \right) = 2 \left(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+} \right) \quad [3]$$

Liquides	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Eau distillée	21,8	25,5	25,5
Diiodométhane	48,5	0	0
Formamide	39	2,3	39,6

Tableau II-3 : Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électron (γ^+) et donneur d'électron (γ^-) de l'énergie libre de surface des trois liquides utilisés dans la méthode des angles de contact.

Ainsi, connaissant les énergies de surface des trois liquides utilisés, les composantes γ^{LW} , γ^+ et γ^- du support ont pu être calculées grâce à un système de trois équations à trois inconnues.

II.3.2. Caractérisation de la surface des matériaux inertes par microscopie de force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy)

La surface des échantillons solides a été étudiée à l'aide d'un microscope à force atomique (Picoscan SPM, Molecular Imaging) schématisé sur la Figure II-8.

Le capteur est un ressort-lame (ou cantilever), encastré à une extrémité et muni d'une pointe à l'autre. La lecture de la déflexion du ressort s'effectue par la mesure de la déviation d'un faisceau lumineux, émis par une diode laser, et réfléchi par l'extrémité du cantilever grâce à une diode photoélectrique segmentée. La connaissance de l'éclairement reçu par les différents cadrans, pour une géométrie donnée, donne ainsi accès aux angles de déflexion et de torsion à l'extrémité du cantilever et donc aux déplacements du capteur sur la surface étudiée.

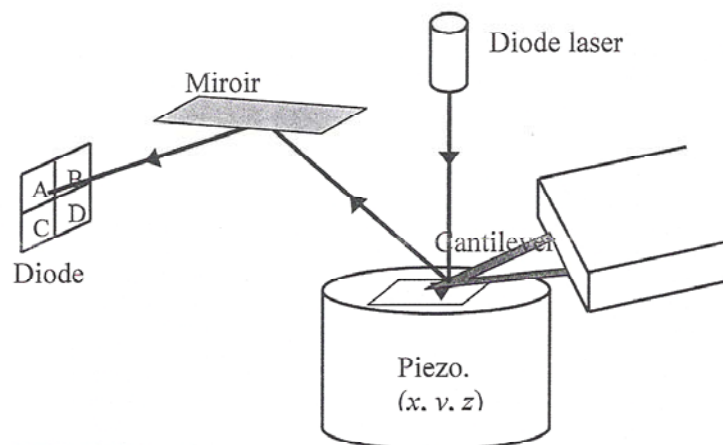


Figure II-8 : Représentation schématique d'un microscope de force atomique.

Les images en mode contact ont été réalisées à force constante avec des pointes en nitrure de silicium, la force appliquée était négligeable. La pointe « touche » donc la surface comme dans un dispositif palpeur ; le déplacement du capteur permet ainsi d'obtenir la topographie de la surface étudiée.

III. CONDITIONNEMENT DES SUPPORTS SOLIDES

Deux types de conditionnement ont été testés au cours de cette étude :

- un conditionnement avec des souillures organiques afin de simuler les encrassements « types » du secteur agro-alimentaire ou du domaine médical,

- un conditionnement avec des agents antimicrobiens pour évaluer l'impact des résidus d'agents de désinfection sur la viabilité cellulaire, situation susceptible d'être retrouvée en l'absence de procédures de rinçage efficaces.

III.1. LIQUIDES DE SUSPENSION

Les différentes molécules utilisées pour le conditionnement de surface des matériaux étaient mises en solution soit en eau distillée soit en eau dure titrée à 20°F (Annexe I).

III.2. SOLUTIONS CONDITIONNANTES

III.2.1. Solutions encrassantes (Adaptées de la norme NF EN 1276, 1997)

L'encrassement des surfaces solides a été réalisé avec une solution protéique modèle, le Sérum Albumine Bovine (SAB) et avec une souillure organique complexe (le lait entier).

III.2.1.1. Solution protéique modèle

La sérum albumine bovine a été choisie pour simuler non seulement des encrassements des industries agro-alimentaires mais également du secteur médical. En effet, avec 76% d'homologie de séquence (Carter, 1994) la sérum albumine bovine (Sigma, France, fraction V, pureté : 96% minimum) nous a permis de remplacer la sérum albumine humaine (SAH), pour l'application médicale, dont le coût est plus important. La solution protéique était stérilisée par filtration sur filtre de porosité 0,22 µm (Steriflip, Millipore, France) et utilisée à une concentration de 1% (p/v).

III.2.1.2. Souillure complexe

Une solution à 10% (p/v) de lait entier (Régilait, France) dans de l'eau distillée était préparée et stérilisée 5 min. à 121°C. Cette solution était ensuite diluée afin d'avoir une concentration finale de 1% (v/v) de lait reconstitué.

III.2.2. Principes actifs désinfectants

Trois agents antibactériens commercialisés ont également été utilisés pour le conditionnement des supports solides. Ils appartiennent à des familles chimiques distinctes et sont couramment employés dans les formulations nettoyantes et/ou désinfectantes. Il

s'agissait de l'Oxy-Anios 5 (Laboratoires ANIOS, France), du Bardac 22-50 (Lonzagroup, Suisse) et du Vantocil IB (Avecia, Angleterre). Les principes actifs de ces antimicrobiens sont recensés dans le Tableau II-4.

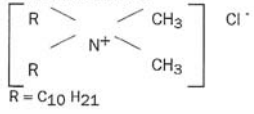
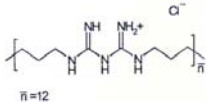
Nom Commercial	Principe Actif	Concentration dans la solution commerciale (p/p)	Concentration d'utilisation (ppm)
Bardac 22-50	Chlorure de N, N-didécy-N, N-diméthylammonium (CDDMA) 	50%	250
Vantocil IB	Chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB) 	5%	50
Oxy-Anios 5	Acide Peracétique (APA) CH ₃ -CO-O-OH	5%	250

Tableau II-4 : Principes actifs et concentration d'utilisation des désinfectants.

III.3. PROTOCOLE DE CONDITIONNEMENT

Les échantillons solides étaient immergés 1 heure à 20°C dans l'une des solutions conditionnantes. Après ce temps de contact, les molécules non adsorbées étaient éliminées par 5 rinçages successifs à l'eau distillée ou à l'eau dure. Les échantillons ainsi conditionnés étaient alors analysés, par mesures d'angles de contact ou AFM, ou utilisés pour les essais d'adhésion des micro-organismes aux surfaces.

IV. ADHESION DES MICRO-ORGANISMES AUX SUPPORTS SOLIDES

IV.1. TESTS D'ADHESION

Les essais d'adhésion en conditions statiques ont été réalisés par sédimentation des suspensions bactériennes (ajustées à environ 10⁸UFC/mL) pendant 3 heures à 20°C sur les supports solides. Après ce temps de contact, les bactéries non adhérentes étaient éliminées par cinq rinçages successifs avec une solution de NaCl 150 mM stérile (Figure II-9).

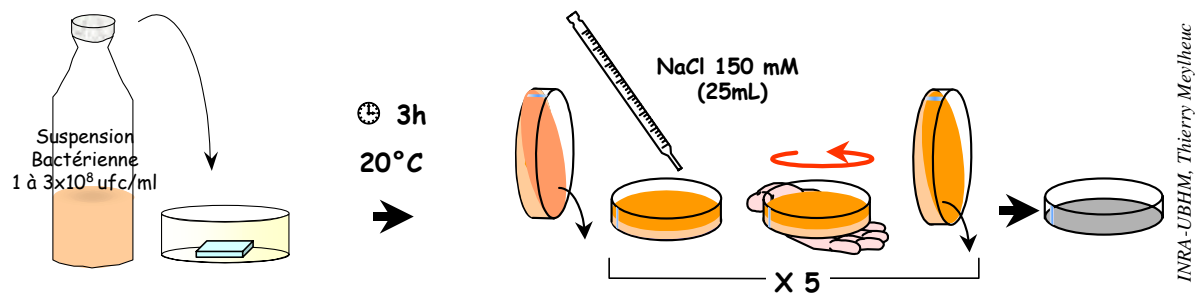


Figure II-9 : Schéma du protocole d'adhésion des micro-organismes aux surfaces.

IV.2. DENOMBREMENT DES CELLULES ADHERENTES

IV.2.1. Flore totale

Afin de pouvoir observer la totalité des cellules adhérentes aux supports récepteurs *i.e.* mortes, viables non cultivables et viables cultivables, nous avons utilisé un fluorochrome classiquement employé pour estimer la flore totale : l'orangé d'acridine. En effet, ce colorant se lie à la fois à l'ADN et à l'ARN, quelle que soit l'activité métabolique des micro-organismes.

Expérimentalement, les bactéries adhérentes étaient colorées par une solution d'orangé d'acridine (Sigma) à 0,01% (m/v) pendant 15 minutes. Après un rinçage avec du NaCl 150 mM stérile, les échantillons étaient séchés sous hotte à flux laminaire. Les surfaces colorées étaient alors observées au microscope à épifluorescence DMBL Leica (objectif x10). Le microscope était relié à une caméra CCD haute performance (Cohu, Japon) et à un ordinateur pour l'acquisition des images (en noir et blanc) avec le logiciel OPTIMAS (Imasys, France). L'ensemble des images collectées a été analysé avec le logiciel UTHSCSA Image Tool (USA) afin d'obtenir le pourcentage de recouvrement et la répartition des bactéries sur les surfaces. Dix champs par échantillon de 2,8 cm² ont été observés.

IV.2.2. Flore viable cultivable

Les dénombrements de la flore viable cultivable étaient obtenus après immersion des échantillons contaminés dans 5 mL de NaCl 150mM et action des ultrasons (47MHz, Branson 1510, France) pendant 3 minutes suivis d'une agitation mécanique de 30s. La suspension bactérienne était alors ensemencée en gélose TSA, selon la méthode des dilutions décimales suivie d'une incubation de 48h à 37°C (Figure II-10).

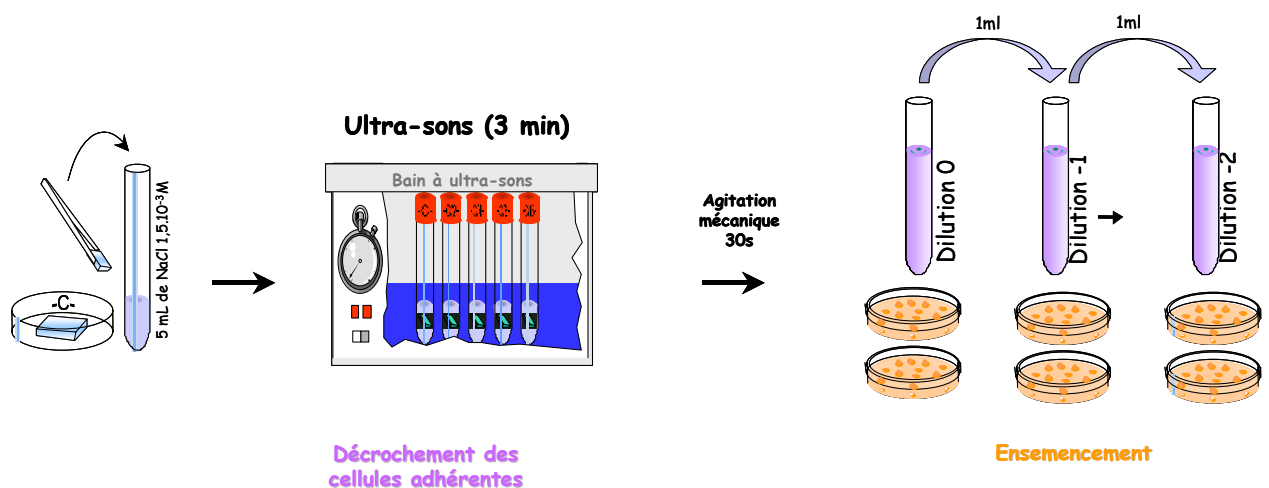


Figure II-10 : Schéma du protocole de dénombrement des cellules adhérentes.

V. TESTS DE DESINFECTATION SUR CELLULES PLANCTONIQUES

V.1. AGENTS ANTIMICROBIENS

Les désinfectants utilisés étaient ceux précédemment décrits pour le conditionnement de surface des supports solides (cf. § III.2.2) *i.e.* l'acide peracétique (APA), le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA) et le chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB). Ils étaient dilués avec de l'eau distillée stérile.

V.2. TESTS SUR CELLULES PLANCTONIQUES – APPLICATION DE LA NORME NF-EN 1040

V.2.1. Activité bactéricide des principes actifs

Expérimentalement, 1 mL de suspension bactérienne ajustée à environ 10^8 ufc/mL (**N**) était mélangé à 9 mL de solution désinfectante. Après 5 min. de contact à 20°C, 1 mL de ce mélange était transféré dans 9 mL de neutralisant et mis 5 min. à 20°C. Les dénombrements des micro-organismes survivants (**Na**) étaient réalisés par la technique des dilutions décimales et ensemencement en gélose TSA suivie de 48h d'incubation à 37°C (Figure II-11).

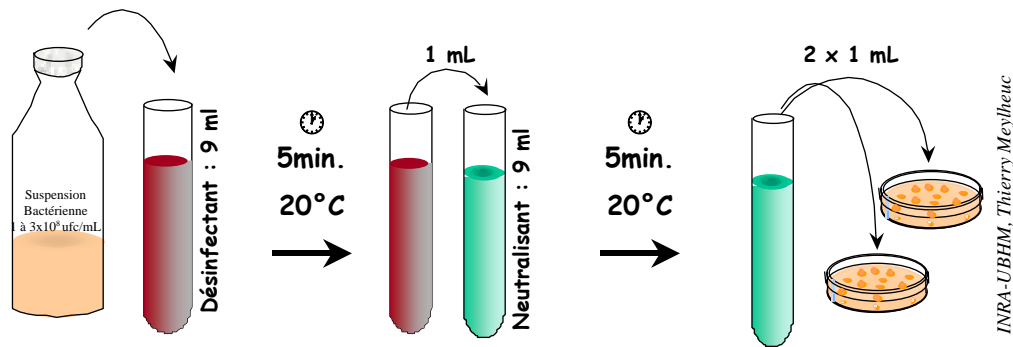


Figure II-11 : Protocole du test de désinfection sur cellules planctoniques (adapté de la norme AFNOR NF-EN 1040).

V.2.2. Témoin de non - toxicité et de neutralisation

1 mL de désinfectant (ou 1 mL d'eau distillée stérile pour établir la non-toxicité du neutralisant) était ajouté à 9 mL de solution neutralisante. Après 5 min. d'inactivation, 1 mL de suspension bactérienne ajustée à 10^3 ufc/mL (Nv) était ajouté et placé 30 min. à 20°C. 1 mL de cette suspension étaitensemencé en gélose TSA et incubé 24 à 48h à 37°C. La croissance des micro-organismes indique ainsi l'effet protecteur de la solution neutralisante contre les agents antimicrobiens, ainsi que son innocuité envers les cellules bactériennes. Les dénombrements devaient donc être supérieurs ou égaux à 0,05 fois Nv. La méthode a ainsi été validée avec un neutralisant contenant 1 g/L d'histidine (Sigma), 3 g/L de lécithine d'œuf (Sigma), 30 g/L de saponine (Sigma), 5 g/L de thiosulfate de sodium (Merck) et 30 g/L de Tween 80 (Prolabo, France).

Les tests de désinfection ont été réalisés sur au moins trois cultures microbiennes indépendantes (sur TSA ou en TSB) et avec des solutions de désinfectants préparées extemporanément.

VI. TESTS DE DESINFECTION SUR CELLULES ADHERENTES – MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE PERMETTANT D'EVALUER L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS

VI.1. ACTIVITE BACTERICIDE DES PRINCIPES ACTIFS

L'activité bactéricide des désinfectants était testée selon un protocole inspiré de la norme NF-EN 1040. Expérimentalement, les supports contaminés étaient déposés dans des boîtes de Pétri (\varnothing 55mm), puis recouverts de 10 mL de solution désinfectante (à raison d'une concentration par boîte de Pétri). Après 5 min. \pm 5 s de contact, le désinfectant était éliminé et

remplacé par 10 mL de neutralisant pour une phase de neutralisation de 5 min. \pm 5 s (Figure II-12).

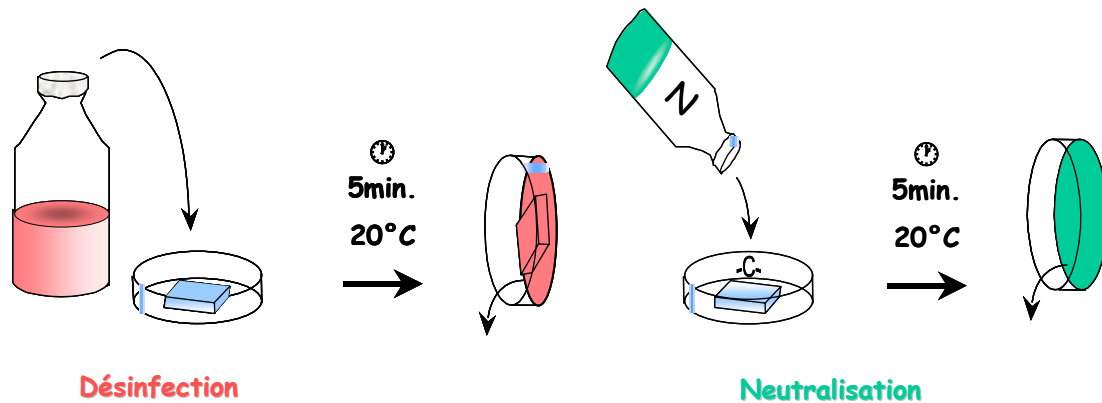


Figure II-12 : Schéma du protocole de désinfection sur cellules adhérentes.

VI.2. DENOMBREMENT DES CELLULES VIABLES CULTIVABLES

Comme indiqué précédemment, les supports contaminés étaient immergés dans 5mL de NaCl 150mM puis placés dans un bain à ultrasons (47MHz, Branson 1510) pendant 3 minutes. Après une agitation mécanique de 30s, les dénombrements des cellules étaient effectués par ensemencement en gélose TSA, selon la méthode des dilutions décimales suivie d'une incubation de 48h à 37°C (Figure II-10). Les résultats étaient exprimés en Log₁₀ (ufc/cm²).

VI.3. TEMOIN DE TOXICITE ET DE NEUTRALISATION

Pour chaque essai de désinfection, 3 témoins étaient réalisés. Un témoin (N₀) déterminant la concentration en cellules présentes lors du test de désinfection ; un témoin (N_t) vérifiant la non-toxicité du neutralisant sur les cellules bactériennes et un témoin (N_n) validant l'inactivation du désinfectant par le neutralisant.

N₀ : les supports contaminés étaient mis en contact avec 10 mL d'eau distillée stérile à la place du désinfectant.

N_t : 10 mL de neutralisant étaient déposés sur les supports et laissés en contact pendant 10 min. \pm 5 s.

N_n : 0,5 mL de désinfectant (de la concentration la plus élevée) étaient mélangé à 9,5 mL de neutralisant pendant 5 min. \pm 5 s. Les échantillons solides étaient ensuite immergés dans cette solution pendant 10 min \pm 5s.

VII. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE RAPIDE PERMETTANT DE DETERMINER *IN SITU* L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS

Pour évaluer rapidement et *in situ* l'activité désinfectante d'agents antimicrobiens sur des cellules adhérentes, nous avons employé la microscopie à épifluorescence. Pour cela, deux fluorochromes ont été utilisés : le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Sigma, France) qui se fixe spécifiquement à l'ADN des cellules bactériennes quelle que soit leur activité métabolique (cellules viables et non viables) ; et le SYTOX Green® (Molecular Probe, Interchim, France) qui ne pénètre que dans les cellules dont la membrane cytoplasmique est endommagée (cellules non viables) pour se fixer à l'ADN et à l'ARN (Roth *et al.*, 1997) (Figure II-13). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de ces fluorochromes sont regroupés dans le tableau II-5.

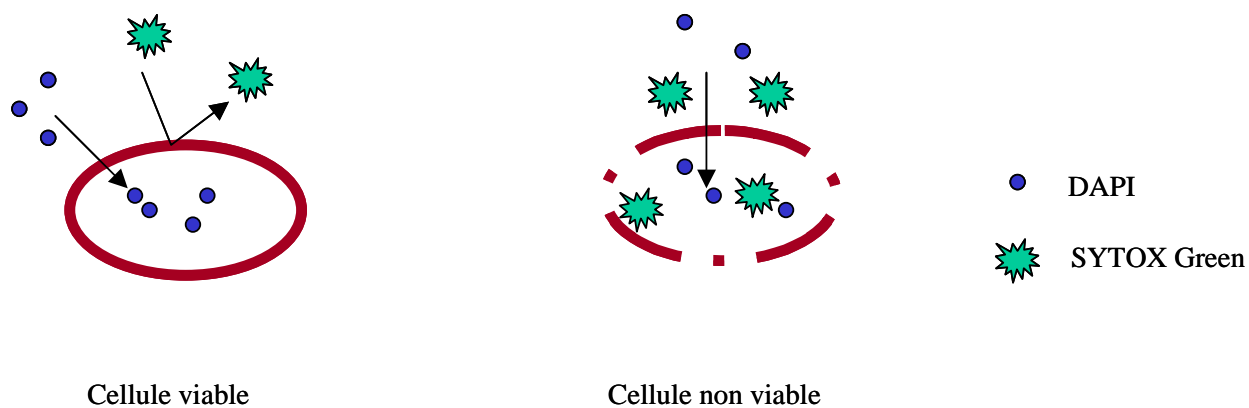


Figure II-13 : Schéma de la double coloration.

Fluorochromes	Maximum d'absorption	Maximum d'émission	Couleur
SYTOX Green®	504 nm	523 nm	Vert
DAPI	345 nm	455 nm	Bleu

Tableau II-5 : Maximum d'absorption et d'émission des fluorochromes sélectionnés.

VII.1. MISE AU POINT DE LA COLORATION SUR CELLULES PLANCTONIQUES

Cette technique de coloration faisant l'objet d'une mise au point, le protocole sera discuté en détails dans la partie III : Résultats - Discussion. Ici ne seront décrites que les principales étapes de cette technique de coloration.

VII.2. TEMOIN

4 mL de suspension bactérienne (ajustée à environ 10^8 ufc/mL) et 1 mL de solution colorante étaient mélangés et incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 minutes. Afin d'éliminer les colorant en excès, les cellules bactériennes étaient lavées par une centrifugation (7 000 g, 10 min, 4°C) et remises en suspension dans une goutte d'huile de montage afin d'éviter les problèmes de « palissement » de la fluorescence. 10µL de cette suspension étaient déposés sur une lame de microscope, recouverte d'une lamelle couvre-objet et immédiatement observée au microscope à épifluorescence en utilisant les couples filtre d'excitation/filtre d'arrêt spécifiques de chaque fluorochrome (Tableau II-6).

N° de Filtre	Bande passante du Filtre d'excitation	Miroir dichromatique	Filtre d'arrêt	Fluorochrome détecté
1	340-380	400	425	DAPI et SYTOX Green®
2	480 / 40	505	527 / 30	SYTOX Green®

Tableau II-6 : Caractéristiques des filtres utilisés pour les observation au microscope à épifluorescence.

VII.3. TEST DE DESINFECTION SUR CELLULES PLANCTONIQUES

Les cellules bactériennes étaient mises en contact avec de l'eau distillée ou une solution de désinfectant à 20 ppm d'acide peracétique selon le protocole décrit précédemment (cf. V-2.1). Afin d'éliminer les matières interférentes, les suspensions bactériennes étaient centrifugées à 7000g pendant 10 min (4°C). Le culot bactérien était alors remis en suspension dans 4 mL NaCl 0,15M et coloré selon le protocole décrit ci-dessus (cf. VII.1.2).

VII.4. COLORATION DES CELLULES ADHERENTES

Après adhésion et dans certains cas désinfection, les échantillons contaminés étaient recouverts avec la solution contenant les 2 fluorochromes et laissés en contact pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Après élimination et rinçage de la solution colorante, les échantillons étaient recouverts d'huile de montage puis d'une lamelle couvre - objet.

Les bactéries colorées étaient alors observées au microscope à épifluorescence DMBL Leica (objectif x40). Le microscope était relié à une caméra CCD haute performance (Cohu, Japon) et à un ordinateur pour l'acquisition des images (en noir et blanc) avec le logiciel OPTIMAS

(Imasys, France). Un même champ était observé en utilisant les couples filtre d'excitation/filtre d'arrêt des deux fluorochromes (Tableau II-6).

L'ensemble des images collectées était analysé avec le logiciel UTHSCSA Image Tool (USA) afin d'obtenir le pourcentage de recouvrement et la répartition des bactéries sur les surfaces. Ainsi, la comparaison des 2 images obtenues pour chacun des champs analysés a permis d'estimer la population bactérienne morte par rapport à la population totale (Tableau II-7). Dix champs par échantillon ont été observés.

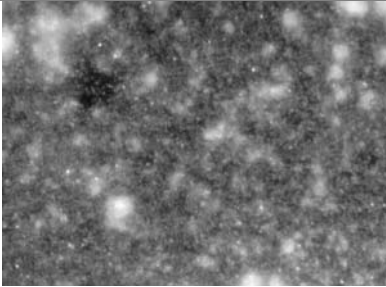
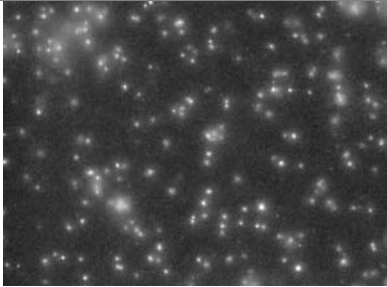
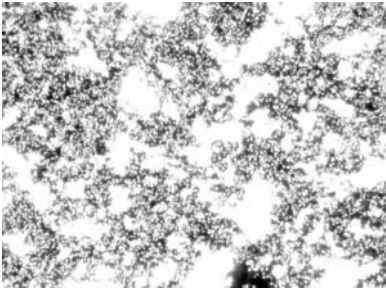
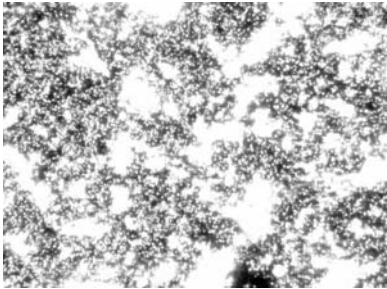
	Flore totale	Cellules mortes
Avant désinfection		
Après désinfection		

Tableau II-7 : Observations au microscope à épifluorescence (obj.x40) de la flore totale adhérente et des cellules non viables avant et après désinfection avec l'acide peracétique.

VIII. ANALYSE STATISTIQUE

Des analyses de variance ANOVA ainsi que des analyses en composantes principales (ACP) des résultats ont été réalisées avec le logiciel Statgraphics Plus pour Windows (Manugistic™, Rockville, Md).

PARTIE III : RESULTATS - DISCUSSION

I. CONDITIONS DE CONSERVATION ET DE CROISSANCE DES SOUCHES BACTERIENNES

I.1. IMPACT SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES

Afin de choisir les conditions de conservation et de croissance les mieux adaptées au problème posé, nous avons testé deux modes de conservation couramment utilisés et un milieu de culture présenté sous deux états physiques différents *i.e.* solide (agar) et liquide (bouillon).

Les souches bactériennes sélectionnées étaient ainsi conservées en solution cryoprotectrice à -80°C et sur gélose à 4°C pendant 0, 1 et 2 mois. Les mesures de mobilité électrophorétique, et les caractères hydrophobe/hydrophile et accepteur/donneur d'électrons étaient déterminés après croissance des bactéries à 37°C sur TSA en pente ou en TSB.

Les essais ont été réalisés avec trois micro-organismes de collection couramment préconisés dans les normes de désinfection (*Pseudomonas aeruginosa* A22, *Staphylococcus aureus* 53154 et *Listeria monocytogenes* 103575) ainsi qu'avec une souche sauvage isolée d'un site industriel (*Listeria monocytogenes* 129P).

I.1.1. Mobilité électrophorétique

Les résultats des mesures de mobilité électrophorétique obtenus pour chacune des souches sélectionnées et les différentes conditions de conservation et de croissance testées sont présentés dans le Tableau III-1.

Quelles que soient l'espèce microbienne considérée et les conditions expérimentales utilisées (stockage et croissance), les souches présentent une électronégativité de surface sur la gamme de pH étudiée. Une variation dans les mesures de mobilité électrophorétique entre les différentes souches étudiées a cependant pu être observée. Ainsi, bien que toutes les cellules bactériennes soient chargées négativement, cette électronégativité de surface est moins importante pour *S. aureus* 53154 dont toutes les valeurs de mobilité électrophorétique sont inférieures à $-2 \times 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

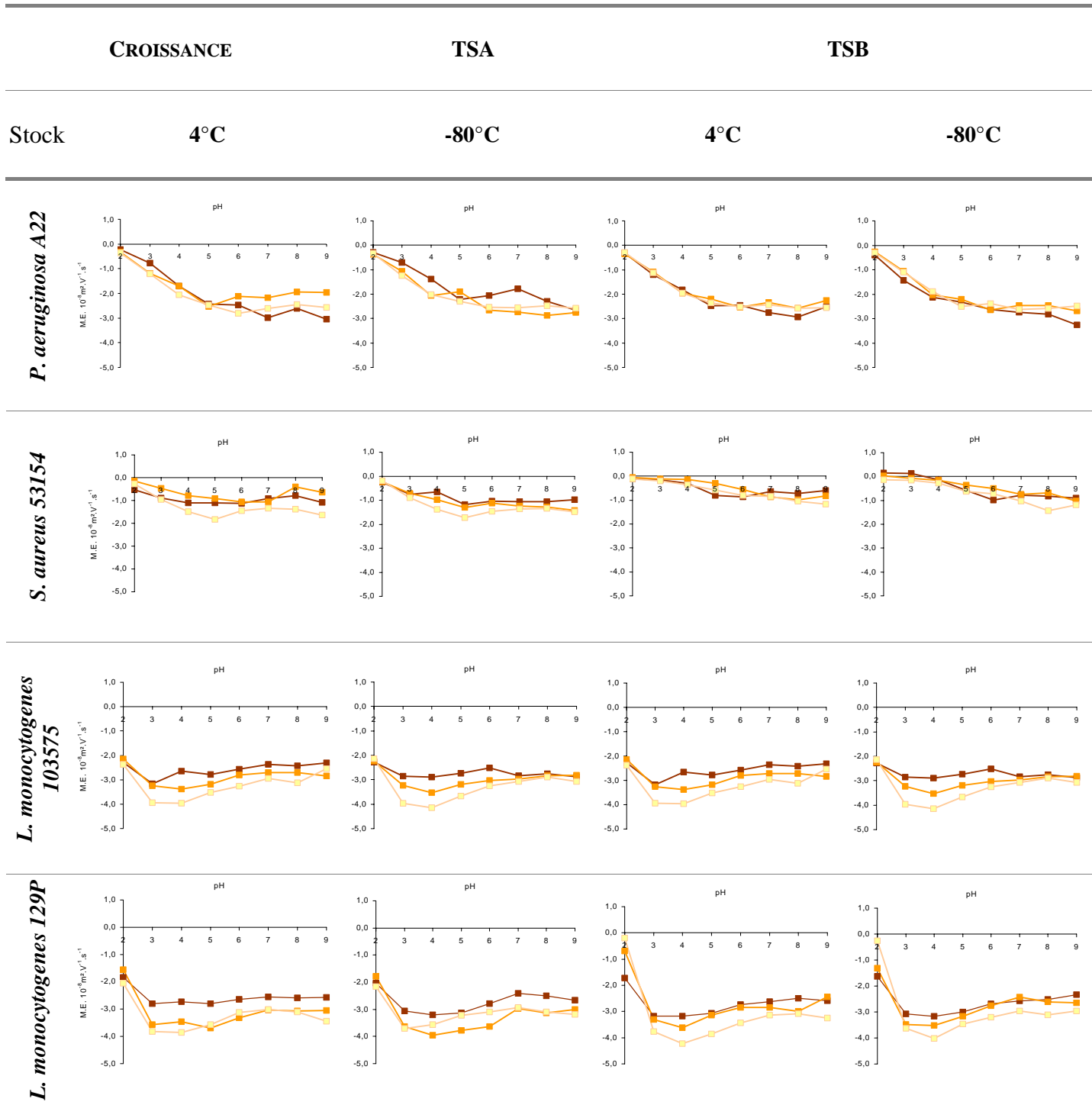


Tableau III-1 : Mobilité électrophorétique (M.E.) sur une gamme de pH allant de 2 à 9 pour chacune des souches étudiées en fonction des conditions de conservation (à 4 et -80°C pendant 0, 1 et 2 mois) et de croissance (TSA et TSB).

Par ailleurs et en accord avec les données décrites par Mafu *et al.* (1990) et Briandet (1999), les deux souches de *Listeria monocytogenes* sont très fortement chargées négativement, avec des valeurs généralement supérieures à $-2.10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ sur la gamme de pH étudiée. Enfin, les cellules de *P. aeruginosa* A22 présentent une importante électronégativité de surface

sur la gamme de pH allant de 6 à 9. On peut observer qu'aux pH acides, les valeurs de mobilité électrophorétique diminuent jusqu'à devenir presque nulles à pH 2, charge de surface probablement due à la présence de groupements carboxyliques et phosphates des polysaccharides constitutifs de la paroi bactérienne (Rijnaart *et al.*, 1995).

Si cette propriété électrique reste stable pour la souche à Gram négatif sélectionnée, elle évolue néanmoins pour les trois germes à Gram positif. Ainsi, nous pouvons observer une augmentation significative ($P < 0,05$) de la charge globale de surface des souches, en fonction de la durée de stockage et ce, pour une température de conservation de 4°C. Cet effet est particulièrement important pour les deux *L. monocytogenes* ($P < 0,05$), espèce bactérienne pouvant croître à 4°C (Seeliger et Jones, 1986; Papageorgiou et Marth, 1989). En revanche, à -80°C, aucun effet significatif de cette durée de stockage n'a pu être mis en évidence sur les caractéristiques électriques de surface des différentes bactéries testées ($P > 0,05$).

Concernant les conditions de croissance des micro-organismes, en accord avec les données obtenues par Kiers *et al.* (2001), un impact non négligeable de l'état physique du milieu de culture sur les propriétés électriques des trois bactéries à Gram positif peut être noté. Dans nos conditions expérimentales, la culture des micro-organismes sur TSA conduit (en comparaison à une croissance en TSB) à une augmentation de l'électronégativité de surface pour *S. aureus* 53 154 et à une diminution de cette propriété pour les deux *L. monocytogenes*.

Comme le montrent les mesures de mobilité électrophorétique représentées sur les figures III-1 et III-2, nous avons également remarqué que la nature du milieu de croissance avait un impact sur l'homogénéité des propriétés électriques de surface des cellules bactériennes. Ainsi, quelle que soit la température de stockage, la mobilité électrophorétique des cellules de *S. aureus* 53154 cultivées en TSB est comprises entre -1 et $0,6 \cdot 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec un maximum à $0 \cdot 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En revanche, et suite à une croissance sur TSA, les mesures de mobilité électrophorétique des cellules de *S. aureus* sont situées entre -3 et $0 \cdot 10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, réparties en plusieurs groupes. Ces résultats mettent donc en évidence des populations bactériennes ayant des charges de surface différentes au sein d'une même culture, signe d'une population hétérogène (hétérogénéité pouvant être reliée à des états physiologiques différents).

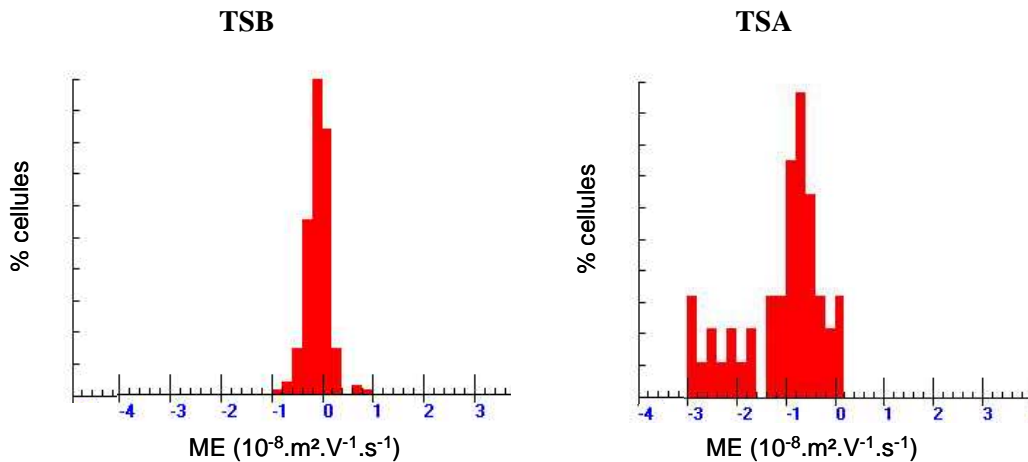


Figure III-1: Mobilité électrophorétique à pH 4 de *S. aureus* 53154 conservée 1 mois à 4°C en fonction du mode de croissance.

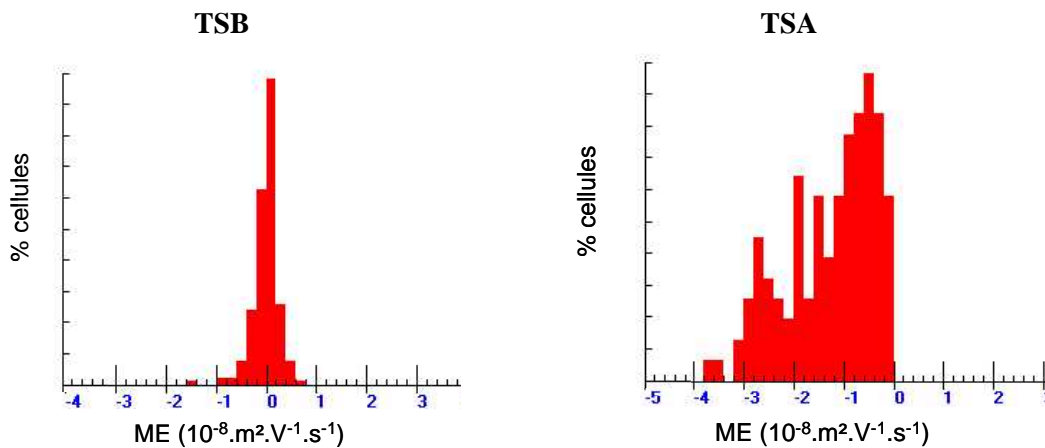


Figure III-2: Mobilité électrophorétique à pH 4 de *S. aureus* 53154 conservée 1 mois à -80°C en fonction du mode de croissance.

I.1.2. Test MATS

Les résultats des tests MATS sont regroupés dans les tableaux III-2 à I-5 pour respectivement *S. aureus* 53 154, *P. aeruginosa* A22, *L. monocytogenes* 129P et 103575.

Quels que soient le mode, le temps de stockage ainsi que le milieu de culture utilisé, *P. aeruginosa* A22 est apparue fortement hydrophile (faible affinité à l'hexadécane et au décane) alors que les trois bactéries à Gram positif affichaient une hydrophilie de surface intermédiaire (environ 50% d'affinité aux solvants apolaires). L'architecture et la nature des groupements chimiques présents à la surface des cellules bactériennes déterminent les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes (Hancock, 1991 ; Neidhardt *et al.*, 1994). Ainsi, l'affinité négligeable aux solvants apolaires de *P. aeruginosa* A22 pourrait être attribuée à la partie hydrophile des lipopolysaccharides présents à la surface des bactéries à Gram négatif alors que le faible caractère hydrophile des bactéries à Gram positif pourrait être relié aux acides lipotéichoïques, macromolécules hydrophobes, ancrés dans leur paroi.

Milieu	Stock	Temps (mois)	CH	HD	D	A E	Milieu	Stock	Temps (mois)	CH	HD	D	A E
TSA	+4°C	0	74 ± 2	2 ± 1	0 ± 0	27 ± 6	TSA		0	98 ± 1	64 ± 7	61 ± 7	13 ± 10
		1	70 ± 5	1 ± 2	0 ± 0	26 ± 1			1	98 ± 2	77 ± 10	79 ± 8	40 ± 28
		2	66 ± 9	5 ± 4	2 ± 3	24 ± 5			2	97 ± 2	74 ± 11	74 ± 11	56 ± 30
	-80°C	0	74 ± 4	2,6 ± 3	2 ± 2	26 ± 8		0	96 ± 3	59 ± 7	67 ± 12	8 ± 7	
		1	71 ± 12	3 ± 3	2 ± 2	25 ± 6		1	97 ± 2	69 ± 15	77 ± 9	35 ± 31	
		2	68 ± 3	7 ± 7	6 ± 5	25 ± 4		2	98 ± 1	76 ± 4	74 ± 5	51 ± 22	
TSB	+4°C	0	84 ± 5	0 ± 1	0 ± 0	29 ± 12	TSB		0	94 ± 4	47 ± 8	60 ± 9	2 ± 2
		1	79 ± 3	2 ± 2	0 ± 1	33 ± 1			1	98 ± 2	66 ± 8	75 ± 5	4 ± 4
		2	84 ± 4	6 ± 2	2 ± 1	25 ± 1			2	96 ± 4	61 ± 14	62 ± 15	10 ± 11
	-80°C	0	83 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	31 ± 10		0	97 ± 4	45 ± 6	69 ± 9	1 ± 1	
		1	81 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	28 ± 7		1	98 ± 3	68 ± 9	72 ± 10	12 ± 10	
		2	74 ± 5	4 ± 2	1 ± 2	26 ± 3		2	96 ± 3	58 ± 15	69 ± 18	8 ± 8	

Tableau III-3 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH : Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de *P. aeruginosa* A22 en fonction des conditions de conservation et de croissance.

Tableau III-2 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH: Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de *S. aureus* 531.54 en fonction des conditions de conservation et de croissance.

Milieu	Stock	Temps (mois)	CH	HD	D	A E
TSA		0	80 ± 5	50 ± 7	53 ± 7	36 ± 2
		1	90 ± 1	56 ± 1	55 ± 2	33 ± 1
		2	89 ± 4	54 ± 3	59 ± 8	28 ± 2
	+4°C	0	76 ± 5	53 ± 7	58 ± 6	36 ± 1
		1	85 ± 1	54 ± 4	57 ± 1	34 ± 1
		2	88 ± 3	59 ± 6	59 ± 10	28 ± 3
TSB		0	78 ± 5	43 ± 2	43 ± 5	21 ± 4
		1	79 ± 4	49 ± 6	48 ± 4	23 ± 3
		2	82 ± 3	44 ± 5	45 ± 4	20 ± 3
	+4°C	0	73 ± 6	40 ± 2	43 ± 3	19 ± 3
		1	82 ± 4	45 ± 7	49 ± 3	17 ± 2
		2	93 ± 1	63 ± 7	62 ± 11	20 ± 5

Milieu	Stock	Temps (mois)	CH	HD	D	A E
TSA		0	92 ± 2	61 ± 4	58 ± 3	55 ± 2
		1	89 ± 3	60 ± 4	53 ± 5	46 ± 11
		2	79 ± 7	59 ± 7	55 ± 7	52 ± 4
	-80°C	0	89 ± 7	67 ± 8	66 ± 10	36 ± 3
		1	94 ± 3	75 ± 4	72 ± 7	30 ± 5
		2	84 ± 3	64 ± 9	54 ± 10	42 ± 12
TSB		0	81 ± 7	51 ± 4	47 ± 3	60 ± 4
		1	73 ± 5	40 ± 6	34 ± 5	38 ± 4
		2	63 ± 6	26 ± 8	23 ± 6	35 ± 4
	-80°C	0	82 ± 3	54 ± 5	49 ± 4	49 ± 11
		1	76 ± 3	47 ± 2	40 ± 3	32 ± 1
		2	78 ± 4	46 ± 5	42 ± 4	35 ± 4

Tableau III-5 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH : Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de *L. monocytogenes* 103575 en fonction des conditions de conservation et de croissance.

Tableau III-4 : Pourcentage d'affinité aux solvants (CH : Chloroforme, HD : Hexadécane, D : Décane et A.E. : Acétate d'éthyle) de *L. monocytogenes* 129P en fonction des conditions de conservation et de croissance.

Dans le cas des *L. monocytogenes* et de *P. aeruginosa*, cette hydrophilie de surface est associée à un caractère Lewis acide-base plus ou moins marqué (forte affinité au chloroforme et à l'acétate d'éthyle en comparaison avec les solvants apolaires) alors que pour *S. aureus*, elle est reliée à une propriété essentiellement Lewis-base.

Cependant, comme la charge de surface, ces propriétés ne sont pas « figées » et peuvent évoluer en fonction de l'environnement physique et chimique des micro-organismes.

En accord avec les données de mobilité électrophorétique, aucune variation significative de ces propriétés en fonction des conditions de conservation et de croissance n'a pu être mise en évidence pour les trois souches de collection ($P > 0,05$). En revanche une évolution est observée pour la souche sauvage. Ainsi après deux mois de stockage à 4°C, *Listeria monocytogenes* 129P est plus hydrophile notamment après une croissance en TSB. A cette température, cette espèce bactérienne est en effet capable de se développer (Papageorgiou et Marth, 1989) et d'adapter sa physiologie en synthétisant par exemple des protéines spécifiques d'acclimatation « Caps » (Cold acclimation proteins) (Bayles, 1996) ou encore en modifiant la composition en acides gras de sa membrane (Annous *et al.*, 1997 ; Jones *et al.*, 1997). Les diverses adaptations de *L. monocytogenes* aux températures proches de zéro peuvent ainsi avoir des conséquences importantes sur ses propriétés physico-chimiques de surface (Briandet *et al.*, 1999) mais également sur son pouvoir pathogène comme l'ont montré Buncic et Avery en 1996.

A l'inverse, la conservation à -80°C en solution cryoprotectrice semble, tout au moins sur une durée de deux mois, diminuer suffisamment le métabolisme bactérien pour limiter les évolutions phénotypiques et conserver les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes, résultats en accord avec ceux obtenus par Briandet *et al.* (1999).

Les résultats du test MATS montrent également un impact non négligeable de l'état physique (solide ou liquide) du milieu de culture utilisé sur les propriétés physico-chimiques de surface des souches à Gram positif testées. En accord avec Ljungh *et al.* (1985), nous avons pu noter qu'une croissance en bouillon augmentait significativement ($P < 0,05$) le caractère hydrophile des micro-organismes (en comparaison avec les données obtenues après culture sur gélose). La composition chimique des milieux de culture étant proche, les différences de propriétés physico-chimiques de surface observées pourraient donc être attribuées au seul mode de culture utilisé *i.e.* gélose ou bouillon nutritif.

De plus, le caractère Lewis-base des bacilles étudiés, (propriété déterminée par la différence d'affinité entre le chloroforme et l'hexadécane), est plus important pour les cellules cultivées en TSB que pour les bactéries ayant eu une croissance sur TSA.

L'ensemble des données obtenues pour les deux modes de croissance ainsi que pour les différents temps et conditions de conservation des quatre souches bactériennes étudiées a été regroupé dans une analyse en composantes principales (Figure III-3). Dans cette représentation, l'axe 1 (représentant 62,8% de la variation totale des données) est positivement corrélé avec l'affinité au chloroforme et avec l'électronégativité de surface des cellules bactériennes. L'axe 2 (24,5% de la variation des données) est corrélé avec leur hydrophobie de surface.

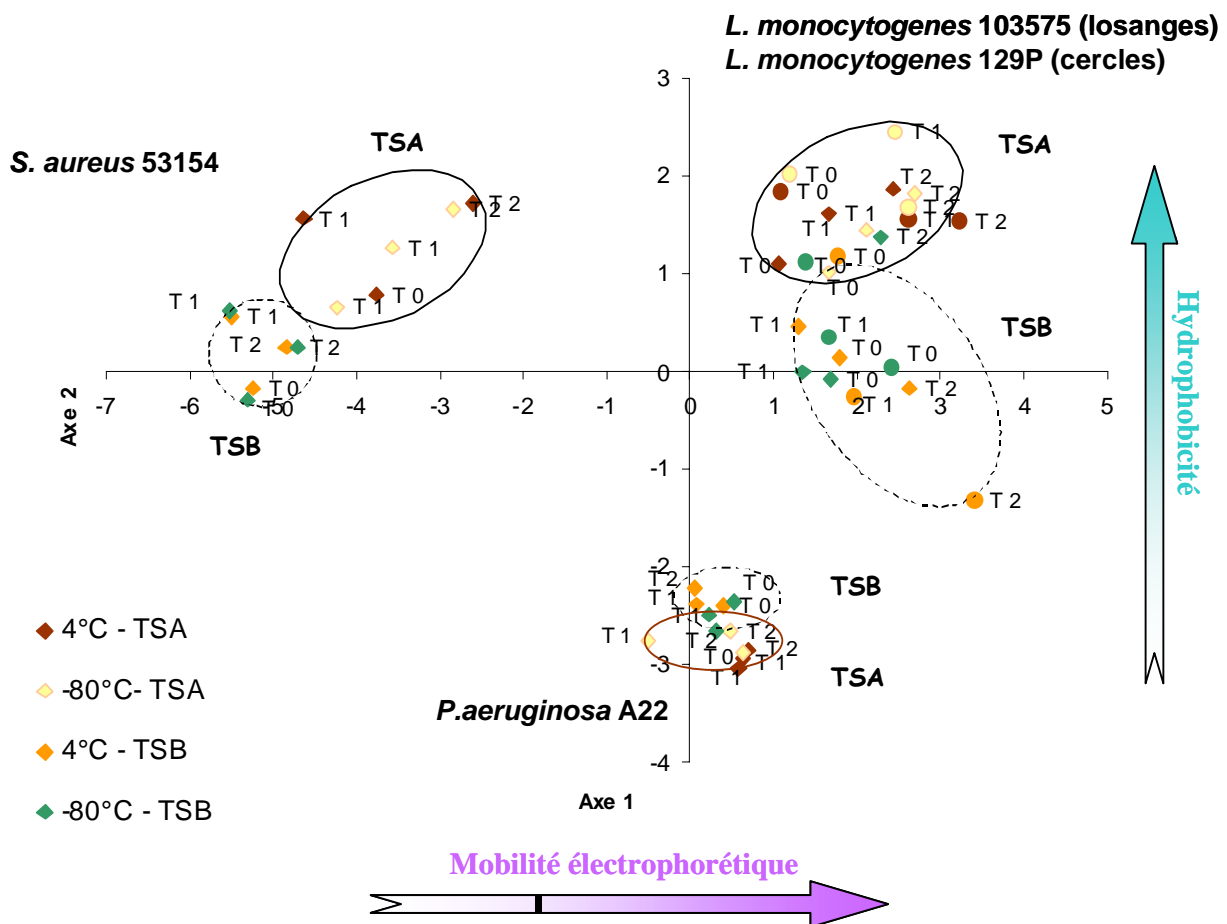


Figure III-3: Analyse en composantes principales des propriétés physico-chimiques de surface (affinité aux solvants utilisés pour le test MATS et mobilité électrophorétique des micro-organismes) de chaque souche cultivée sur TSA ou en TSB à T0, T1 et T2 mois de stockage à 4°C et à -80°C.

D'une façon générale et en accord avec des études récentes (Briandet, 1999 ; Meylheuc, 2000), il apparaît clairement que chaque espèce bactérienne présente des propriétés physico-chimiques de surface différentes des deux autres espèces étudiées (un groupe de données par

espèce bactérienne) ; une variabilité intra-espèce peut également être observée chez *Listeria monocytogenes*.

Par ailleurs, et dans les conditions expérimentales testées, nous avons pu noter que les caractéristiques de surface des souches à Gram positif évoluaient en fonction des conditions de conservation (durée et protocole de stockage) et surtout du mode de culture utilisé.

En effet, cultivées en bouillon nutritif, les cellules bactériennes sont considérées comme étant « libres » (cellules planctoniques) alors que sur gélose elles peuvent être apparentées à des cellules « fixées ». Ainsi, à l'image du développement des bactéries en biofilm, les colonies bactériennes se développant sur gélose ne bénéficient pas d'un apport en éléments nutritifs et en oxygène homogène en tous points. Ce mode de croissance peut donc conduire à une hétérogénéité spatio-temporelle de l'activité métabolique des micro-organismes (Lai *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 1998 ; Choo-Smith *et al.*, 2001 ; Sauer *et al.*, 2002) et induire ainsi une évolution de la composition de leur paroi.

I.2. IMPACT SUR L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS

Comme nous l'avons montré dans la précédente partie, les conditions de conservation et de croissance peuvent modifier les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes, propriétés largement impliquées dans de nombreux phénomènes interfaciaux tels que l'agrégation cellulaire, l'adhésion bactérienne, la formation de biofilm ou encore l'adsorption moléculaire.

Sachant que la première phase du mécanisme d'action d'un désinfectant est son adsorption à la surface des cellules bactériennes (Pioto et Bardoneschi, 1988 ; McDonnell et Russell, 1999), nous avons cherché, dans cette seconde partie de l'étude, à évaluer l'impact de conditions de croissance sur la sensibilité des cellules microbiennes à l'action de différents désinfectants, éléments clé dans un processus d'optimisation de l'évaluation du pouvoir bactéricide des agents antimicrobiens.

A cette fin, les tests MATS et la détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) ont été réalisés avec les souches de collection préalablement citées, *Pseudomonas aeruginosa* A22, *Staphylococcus aureus* 53154 et *Listeria monocytogenes* 103575 ainsi qu'avec une souche sauvage de chacune de ces espèces : *P. aeruginosa* 222P, *S. aureus* 221P et *L. monocytogenes* 177P.

Les principes actifs antimicrobiens sélectionnés, généralement employés dans les formulations désinfectantes, ont quant à eux été choisis dans des familles chimiques différentes *i.e.* un oxydant (l'acide peracétique), un ammonium quaternaire (le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium) et un sel de biguanide (le chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide)).

I.2.1. Test MATS

Les composantes hydrophobe/hydrophile et accepteur/donneur d'électrons au sens de Lewis ont été déterminées pour chaque souche bactérienne cultivée sur TSA et en TSB, selon les protocoles de conservation et de croissance préalablement retenus. Comme le montrent les résultats de la Figure III-4 et quelles que soient les conditions de croissance utilisées, nous avons confirmé la variabilité des propriétés physico-chimiques de surface entre les souches bactériennes étudiées (§I-1).

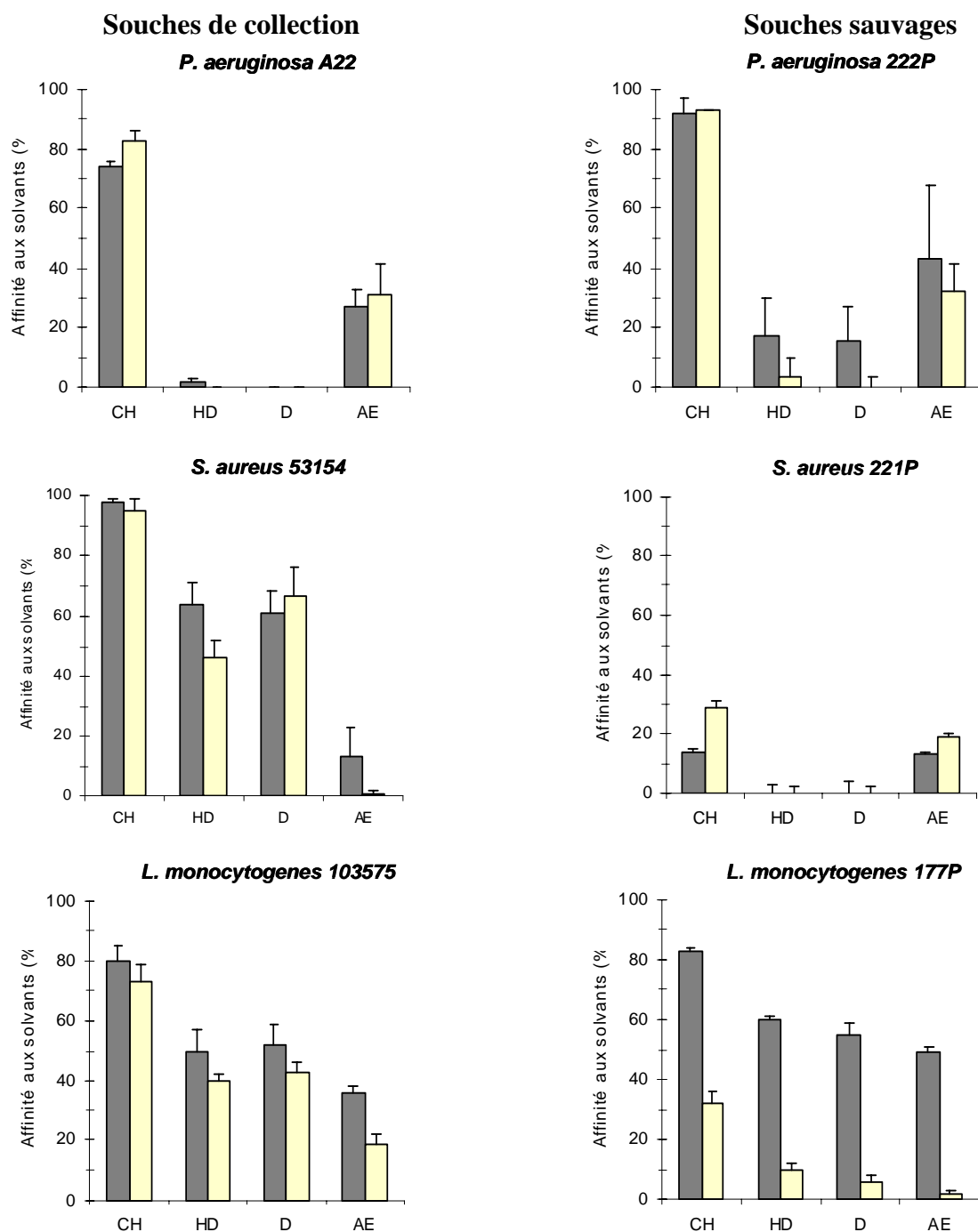


Figure III-4 : Affinité des souches pour les solvants (CH : chloroforme, HD : hexadécane, D : décane et AE : acétate d'éthyle) utilisés dans le test MATS en fonction des conditions de croissance (■ : TSA, □ : TSB).

Ainsi, les deux souches de *P. aeruginosa* sont apparues fortement hydrophiles (affinité à l'hexadécane et au décane inférieure à 5% et 20% respectivement pour la souche de collection et la souche sauvage), hydrophilie de surface associée à un caractère Lewis acide-base marqué (forte affinité au chloroforme, >70%, et à l'acétate d'éthyle, >30%, en comparaison avec les solvants apolaires).

En accord avec les résultats précédemment obtenus par Al-Masaudi *et al.* (1988), *S. aureus* 53154 affiche un caractère moyennement hydrophile (environ 60% d'affinité aux solvants

apolaires) alors qu'une importante hydrophilie de surface peut être observée pour *S. aureus* 221P, souche résistante à la méthicilline. Il est à noter que le caractère hydrophile de ces souches peut être relié à une caractéristique Lewis acide-base pour la souche sauvage et à une composante essentiellement Lewis-base pour la souche de collection. Ces différences de propriétés physico-chimiques de surface pourraient être liées à des modifications de protéines de surfaces impliquées dans le mécanisme de résistance à la méthicilline. En effet, la résistance à cet antibiotique est généralement liée à des mutations d'une ou plusieurs protéines de liaison aux pénicillines (PLP) qui sont en fait des protéines de surface.

Une variabilité a également été observée entre les souches de *Listeria monocytogenes*, en accord avec les données de Briandet (1999), Giovannaci *et al.* (2000) et Meylheuc (2000). Ainsi, *L. monocytogenes* 177P cultivée en TSB affiche une hydrophilie de surface plus importante que la souche de collection (respectivement 10 et 40% d'affinité aux solvants apolaires) et inversement après une croissance sur TSA. Quelles que soient les conditions de croissance testées, l'hydrophilie de surface de ces deux souches peut être reliée à une composante Lewis-base, caractéristique plus marquée pour *L. monocytogenes* 103575 que pour *L. monocytogenes* 177P.

L'ensemble des données obtenues pour les deux modes de croissance des six souches bactériennes étudiées a été regroupé dans une analyse en composantes principales (Figure III-5). Dans cette représentation, l'axe 1 (représentant 60,3% de la variation totale des données) est positivement corrélé avec l'affinité des micro-organismes aux solvants apolaires (décane et hexadécane) et donc avec leur hydrophobie de surface. L'axe 2 (29% de la variation des données) est quant à lui inversement corrélé avec leur caractère Lewis-acide.

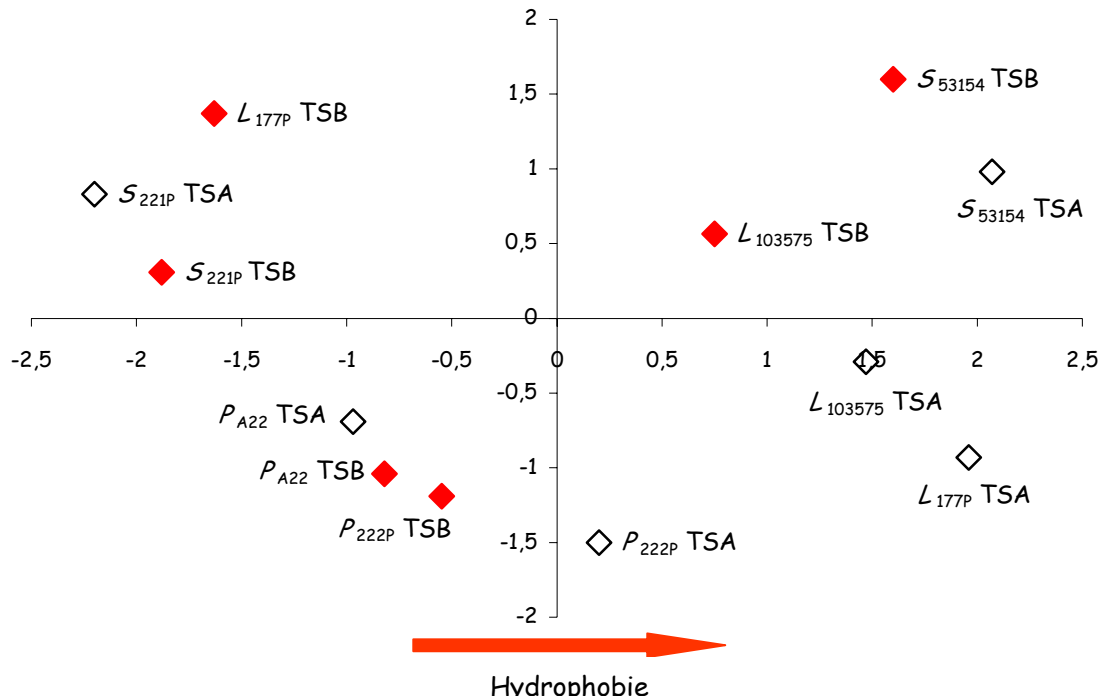


Figure III-5 : Analyse en composantes principales des propriétés physico-chimiques de surface (affinité aux solvants utilisés pour le test MATS) des souches bactériennes en fonction des conditions de croissance (◇ : TSA ; ◆ : TSB).

Ainsi, quel que soit le micro-organisme étudié, nous avons pu confirmer que le milieu de croissance utilisé (bouillon ou gélose) avait une nette influence sur l'hydrophilie de surface des cellules, phénomène déjà observé dans la précédente partie du présent mémoire.

I.2.2. Activité antimicrobienne et détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

Les courbes de destruction obtenues pour chaque souche bactérienne étudiée sont présentées sur les figures III-6, III-7 et III-9 et les CMB dérivées de ces courbes sont regroupées dans les Tableaux III-6, III-7 et III-8 pour respectivement l'acide peracétique, le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium et le chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide).

I.2.2.1. Acide peracétique (APA)

L'acide peracétique, molécule oxydante à large spectre d'activité (Hugo et Russell, 1992), a été testé sur une gamme de concentrations allant de 2 à 20 ppm. Les valeurs des CMB indiquées représentent la moyenne d'au moins trois tests de désinfection réalisés à des jours différents à l'aide de solutions désinfectantes préparées extemporanément.

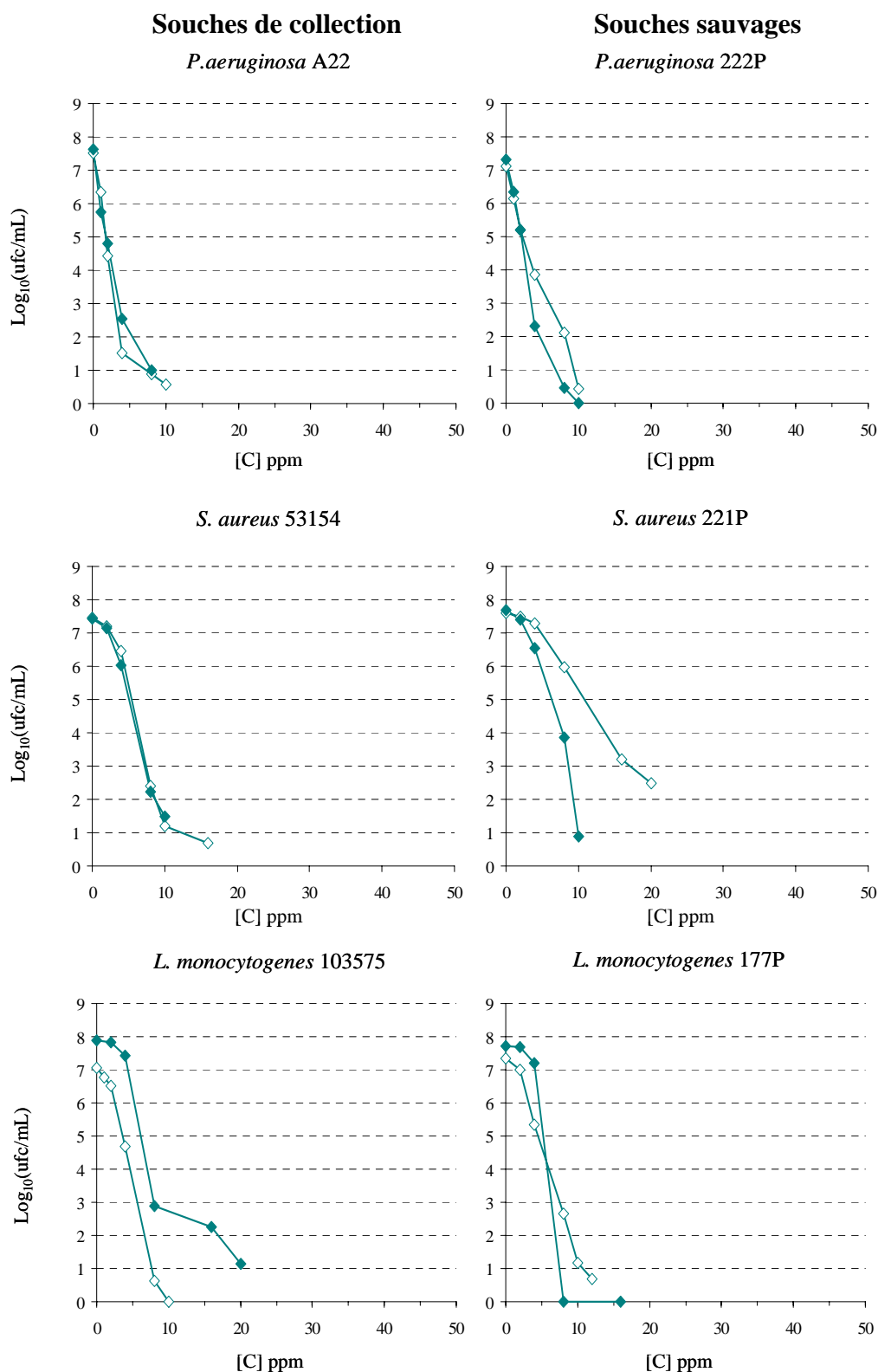


Figure III-6 : Courbes de destruction par l'acide peracétique des souches sauvages et de collection en fonction des conditions de croissance (TSA : ◆ ; TSB : ◇).

Comme le montrent les courbes de destruction réalisées avec cet antimicrobien, de faibles concentrations en désinfectant (inférieures à 20 ppm) entraînent une mortalité importante des micro-organismes ($>5\text{Log}_{10}$). La capacité de l'acide peracétique à oxyder de nombreux composés *i.e.* lipides, protéines ou encore acides nucléiques (Hoffman, 1971) et par

conséquent, son action létale non spécifique (Crémieux et Freney, 1995) en font un agent bactéricide très efficace. Ainsi, excepté pour la souche sauvage *S. aureus* 221P cultivée sur TSA (seule souche non solvant-dépendante au test MATS), une concentration inférieure à 10 ppm de principe actif est suffisante pour éliminer en 5 minutes plus de 5Log₁₀ des différentes populations bactériennes initiales (Tableau III-6).

Milieu de croissance	Souches de collection		Souches sauvages	
	TSA	TSB	TSA	TSB
<i>P. aeruginosa</i>	4	4	4	8
<i>S. aureus</i>	8	8	10	20
<i>L. monocytogenes</i>	8	8	8	8

Tableau III-6 : Concentration minimale bactéricide (ppm) de l'acide peracétique en fonction de l'origine et des conditions de croissance des souches bactériennes.

La plus forte activité bactéricide de l'acide peracétique a pu être observée sur la souche *P. aeruginosa* A22; souche pour laquelle la CMB était de 4 ppm de principe actif. Pour les deux souches de *Listeria* ainsi que *S. aureus* 53154, la CMB était de 8 ppm d'agent antimicrobien. *S. aureus* 221P semble, quant à elle, moins sensible à cet oxydant (CMB supérieure à 8 ppm) que les autres micro-organismes sélectionnés. Ainsi et conformément aux données bibliographiques, l'acide peracétique présente une activité bactéricide à faible concentration sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Bartoli et Dusseau, 1995).

Ainsi, pour la majorité des souches utilisées dans cette partie de l'étude, les conditions de croissance n'ont eu que peu d'influence sur leur sensibilité vis-à-vis de cet agent bactéricide (Tableau III-6). En revanche, pour *S. aureus* 221P, souche la plus résistante de l'étude à cet antimicrobien, l'état physique (solide ou liquide) du milieu de culture a eu un impact sur sa sensibilité vis-à-vis de l'acide peracétique. Ainsi, les cellules bactériennes cultivées en TSB sont apparues moins sensibles à l'APA comparativement aux cellules cultivées sur TSA. Néanmoins et dans les conditions expérimentales testées, l'analyse statistique des résultats obtenus pour les différentes espèces bactériennes, cultivées sur TSA ou en TSB, n'a pu montré d'influence significative ($P > 0,05$) des caractéristiques physico-chimiques de surface de ces micro-organismes sur l'activité bactéricide de l'acide peracétique, petite molécule hydrophile, capable de réagir avec la plupart des composés de l'enveloppe bactérienne (lipides, protéines, systèmes enzymatiques).

1.2.2.2. Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA)

Le second agent bactéricide testé était un ammonium quaternaire cationique couramment utilisé dans les formulations nettoyantes – désinfectantes.

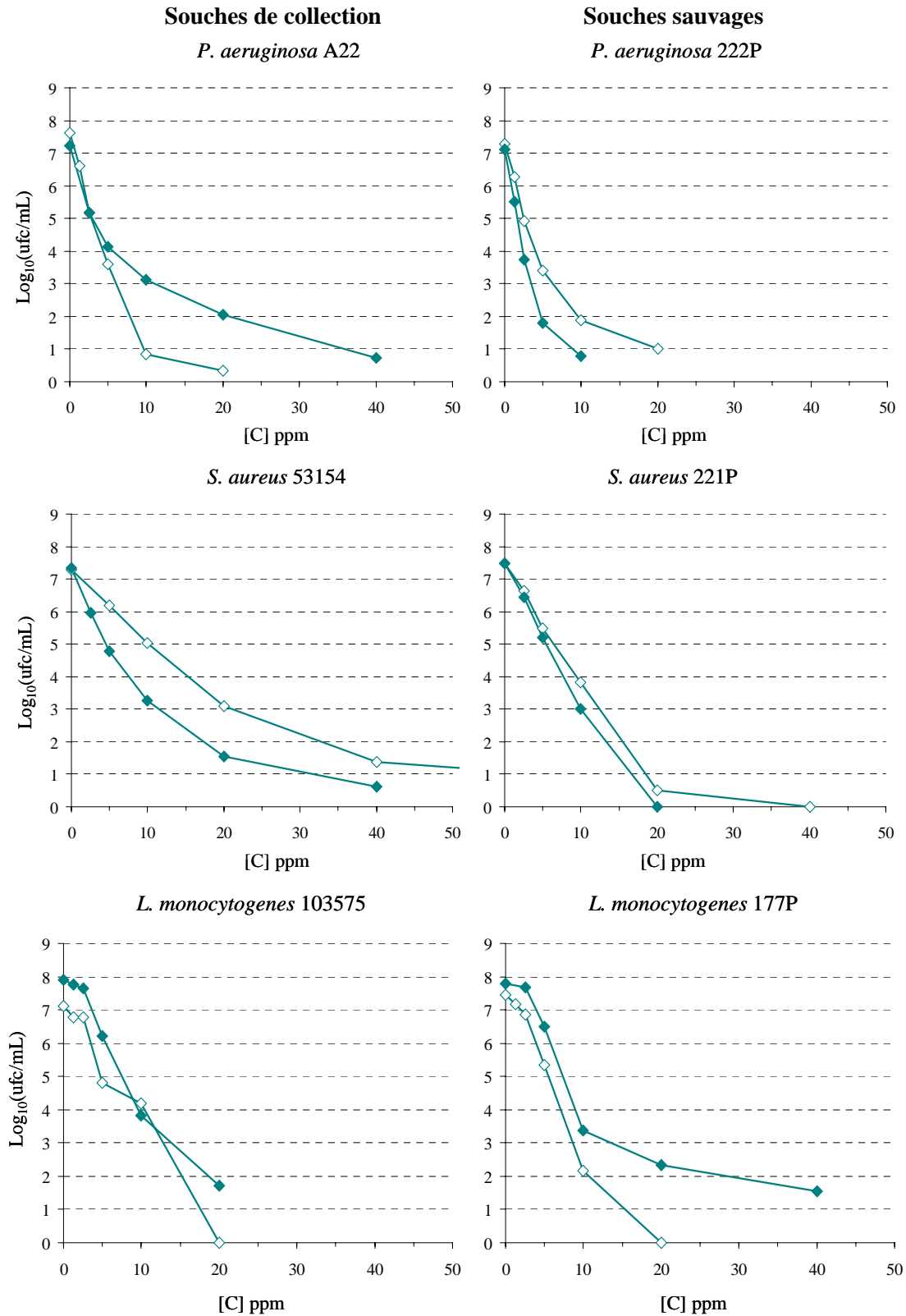


Figure III-7 : Courbes de destruction par le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium des souches sauvages et de collection en fonction des conditions de croissance (TSA : ◆ ; TSB : ◇).

Comme l'indiquent les courbes de destruction présentées sur la Figure III-7, l'action de l'ammonium quaternaire sur les cellules bactériennes est plus progressive que celle de l'acide peracétique. En effet, les pentes des courbes de désinfection sont moins prononcées *i.e.* les pentes des courbes de destruction de *S. aureus* 53154 cultivé en TSB sont respectivement de -1 pour l'acide peracétique et -0,2 pour l'ammonium quaternaire.

Milieu de croissance	Souches de collection		Souches sauvages	
	TSA	TSB	TSA	TSB
<i>P. aeruginosa</i>	20	10	5	10
<i>S. aureus</i>	20	40	20	20
<i>L. monocytogenes</i>	20	20	20	10

Tableau III-7 : Concentration minimale bactéricide (ppm) de l'ammonium quaternaire en fonction de l'origine et des conditions de croissance des souches bactériennes.

Par ailleurs, les CMB pour l'ammonium quaternaire sont comprises entre 5 et 40 ppm de principe actif (Tableau III-7), gamme de concentrations plus large que celle obtenue avec l'acide peracétique. Ainsi, *P. aeruginosa* 222P, cultivée sur TSA semble être la souche la plus sensible à cet antimicrobien (CMB de 5 ppm d'agent antibactérien) alors que la destruction complète des cellules de *S. aureus* 53154 cultivées en TSB nécessite 40 ppm de principe actif soit une concentration 8 fois plus importante.

Il est à noter que pour *S. aureus* 221P (souche sauvage), dont les propriétés physico-chimiques de surface (hydrophobicité et caractère Lewis acide-base) varient peu en fonction des conditions de croissance, les CMB déterminées pour les deux modes de mise en culture sont identiques (20 ppm). En revanche, pour *S. aureus* 53154 et *P. aeruginosa* 222P, dont l'hydrophobie de surface est influencée par les conditions de croissance, nous avons observé des CMB différentes selon le protocole de culture utilisé. Ainsi, la destruction des cellules plus hydrophiles (cultivées en TSB), semble nécessiter une quantité plus importante de CDDMA comparativement aux micro-organismes ayant une hydrophilie de surface moins marquée après une croissance sur TSA.

Cette variabilité des CMB peut donc être attribuée au mode d'action plus spécifique de l'ammonium quaternaire (Maris, 1995), comparativement à celui de l'acide peracétique. Son activité létale pourrait être plus fortement liée aux propriétés de surface des micro-organismes

comme l'indiquent McDonnell et Russell (1999). En 1988, Al-Masaudi *et al.* ont en effet mis en évidence que les concentrations minimales inhibitrices de croissance en cétrimide et en chlorure de cétylpyridinium pouvaient être 2 à 4 fois plus importantes pour des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline et ayant une hydrophilie de surface importante, comparativement à des souches sensibles à cet antibiotique et ayant un caractère hydrophobe de surface marqué telle que *S. aureus* 53154.

Jones *et al.* (1989) ont quant à eux montré que les cellules de *P. aeruginosa* résistantes aux ammoniums quaternaires (dont le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium) étaient plus hydrophobes que les cellules sensibles, hydrophobie de surface liée à une modification du profil en acides gras membranaires. Les ammoniums quaternaires s'adsorbent donc en plus grande quantité sur les bactéries à Gram négatif présentant une faible hydrophobicité de surface (Nagai *et al.*, 2003).

Ainsi les plus petites CMB de cet agent désinfectant ont été déterminées pour les deux souches de *P. aeruginosa*, souches présentant une hydrophobie de surface négligeable ; et les CMB plus élevées ont été obtenues pour les souches bactériennes affichant une hydrophobie de surface plus importante *i.e.* *S. aureus* 53154 (souche de collection).

Le mode de croissance, en influençant les caractéristiques de surface des micro-organismes, peut également avoir un impact sur la résistance à ce désinfectant. Ainsi, la culture sur gélose (en comparaison à une croissance en bouillon) entraîne une augmentation de la tolérance de *P. aeruginosa* A22 au CDDMA.

De même, les cellules de *L. monocytogenes* 177P (souche sauvage) cultivées en TSB, présentant une hydrophilie de surface marquée, sont apparues plus sensibles que celles cultivées sur TSA présentant une hydrophobie de surface plus importante. En revanche, nous avons pu observer que les cellules de *S. aureus* 53154 (souche de collection) ou encore de *P. aeruginosa* 222P (souche sauvage) cultivées en TSB, plus hydrophiles que celles mises en culture sur TSA, étaient également plus tolérantes à ce désinfectant.

Ainsi, en changeant les propriétés de surface des micro-organismes, les conditions de croissance influencent la réactivité des bactéries vis-à-vis de cet agent antimicrobien (Figure III-8) en modifiant par exemple les sites d'adsorption des molécules désinfectantes aux cellules bactériennes. Une analyse de variance des CMB obtenues pour chaque souche bactérienne en fonction des conditions de croissance a mis en évidence l'impact significatif

($P < 0,05$) de la composante hydrophile/hydrophobe de surface des micro-organismes étudiés sur leur sensibilité vis-à-vis du chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium.

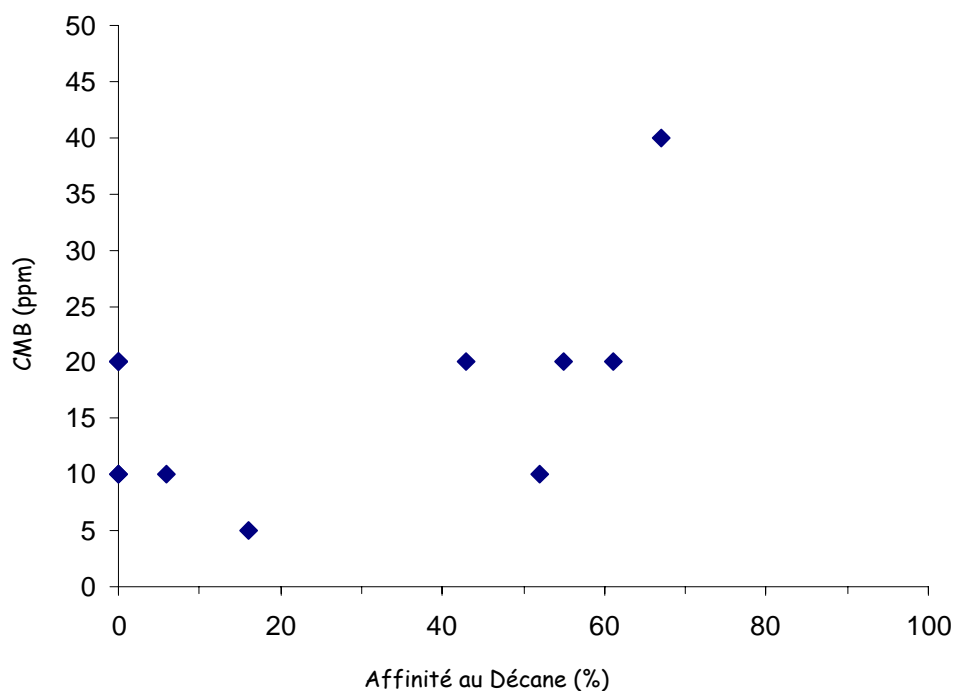


Figure III-8 : Concentration Minimale Bactéricide de l'ammonium quaternaire en fonction de l'affinité des cellules bactériennes pour le décane (♦).

Cependant, outre l'adsorption des antimicrobiens à la surface des micro-organismes, il est à noter que d'autres mécanismes tels que la diffusion des antimicrobiens à travers la membrane bactérienne suivant sa composition en acides gras (Nagai *et al.*, 2003) ou encore la présence de pompes d'efflux (Russell, 1997) pourraient être impliqués dans la résistance des cellules bactériennes aux ammoniums quaternaires.

1.2.2.3. Poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB)

Le troisième agent antibactérien testé appartient quant à lui à la famille des biguanides. C'est également un agent désinfectant agissant sur la membrane bactérienne (McDonnell et Russell, 1999). Contrairement aux désinfectants précédents, c'est un mélange de molécules polymérisées (degré moyen de polymérisation : 12).

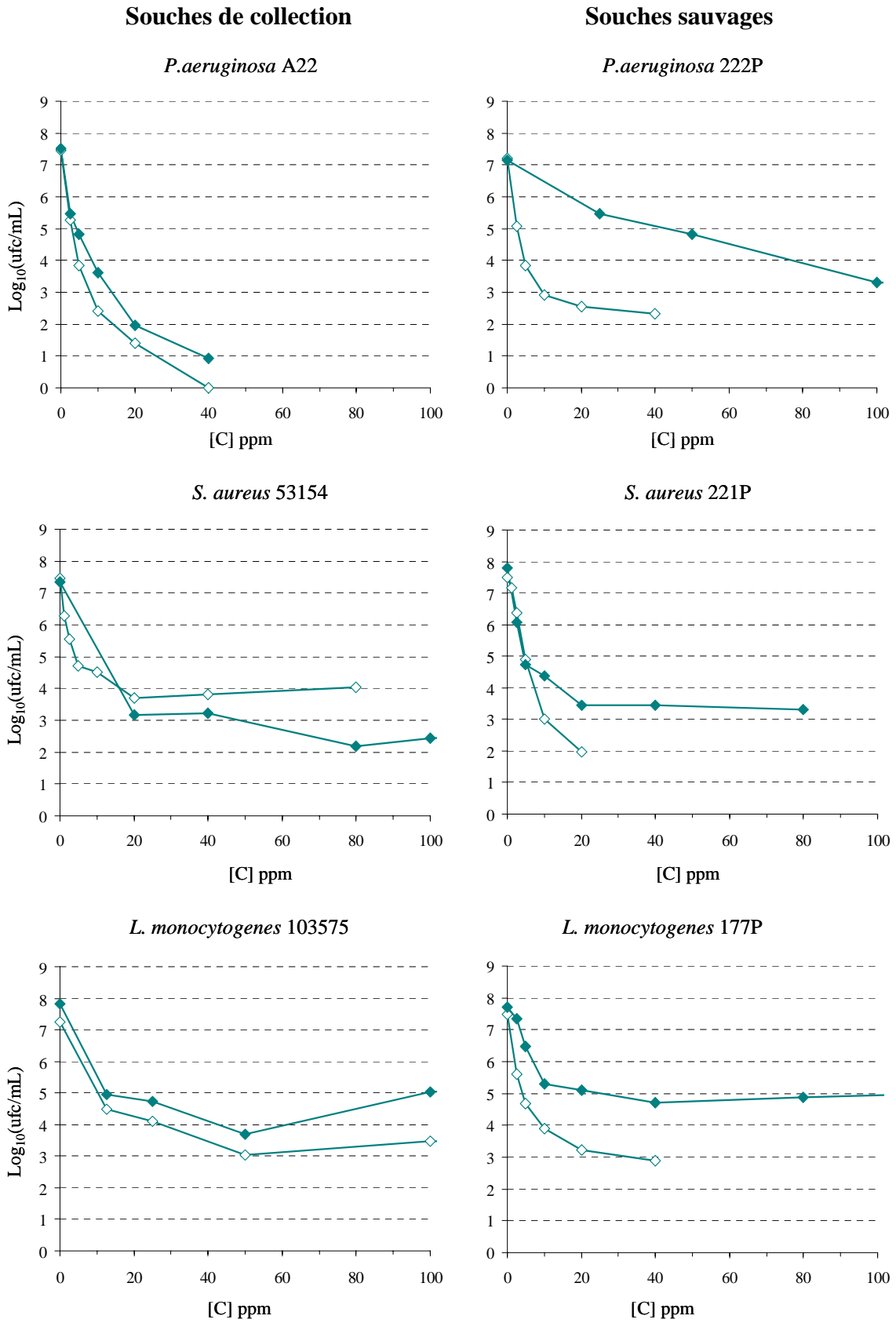


Figure III-9 : Courbes de destruction par la PHMB des souches sauvages et de collection en fonction des conditions de croissance (TSA : ◆ ; TSB : ◇).

Comme on peut l'observer sur la figure III-9, les courbes de désinfection obtenues pour la PHMB sont biphasiques. De 0 à 20 ppm de principe actif, la destruction des cellules bactériennes est proportionnelle à la concentration en PHMB. Au-delà de cette concentration, il n'y a pas d'augmentation de l'activité bactéricide de cet antimicrobien sur les souches à Gram positif. Cette diminution d'efficacité pourrait être due à une saturation des sites d'adsorption par la PHMB ou à l'encombrement stérique de la surface cellulaire par cette molécule.

Comme pour l'ammonium quaternaire et d'autres molécules appartenant à la famille des biguanides (Reverdy, 1995), les CMB déterminées pour chaque souche en fonction des conditions de croissance, présentent une hétérogénéité importante (Tableau III-8). Ainsi, après une croissance en bouillon nutritif, la CMB de la PHMB pour *P. aeruginosa* A22 est de 10 ppm de produit actif alors que dans les mêmes conditions, il faut 4 fois plus de matière active pour obtenir une réduction logarithmique similaire de la population initiale de *P. aeruginosa* 222P. Néanmoins, et comme le montrent les résultats de la Figure III-9, toutes les CMB n'ont pu être déterminées dans la gamme de concentrations testée. Des essais supplémentaires ont donc été réalisés avec des concentrations de principe actif supérieures conduisant à une CMB de 800 ppm pour *L. monocytogenes* 103575 cultivée en TSB et de 400 ppm pour *P. aeruginosa* 222P après croissance sur TSA. Les CMB de *S. aureus* 53154 cultivée en TSB et de *L. monocytogenes* 177P cultivée sur TSA n'ont pu être déterminées.

Milieu de croissance	Souches de collection		Souches sauvages	
	TSA	TSB	TSA	TSB
<i>P. aeruginosa</i>	20	10	400	40
<i>S. aureus</i>	20	ND	80	20
<i>L. monocytogenes</i>	ND	800	ND	80

Tableau III-8 : Concentration minimale bactéricide (ppm) de la PHMB en fonction de l'origine et des conditions de croissance des souches bactériennes (ND : Non Déterminée).

Comme pour le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium, un impact du mode de croissance sur l'activité bactéricide de la PHMB a pu être mis en évidence. Les souches sauvages à Gram positif et les deux souches à Gram négatif sont apparues moins sensibles à la PHMB après une croissance sur milieu gélosé. Ainsi, une croissance sur TSA (comparativement à une croissance en TSB) peut multiplier la CMB d'un facteur 2, 4 et 10,

respectivement pour *P. aeruginosa* A22, *S. aureus* 221P et *P. aeruginosa* 222P, différence de sensibilité probablement liée à l'hétérogénéité des populations bactériennes et donc à une hétérogénéité des caractéristiques physico-chimiques de surface des micro-organismes comme nous l'avons vu précédemment (§I-1.1.).

Cultivées sur TSA, les souches sauvages se sont révélées moins sensibles à la PHMB que les souches de collection (souches sur lesquelles sont testés et validés les produits désinfectants), différence de réactivité vis-à-vis des désinfectants entre souches de collection et souches sauvages probablement liée à des variations de la composition lipidique de la membrane cytoplasmique entre des souches issues du terrain et des souches de laboratoire.

La variabilité des propriétés physico-chimiques de surface des bactéries qu'elle soit inter ou intra espèce ou en fonction des conditions de croissance, peut entraîner une modification des interactions entre les molécules désinfectantes et la surface cellulaire. En effet, la PHMB interagit avec les groupements anioniques de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, principalement avec les phospholipides acides (*i.e.* phosphatidylglycérol et diphosphatidylglycérol) (Broxton *et al.*, 1984). En conséquence, une modification de la composition lipidique de cette membrane externe peut entraîner une évolution de l'adsorption de cette molécule à la surface des bactéries et donc une CMB différente (Broxton *et al.*, 1984 ; Gilbert *et al.*, 1990).

L'analyse statistique des CMB en fonction des affinités aux solvants utilisés pour le test MATS a mis en évidence l'effet significatif ($P < 0,05$) du caractère hydrophobe/hydrophile de surface des cellules bactériennes étudiées sur leur sensibilité à la PHMB (Figure III-10).

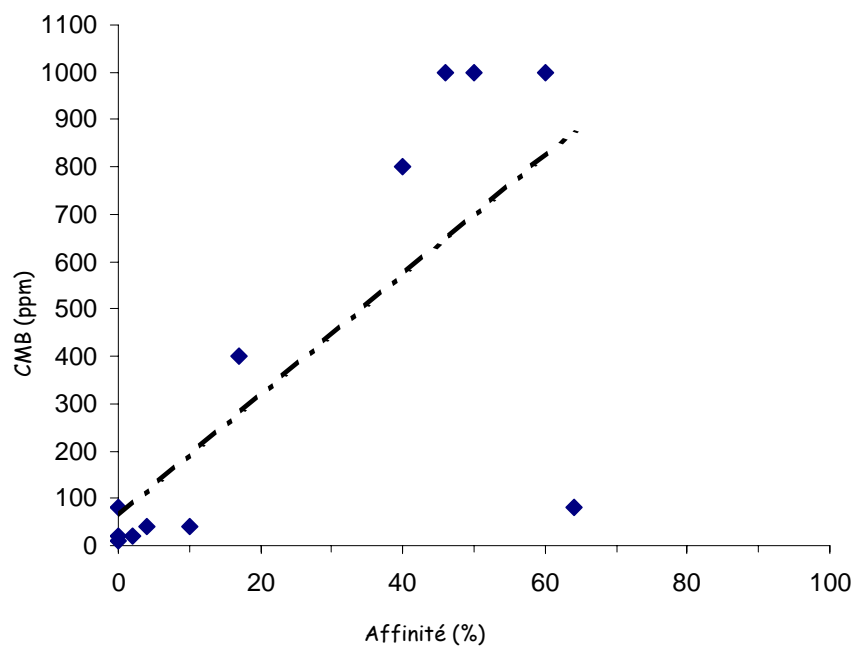


Figure III-10 : Relation entre les CMB déterminées pour la PHMB et le caractère hydrophobe de surface des cellules microbiennes (Affinité à l'hexadécane).

Ainsi, il semblerait que les cellules présentant une hydrophobie de surface négligeable soient plus sensibles que les autres à l'action de ce désinfectant après seulement cinq minutes de contact. Les cellules affichant une hydrophobie de surface intermédiaires apparaissent quant à elles plus résistantes, résistance due à de possibles interactions répulsives à proximité des sites d'adsorption de la PHMB.

1.3. CONCLUSION

Cette première partie de l'étude nous a permis de montrer une évolution des caractéristiques physico-chimiques de surface des souches étudiées en fonction de la durée de stockage et surtout en fonction de l'état physique du milieu de culture utilisé (gélose ou bouillon nutritif), effet plus marqué pour les souches sauvages que pour les souches de collection.

De plus, dans les conditions expérimentales testées, nous avons pu observer que la CMB augmentait avec la taille et notamment avec la spécificité d'action de la molécule désinfectante. Ainsi, l'acide peracétique, petite molécule hydrophile à action antimicrobienne non spécifique, est apparue comme étant le plus efficace avec des CMB inférieures ou égales à 20 ppm. Concernant les agents antimicrobiens à action létale plus spécifique testés (l'ammonium quaternaire et le sel de biguanide), une nette influence des conditions de croissance des bactéries (milieu de culture solide ou liquide) a pu être mise en évidence sur leur activité bactéricide. Néanmoins, aucune règle générale corrélant milieu de croissance (bouillon ou gélose) et CMB de chaque désinfectant testé n'a pu être établie.

Enfin, nous avons également pu noter que le choix des souches, de sensibilité variable vis à vis des désinfectants, était primordial afin de ne pas sur ou sous estimer les concentrations efficaces des agents antimicrobiens, plus particulièrement sur des souches de terrain.

En conséquence et sur la base des résultats obtenus, nous avons choisi de poursuivre l'étude avec :

- des souches bactériennes de collection et des isolats sauvages*
- les 2 protocoles de conservation et de croissance suivants :*
 - ↪ Conservation des micro-organismes à - 80 °C (2 mois maximum) puis culture en TSB à 37 °C (Protocole généralement utilisé dans les laboratoires de recherche).*
 - ↪ Conservation des bactéries à 4°C (une semaine maximum) puis ensemencement sur TSA en pente et incubation à 37°C (Protocole de croissance des micro-organismes selon les instructions des normes AFNOR).*

II. EVALUATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DES DESINFECTANTS SUR CELLULES ADHERENTES

De nombreux travaux ont porté sur la détermination de l'activité bactéricide des désinfectants et le principal test mis en œuvre pour valider la bactéricidie d'un agent antimicrobien est réalisé sur des micro-organismes en suspension (protocole préalablement utilisé cf. §-I.2). Cependant, ce test de désinfection s'avère relativement éloigné des conditions normales d'utilisation des désinfectants, notamment dans le cas des cellules adhérentes aux surfaces, cas très largement rencontrés dans de nombreux secteurs d'application.

Les protocoles standardisés actuellement préconisés pour tester l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens mettent en œuvre des cellules déposées puis déshydratées (van Klingeren *et al.*, 1998) et non pas des cellules simplement adhérentes. De plus, les techniques classiques de microbiologie utilisées pour les tests de désinfection ne permettent pas toujours de détecter les bactéries viables - non cultivables, capable de sortir de cette phase de « dormance » dans un environnement favorable à leur croissance (Chumkhunthod *et al.*, 1998).

Ainsi, après avoir sélectionner micro-organismes d'étude et conditions de conservation et de croissance, nous avons dans cette section cherché à définir un protocole standardisé et reproductible permettant de tester l'activité bactéricide d'agents désinfectants sur cellules adhérentes.

II.1. PROTOCOLE D'ADHESION MICROBIENNE AUX SURFACES

L'adhésion des micro-organismes aux surfaces est un phénomène naturel qui s'observe quels que soient le milieu de suspension (air ou liquide) et la nature du support rencontré (matériaux inertes, tissus animaux ou végétaux) (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991). De nombreuses études (Fletcher et Loeb, 1979 ; Busscher *et al.*, 1984 ; Mafu *et al.*, 1990 ; Briandet, 1999) ont mis en évidence l'implication des propriétés physico-chimiques de type van der Waals, Lewis acide-base et électrostatiques des différents corps en présence *i.e.* micro-organismes, supports solides et fluide environnant, dans la mise en place de ce processus bioadhésif. En conséquence, tout facteur susceptible de modifier les propriétés de surface des bactéries pourra modifier leur comportement bioadhésif.

Ainsi, sur la base des données obtenues dans la précédente étape, nous avons étudié l'impact des conditions de conservation et de croissance sur le comportement bioadhésif des souches bactériennes préalablement caractérisées (§I.2.) à deux surfaces modèles *i.e.* l'acier inoxydable AISI 316 et le PTFE (PolyTétraFluoroEthylène). L'adhésion des cellules bactérienne a été évaluée par *i)* le dénombrement des cellules viables cultivables adhérentes et par *ii)* l'observation *in situ* par microscopie à épifluorescence des bactéries adhérentes (viables cultivables, viables non cultivables et mortes).

II.1.1. Caractérisation énergétique de la surface des supports solides

Les angles de contact mesurés (Tableau III-9) sur les échantillons solides avec trois liquides purs de caractéristiques énergétiques connues, couplés à l'équation de Youn-van Oss (van Oss, 1988), nous ont permis de calculer l'énergie de surface de ces matériaux (γ_S), ainsi que leurs composantes van der Waals (γ^{LW}), donneur d'électron (ou Lewis-base) (γ^-) et accepteur d'électron (ou Lewis-acide) (γ^+) (Figure III-11).

En accord avec des études antérieures, l'acier inoxydable AISI 316 est apparu hydrophile (l'angle de contact mesuré pour l'eau est de 69°), hydrophilie de surface liée à un caractère Lewis-base ($\gamma^- \cong 14,9 \text{ mJ/m}^2$).

Concernant le PTFE, nous avons confirmé son caractère hydrophobe ; $\theta_{\text{Eau}} \cong 113^\circ$, associée à une énergie de surface faible $\gamma_S \cong 16,4 \text{ mJ/m}^2$ principalement due à sa composante de van der Waals de $16,1 \text{ mJ/m}^2$. Compte tenu des erreurs de mesures, ses composantes γ^+ et γ^- sont négligeables.

	Eau	Formamide	Diiodométhane
Acier A316	$69 \pm 1,8$	$46,4 \pm 1,5$	$46,5 \pm 2,0$
PTFE	$113 \pm 1,0$	$97,5 \pm 3,3$	$82,7 \pm 0,1$

Tableau III-9 : Angles de contact mesurés ($^\circ$) à l'eau, au formamide et au diiodométhane sur l'acier inoxydable AISI 316 et sur le PTFE.

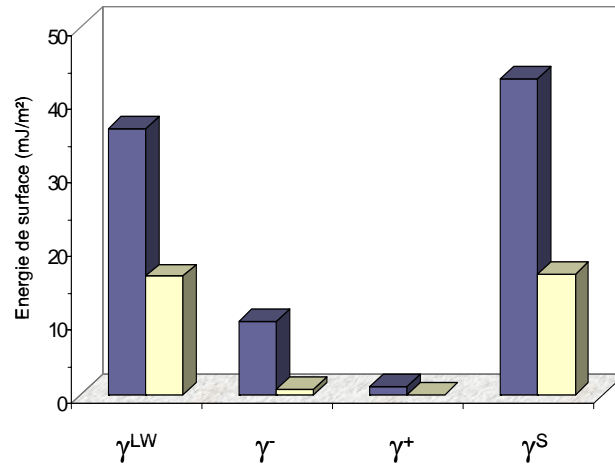


Figure III-11 : Caractéristiques énergétiques (mJ/m²) de l'acier inoxydable A316 (■) et du PTFE (□).

II.1.2. Adhésion bactérienne

Les essais d'adhésion ont été effectués en conditions statiques avec les micro-organismes cultivés sur TSA et en TSB. Les dénombrements de la flore totale adhérente et des cellules viables cultivables adhérentes ont été réalisés après 3 heures de contact entre les suspensions bactériennes et les échantillons d'acier et de PTFE. La contamination totale des supports, représentée en $\text{Log}_{10}(\text{nombre de cellules/cm}^2)$, a été estimée par observation des surfaces au microscope à épifluorescence et les cellules viables cultivables ont été dénombrées par ensemencement en gélose. Les résultats sont exprimés en $\text{Log}_{10}(\text{ufc/cm}^2)$ (Figure III-12).

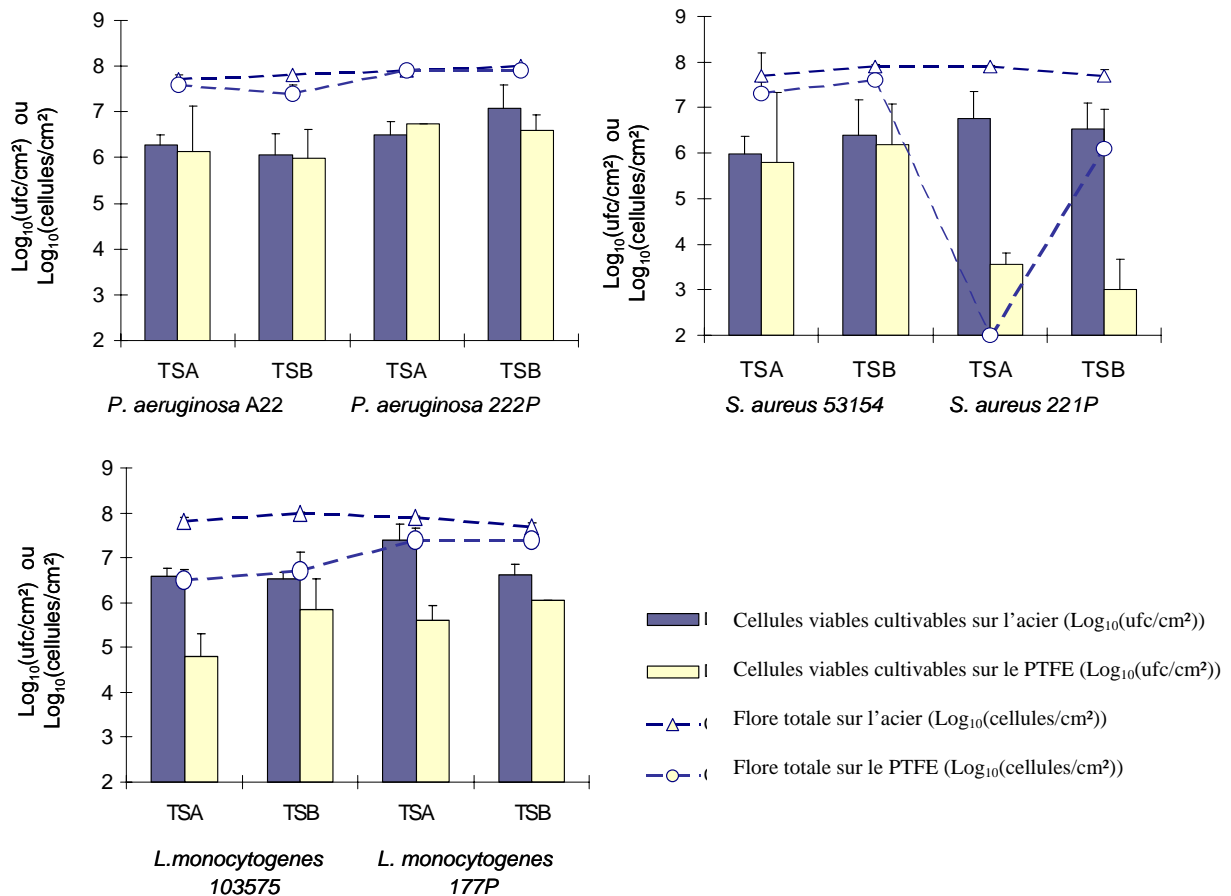


Figure III-12 : Comportement bioadhésif des souches cultivées sur TSA ou en TSB à la surface de supports d'acier inoxydable ou de PTFE.

II.1.2.1. Flore totale adhérente

Les différentes photographies obtenues ont permis de calculer les taux de contamination des supports solides par les micro-organismes (Figure III-12) et d'observer la répartition des bactéries sur ces surfaces (Tableau III-10).

Les niveaux de contamination calculés pour les bactéries à Gram positif montrent que ces souches ont des comportements bioadhésifs différents vis à vis des échantillons d'acier et de PTFE. En accord avec Chavant *et al.* (2002), une adhésion importante de *L. monocytogenes* à l'acier inoxydable a pu être notée. Ainsi, en trois heures d'adhésion, le taux de contamination des coupons d'acier par les *Listeria*, et plus particulièrement *L. monocytogenes* 103575, est d'environ 8 Log₁₀(cellules/cm²) alors que la biocontamination du PTFE est inférieure à cette valeur d'environ 1 Log₁₀. Des résultats similaires ont été observés pour les souches de *S. aureus* et plus particulièrement pour la souche sauvage *i.e.* 7,9 et moins de 2 Log₁₀(cellules/cm²) respectivement sur l'acier et le PTFE pour *S. aureus* 221P cultivée sur gélose en pente. Ces résultats confirment l'importance des propriétés physico-chimiques de

surface des bactéries et notamment du caractère hydrophile (van Loosdrecht *et al.*, 1987) dans le processus bioadhésif de ces micro-organismes.

En revanche, l'adhésion de *P. aeruginosa* A22 aux deux surfaces solides apparaît moins affectée par les conditions de croissance utilisées. Ainsi, quelles que soient les conditions de croissance et la surface étudiée, le taux de contamination du support récepteur est compris entre 7,2 et 7,8 Log₁₀(cellules/cm²). De même, des niveaux d'adhésion similaires à l'acier et au PTFE peuvent être notés pour *P. aeruginosa* 222P cultivée sur TSA et en TSB.

Le tableau III-10 regroupe différentes observations microscopiques des souches sauvages et de collection adhérentes à l'acier inoxydable AISI 316 et au PTFE préalablement cultivées sur TSA ou en TSB.

Même si des taux de contamination similaires ont pu être déterminés par analyse d'image, par exemple pour *S. aureus* 53154 ou encore *P. aeruginosa* 222P, les champs observés montrent un comportement bioadhésif différent en fonction du support récepteur et des conditions de croissance. En effet, pour des niveaux de recouvrements similaires, les bactéries peuvent être réparties de façon homogène sur l'échantillon solide ou former un « réseau » d'agrégats bactériens plus ou moins denses.


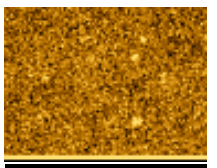
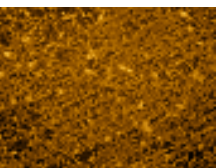
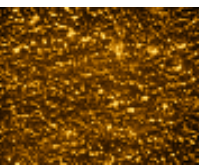
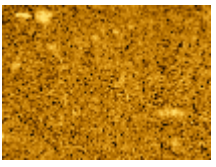
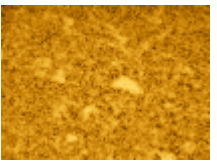
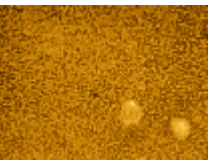
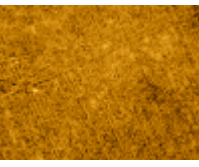
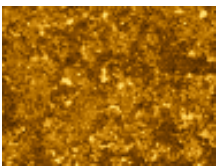

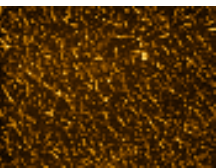

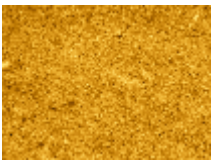
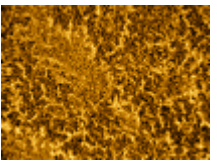

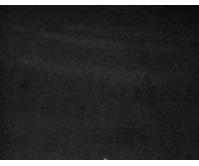
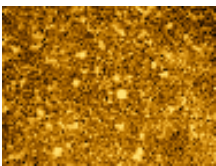
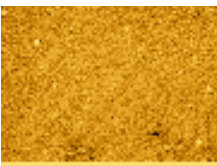
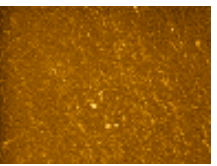
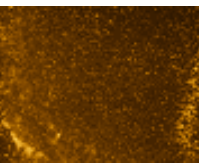

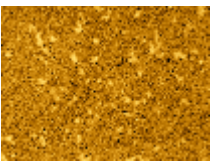
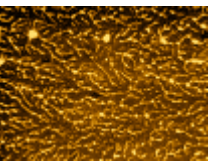
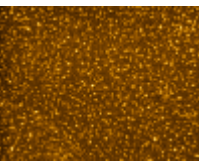
Surface	Acier		PTFE	
Conditions de culture	TSA	TSB	TSA	TSB
<i>P. aeruginosa</i> A22				
<i>P. aeruginosa</i> 222P				
<i>S. aureus</i> 53154				
<i>S. aureus</i> 221P				
<i>L. monocytogenes</i> 103575				
<i>L. monocytogenes</i> 177P				

Tableau III-10 : Observations au microscope à épifluorescence (obj. x 10) des souches de collection et sauvages adhérentes à l'acier inoxydable et au PTFE en fonction des conditions de croissance. Les cellules sont colorées à l'orangé d'acridine.

Les différences de répartition des cellules à la surface des matériaux peuvent être liées à une compétition des interactions physico-chimiques entre les différents corps en présence *i.e.* milieu de suspension/bactéries, bactéries/bactéries et bactéries/surface, au moment du séchage des échantillons (Mougin *et al.*, 2001). Plus précisément, la formation d'agrégats bactériens pourrait résulter d'interactions attractives plus faibles entre le support solide et les bactéries comparativement aux interactions entre le liquide de suspension et les bactéries et les bactéries entre elles. Par ailleurs, comme l'indiquent Mougin et Haidara (2002), les forces capillaires impliquées lors du passage de l'interface liquide/air et au cours de la phase de

séchage des échantillons solides préalablement à leur observation, pourraient influencer l'organisation des micro-organismes à la surface des matériaux. Ensemble de résultats soulignant l'importance des conditions expérimentales utilisées.

II.1.2.2. Dénombrement des cellules viables cultivables

En accord avec des données bibliographiques (Fletcher *et al.*, 1979 ; McEldowney et Fletcher, 1986 ; Asther *et al.*, 1989), nous avons observé que les souches hydrophiles adhèrent en plus grande quantité sur les surfaces hydrophiles et inversement, les cellules hydrophobes adhèrent en plus grand nombre sur les surfaces hydrophobes.. Ainsi, les dénombrements obtenus pour les *L. monocytogenes* (souches hydrophiles), quel que soit le mode de croissance utilisé, montrent une adhésion plus importante à l'acier A316 (supérieurs à $6 \log_{10}(\text{ufc}/\text{cm}^2)$) en comparaison au PTFE (compris entre 4,5 et $6 \text{ Log}_{10}(\text{ufc}/\text{cm}^2)$). Il en est de même pour *S. aureus* 221P avec des dénombrements supérieurs à $6 \text{ Log}_{10}/\text{cm}^2$ pour l'acier et inférieurs à $4 \text{ Log}_{10}/\text{cm}^2$ pour le PTFE.

Néanmoins, et comme l'a souligné Bellon-Fontaine (communication personnelle), au-delà de ce caractère général, il faut considérer les interactions Lewis Acide-Base ainsi que les forces d'adhésion susceptible de s'établir entre les micro-organismes et la surface solide. Ainsi, et malgré une hydrophilie de surface importante des cellules de *P. aeruginosa* A22 et 222P (affinité négligeable aux solvants apolaires, cf. §I.2.), nous avons observé peu ou pas de différence dans le nombre de cellules adhérentes viables cultivables (comprise entre 6 et $7 \log_{10}/\text{cm}^2$) entre l'acier inoxydable et le PTFE pour ces deux souches présentant un caractère Lewis acide-base marqué. Outre l'hydrophilie de surface des micro-organismes (Vanhaecke *et al.*, 1990), la présence d'appendices exocellulaires peut également avoir un impact sur leur adhésion aux surfaces : la présence de flagelles permet aux micro-organismes d'être mobiles (mobilité observée au microscope pour les souches de *P. aeruginosa*) ce qui facilitera alors leur contact avec les surfaces solides et donc leur capacité à adhérer; et la synthèse de pili pourra renforcer leur adhésion (O'Toole *et al.*, 2000).

Néanmoins et comme le soulignent Vanhaecke *et al.* (1990) ou plus récemment Gomez-Suarez *et al.* (2001) ou encore Herry *et al.* (2003), en conditions statiques et après « le passage d'interfaces liquide-air », les dénombrements des cellules adhérentes ne reflètent pas toujours la variabilité de comportement bioadhésif à une surface réceptrice de souches bactériennes ayant des propriétés physico-chimiques de surface différentes.

Enfin, nous avons pu noter que les dénombrements des micro-organismes adhérents obtenus par ensemencement en gélose nutritive sont généralement inférieurs aux taux de contamination calculés à partir des observations au microscope à épifluorescence (Figure III-13). Cette différence de dénombrement est comprise entre 0,5 et 2 $\text{Log}_{10}(\text{cellules}/\text{cm}^2)$ pour l'acier inoxydable et entre 1 et 3 $\text{Log}_{10}(\text{cellules}/\text{cm}^2)$ pour le PTFE.

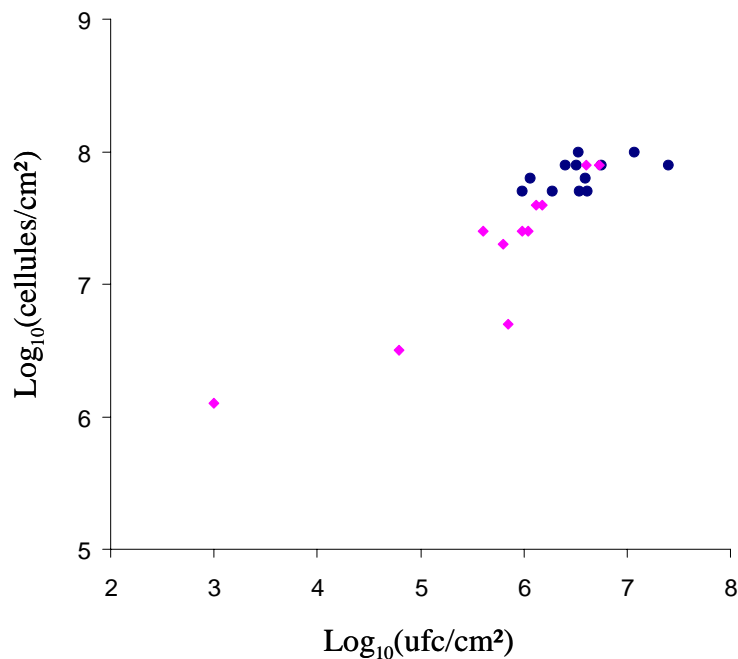


Figure III-13 : Relation entre le nombre de cellules adhérentes dénombrées et le nombre de micro-organismes adhérents observés sur les échantillons d'acier (●) et de PTFE (◆).

Dans les conditions expérimentales testées, plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences de résultats entre les dénombrements classiques et les observations au microscope à épifluorescence. Pour les observations microscopiques, une surestimation de la contamination des surfaces est possible en raison de l'emplacement des champs observés *i.e.* au centre des échantillons solides, présentant généralement une contamination plus homogène que les bords des échantillons solides.

Concernant la cultivabilité des cellules adhérentes, il est à noter que l'adhésion peut être considérée comme un stress pour les micro-organismes, plus particulièrement en absence d'éléments nutritif, et entraîner ainsi un ralentissement du métabolisme bactérien (Williams *et al.*, 1999) voir une mortalité des cellules adhérentes.

La technique utilisée pour décrocher les cellules adhérentes peut elle-même stresser les micro-organismes et en conséquence entraîner une diminution du nombre de cellules viables

cultivables. En effet, même si nous avons vérifié que le traitement aux ultra-sons n'avait pas d'action létale pour des suspensions bactériennes après 3 heures à 20°C en NaCl 150mM (les dénombrements étaient similaires avant et après traitement), ils peuvent toutefois fragiliser les cellules bactériennes déjà stressées par l'adhésion. Chaque étape impliquée dans les dénombrements (transfert des surfaces entre les différents contenants, dilutions...) peut également entraîner une perte de cellules bactériennes. Enfin, les forces d'adhésion étant variables entre micro-organismes, il est possible que les ultra-sons permettent un meilleur décrochage des cellules mortes comparativement aux cellules viables, comme l'indique Bellon-Fontaine (communication personnelle).

Ainsi, couplée aux techniques classiques de microbiologie, l'observation *in situ* de la biocontamination des supports par microscopie à épifluorescence, en détectant la flore totale adhérente (viables cultivables, viables non cultivables et mortes), permet une étude plus complète du comportement bioadhésif des cellules bactériennes à la surface de matériaux inertes.

II.2. DESINFECTION DES SURFACES CONTAMINEES

Après avoir défini un protocole d'adhésion reproductible, les essais de désinfection ont été réalisés selon un protocole inspiré de la norme NF EN 1040 et décrit au paragraphe VI de la seconde partie du présent mémoire. Afin d'avoir suffisamment de cellules adhérentes dénombrables par les techniques classiques de microbiologie (décrochage et ensemencement en gélose nutritive), nous avons sélectionné l'acier inoxydable AISI 316 comme support récepteur.

II.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Un rappel des CMB obtenues pour les tests de désinfection réalisés avec les cellules en suspension de *P. aeruginosa* A22 et 222P est présenté dans le tableau III-11.

Souche	Milieu de croissance	Désinfectant		
		APA	CDDMA	PHMB
<i>P. aeruginosa</i> A22	TSA	4	20	20
	TSB	4	10	10
<i>P. aeruginosa</i> 222P	TSA	4	5	400
	TSB	8	10	40

Tableau III-11 : CMB de chaque désinfectant pour *P. aeruginosa* A22 et 222P en suspension en fonction du milieu de croissance.

La figure III-14 présente les courbes de destruction de *P. aeruginosa* A22 et 222P obtenues après désinfection des échantillons d'acier AISI 316 avec des solutions d'acide peracétique (APA), de chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA) ou de poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB).

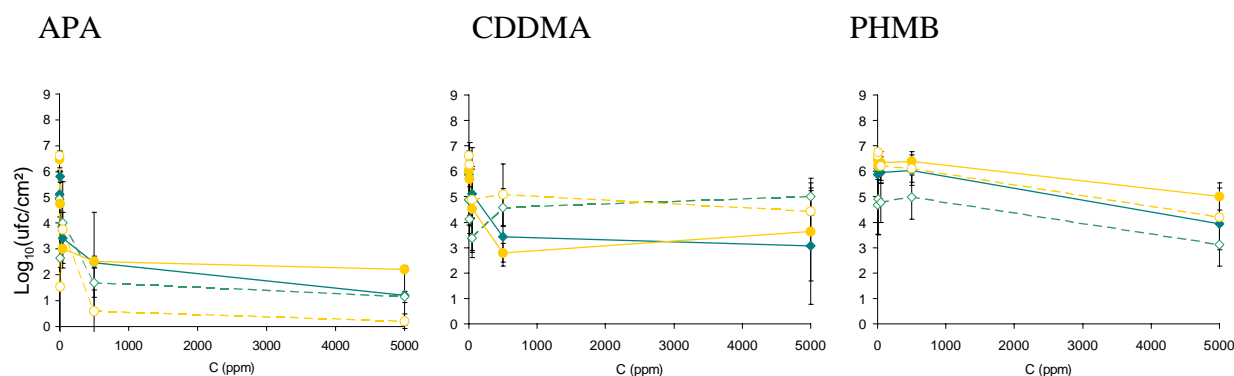


Figure III-14 : Courbes de destruction de *P. aeruginosa* A22 (◆ et ◇) et 222P (● et ○) adhérentes à l'acier après croissance sur TSA (symboles pleins) et en TSB (symboles creux).

Comparativement à l'état planctonique, l'état adhérent des souches de *P. aeruginosa* à l'acier inoxydable entraîne une augmentation de leur résistance à la désinfection conformément aux données obtenues par Takeo *et al* (1994) et Campanac *et al.* (2002). Ainsi, la destruction totale des cellules adhérentes n'a pu être obtenue ni pour l'ammonium quaternaire, ni pour la PHMB. Seule la concentration maximale d'APA, soit 5000 ppm, a permis de tuer plus de 5 Log₁₀ ufc/cm² de *P. aeruginosa* 222P cultivée en TSB, soit une concentration 625 fois plus élevée que celle efficace pour tuer les mêmes cellules à l'état planctonique.

Ainsi et en accord avec les résultats obtenus sur les cellules en suspension, l'acide peracétique semble être le produit permettant d'éliminer le plus de micro-organismes, l'ammonium quaternaire a une activité intermédiaire et la PHMB est la molécule la moins active. En effet, un maximum de 3 et de 2 Log₁₀ ufc/cm² de réduction de la population cultivable ont été dénombrés respectivement pour le CDDMA et la PHMB alors que l'APA entraînait une réduction d'au moins 4 Log₁₀ ufc/cm² de la population des cellules adhérentes viables – cultivables pour une concentration de 5000ppm de principe actif.

Une nette augmentation de résistance (au minimum d'un facteur 10) de ces deux souches bactériennes à l'ammonium quaternaire et à la biguanide peut également être observée. Cette résistance pourrait être liée à un temps de contact trop court entre les molécules désinfectantes et les cellules bactériennes, ainsi qu'à la réactivité des agents antimicrobiens avec les exopolymères bactériens synthétisés suite à l'adhésion bactérienne (Samrakandi *et al.*, 1997).

II.2.2. *Staphylococcus aureus*

Le tableau III-12 est un rappel des CMB obtenues pour les tests de désinfection réalisés sur *S. aureus* 53154 et 221P planctoniques.

Souche	Milieu de croissance	Désinfectant		
		APA	CDDMA	PHMB
<i>S. aureus</i> 53154	TSA	8	10	80
	TSB	8	20	ND
<i>S. aureus</i> 221P	TSA	10	10	80
	TSB	16	20	20

Tableau III-12 : CMB de chaque désinfectant pour *S. aureus* 53154 et 221P en suspension en fonction du milieu de croissance (ND : Non Déterminée).

Les courbes de destruction de *S. aureus* 53154 et 221P obtenues après désinfection des échantillons d'acier AISI 316 avec l'acide peracétique (APA), le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA) et la poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB) sont présentées sur la Figure III-15.

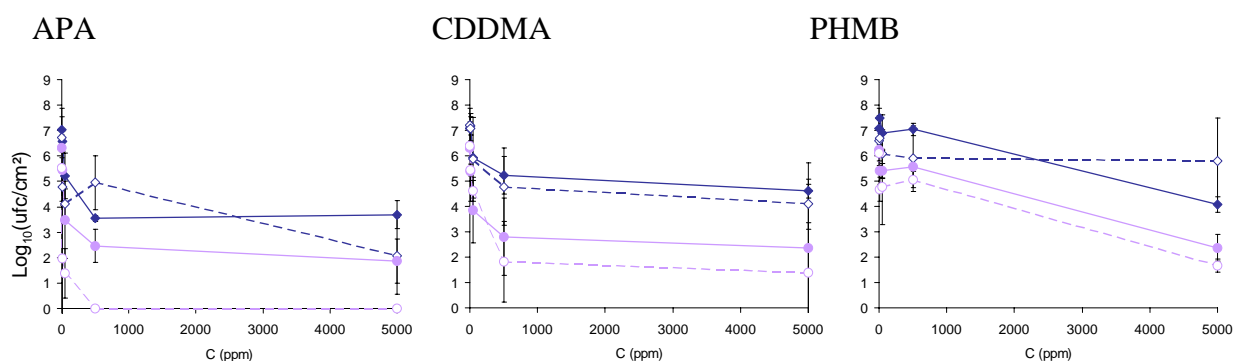


Figure III-15 : Courbes de destruction de *S. aureus* 53154 (◆ et ◇) et 221P (● et ○) adhérentes à l'acier après croissance sur TSA (symboles pleins) et en TSB (symboles creux).

Une destruction totale de la population bactérienne initialement présente par les désinfectants testés était obtenue généralement pour les cellules en suspension (Tableau III-12). En revanche, une éradication totale des bactéries sessiles n'a pu être obtenue excepté pour *S. aureus* 221P cultivée en TSB avec une concentration de 500 ppm d'acide peracétique, concentration toutefois 30 fois plus importante que celle utilisée pour les cellules planctoniques. Ainsi, en accord avec les travaux de Oie *et al.* (1996), l'état adhérent entraîne une augmentation de la résistance des deux souches de *S. aureus* étudiées aux désinfectants.

Pour chaque antimicrobien testé, des réductions minimales de 4 et de 4,45 Log_{10} (ufc/cm²) sont observées pour *S. aureus* 221P cultivée respectivement sur agar et en bouillon nutritif, alors que les réductions décimales de la souche de collection sont au maximum de 3 Log_{10} (ufc/cm²) pour l'ammonium quaternaire et la PHMB. Ainsi, quels que soient le mode de culture et le désinfectant testé, la souche sauvage est apparue plus sensible que la souche de collection à la désinfection, sensibilité probablement liée à une différence de composition de paroi, comme le suggèrent les différences d'hydrophobicité de surface des deux souches (cf. § I.2.). Il est à noter que pour le CDDMA et la PHMB, les conditions de croissance préalable à l'adhésion n'ont pas ou peu d'influence sur la réactivité des cellules adhérentes vis à vis des désinfectants.

De plus, et conformément aux tests de désinfection réalisés sur des cellules planctoniques l'acide peracétique est apparu le plus efficace des trois désinfectants testés. Le plus faible

pouvoir bactéricide sur la souche de collection a pu être noté pour la PHMB. En effet, même à une concentration de 5000 ppm, cet antimicrobien n'a entraîné aucune réduction de la population adhérente de *S. aureus* 53154 cultivée en TSB.

De même que pour les *Pseudomonas*, la faible activité bactéricide de l'ammonium quaternaire et de la PHMB, ainsi que la « stagnation » du nombre de cellules tuées par ces désinfectants peuvent être liées à un temps de contact trop court entre les désinfectants et les cellules bactériennes.

II.2.3. *Listeria monocytogenes*

Les CMB de chaque désinfectant, en fonction des conditions de croissance de ces deux souches en suspension sont rappelées dans le tableau III-13.

Souche	Milieu de croissance	Désinfectant		
		APA	CDDMA	PHMB
<i>L. monocytogenes</i> 103575	TSA	8	10	ND
	TSB	8	20	800
<i>L. monocytogenes</i> 177P	TSA	8	20	ND
	TSB	8	10	80

Tableau III-13 : CMB de chaque désinfectant pour *L. monocytogenes* 103575 et 177P en suspension en fonction du milieu de croissance (ND : Non Déterminée).

La figure III-16 présente les courbes de destruction de *L. monocytogenes* 103575 et 177P obtenues après désinfection des échantillons d'acier AISI 316 avec l'acide peracétique (APA), le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA) et la poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB).

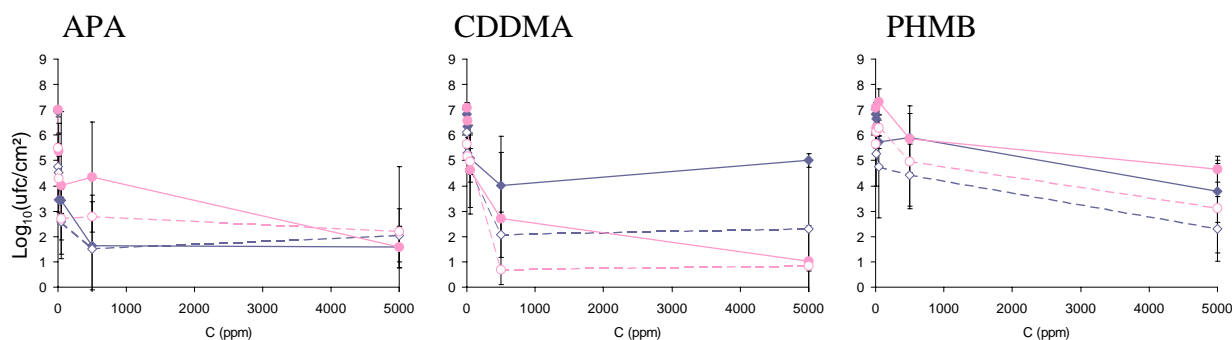


Figure III-16 : Courbes de destruction de *L. monocytogenes* 103575 (◆ et ◇) et 177P (● et ○) adhérentes à l'acier après croissance sur TSA (symboles pleins) et en TSB (symboles creux).

Comme l'indiquent les données du tableau III-13, une destruction totale des bactéries en suspension était obtenue pour des concentrations minimales de 8 ppm pour l'acide peracétique et de 20 ppm pour l'ammonium quaternaire (CDDMA). Dans le cas des cellules adhérentes, cette destruction totale n'a jamais été observée même pour des concentrations en principe actif de 5000 ppm. L'adhésion induit donc une augmentation de la résistance des souches de *L. monocytogenes* aux désinfectants, conformément aux données précédemment obtenues par Frank et Koffi (1990) et plus récemment par Meylheuc (2000).

Si l'on compare maintenant l'activité bactéricide de chaque désinfectant, en accord avec les résultats obtenus sur les cellules en suspension, l'acide peracétique est apparu le plus efficace. Dès 5 ppm de matière active, une diminution de 3 Log₁₀ de la population viable cultivable adhérente de *L. monocytogenes* 103575 cultivée en TSB a été observée. Des concentrations, respectivement de 500 et 5000 de principe actif étaient cependant nécessaires pour obtenir une réduction de 5 Log₁₀ de la population adhérente de *L. monocytogenes* 103575 et 177P.

Comme l'ont préalablement mis en évidence Mafu *et al.* (1990) ou encore Roy *et al.* (1993), l'adhésion augmente également la tolérance des souches de *L. monocytogenes* aux ammoniums quaternaires. Ainsi, une réduction de 3 Log₁₀ des cellules sessiles a nécessité une concentration d'au moins 500 ppm de principe actif. Les cellules de *L. monocytogenes* 177P adhérentes étaient donc 250 fois plus résistantes au chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium que leurs homologues planctoniques.

Il est à noter que conformément aux résultats des tests de désinfection sur cellules en suspension, la PHMB est apparue nettement moins bactéricide que les deux autres désinfectants. En effet, même pour une concentration de 5000 ppm, la réduction maximale des bactéries adhérentes était de 3,7 Log₁₀ pour *L. monocytogenes* 103575 et de 2,5 Log₁₀ pour *L. monocytogenes* 177P. En accord avec les données obtenues sur les cellules en suspension, l'activité bactéricide la plus faible a pu être notée pour les cellules cultivées sur TSA.

Nous avons pu observer que les conditions de croissance *i.e.* milieu solide ou liquide, n'ont que peu d'influence sur l'activité bactéricide de l'acide peracétique. En revanche, le pouvoir antimicrobien de l'ammonium quaternaire et de la biguanide apparaît moindre sur les cellules

cultivées sur TSA comparativement à une croissance en TSB. Ainsi, la croissance sur milieu gélosé en modifiant la synthèse de divers constituants cellulaires (protéines, acides gras) pourrait protéger les cellules bactériennes de ces deux désinfectants.

Enfin, la faible activité bactéricide de l'ammonium quaternaire et de la PHMB, même aux fortes concentrations de matière active (500 et 5000 ppm), pourrait être attribuée d'une part à un temps de contact trop court entre les micro-organismes et les agents désinfectants dont le mode d'action est plus spécifique que celui de l'acide peracétique (Crémieux et Freney, 1995), et d'autre part à une saturation plus rapide des sites de fixation possibles sur la paroi bactérienne dont la surface de contact avec le liquide environnant est inférieure à celle des cellules planctoniques.

Même si une nette augmentation de la tolérance des micro-organismes aux désinfectants a été observée suite à leur adhésion à l'acier, leur activité bactéricide suit la même « hiérarchisation ». Ainsi, en accord avec les tests de désinfection réalisés sur cellules en suspension, les résultats obtenus au cours de cette étape ont montré que l'acide peracétique, petite molécule chimique très réactive (Hoffman, 1971) avait l'activité bactéricide la plus efficace des trois désinfectants testés sur les micro-organismes adhérents à l'acier inoxydable AISI 316. Dans nos conditions expérimentales, l'ammonium quaternaire, agent tensio-actif, présentait une activité létale intermédiaire et la PHMB est apparue comme étant le désinfectant le moins efficace sur cellules adhérentes. Excepté pour l'acide peracétique, il est à noter qu'au delà de 500 ppm, le nombre de réductions décimales de la population bactérienne stagne malgré l'augmentation de la concentration en principe actif. Cette absence d'efficacité des molécules désinfectantes pourrait être due à un manque de sites d'adsorption possibles en raison de la plus petite surface des micro-organismes en contact avec le fluide environnant comparativement aux cellules planctoniques.

En accord avec les travaux de Meylheuc (2000), l'adhésion induit donc une augmentation de la résistance des micro-organismes aux principes actifs antimicrobiens. Comme mentionné précédemment, cette diminution de l'activité bactéricide des molécules antimicrobiennes et plus particulièrement de l'ammonium quaternaire et de la biguanide pourrait être attribuée à un temps de contact trop court entre les micro-organismes et les agents désinfectants dont le mode d'action est plus spécifique que celui de l'acide peracétique (Crémieux et Freney, 1995).

Selon Frank et Koffi (1990), cette diminution de la sensibilité des bactéries vis à vis des désinfectants pourrait s'expliquer par une accessibilité moindre de la population bactérienne adhérente, généralement caractérisée par des amas cellulaires, comparativement aux cellules planctoniques individualisées. De plus, une surface de contact diminuée entre les molécules désinfectante et les bactéries adhérentes peut également expliquer cette augmentation de résistance aux désinfectants (Ntsama-Essomba, 1996).

L'état physiologique des cellules adhérentes influence aussi leur résistance aux désinfectants (Mah et O'Toole, 2001). En effet, l'adhésion des micro-organismes aux surfaces inertes induit des modifications dans l'expression de différents composés cellulaires, notamment des macromolécules de surface telles que des exopolymères, des curli... (Davies *et al.*, 1993 ; Vidal, 1998 ; Sauer et Camper, 2001) pouvant :

- gêner l'accès des désinfectants aux bactéries
- interagir avec les molécules désinfectantes et ainsi « consommer » le produit antimicrobien (Gélinas et Goulet, 1983).

De plus, ces variations physiologiques entre cellules planctoniques et adhérentes en induisant des modifications des caractéristiques énergétiques de surface des bactéries (Briandet, 1999 ; Campanac *et al.*, 2002) peuvent influencer les interactions entre micro-organismes et molécules désinfectantes et en conséquence la sensibilité des cellules bactériennes aux agents antimicrobiens.

II.3. CONCLUSION

La définition d'un protocole standardisé pour tester l'activité désinfectante d'agents antimicrobiens sur cellules adhérentes nous a permis de :

- montrer l'existence d'une variabilité du comportement bioadhésif des différentes souches étudiées en fonction du support solide utilisé i.e. acier inoxydable AISI 316 ou PTFE, ainsi que des conditions de croissance.*
- valider le caractère reproductible des résultats obtenus avec ce protocole.*
- et de confirmer l'augmentation de la résistance des micro-organismes aux désinfectants suite à un état « fixé ».*

Bien que facile à mettre en œuvre et permettant d'avoir une reproductibilité des résultats, ce protocole repose sur l'utilisation de méthodes classiques de microbiologie lourdes et ayant des délais de réponse plus ou moins long. Nous avons donc cherché dans la suite de l'étude à optimiser ce protocole, notamment dans le caractère in situ ainsi que dans les délais d'attente des résultats.

III. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE RAPIDE PERMETTANT D'ÉVALUER *IN SITU* LA VIABILITE DES CELLULES ADHERENTES

III.1. PROTOCOLE DE COLORATION DES CELLULES BACTERIENNES

Pour déterminer le nombre de bactéries viables adhérentes sur une surface, les méthodes de microbiologie classiques bien que simples à mettre en œuvre restent coûteuses, nécessitent beaucoup de temps avant d'obtenir les résultats (temps de croissance des bactéries) et ne permettent généralement pas de détecter les micro-organismes à croissance très lente ou viables non cultivables (VNC) pouvant exprimer leur pouvoir pathogène après avoir « récupéré » leur caractère cultivable (Besnard, 2002).

Il s'avère donc nécessaire de développer des méthodes permettant d'une part l'étude microscopique du comportement adhésif des bactéries aux surfaces inertes et d'autre part la différenciation entre les cellules mortes et viables suite à des traitements de désinfection, afin d'améliorer l'efficacité des formulations désinfectantes.

Ainsi, après avoir *i*) montré l'influence des conditions de croissance et de conservation sur les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes et leur sensibilité vis à vis des désinfectants et *ii*) standardisé un protocole conduisant à une adhésion reproductible des cellules microbiennes à la surface de matériaux modèles et à l'évaluation de l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens, nous nous sommes attachés, au cours de cette partie de l'étude, à mettre en place une méthode rapide permettant d'évaluer *in situ* la répartition et la viabilité des cellules adhérentes avant et après action d'un désinfectant.

Les supports solides utilisés étant opaques, l'utilisation d'un microscope à épifluorescence a été nécessaire. Afin que ce test soit applicable à une large variété de micro-organismes, sans avoir besoin de sondes nucléiques spécifiques (technique FISH) ni de les modifier génétiquement (insertion du gène de la Green Fluorescent Protein), les micro-organismes ont été marqués à l'aide de fluorochromes.

III.1.1. Choix des fluorochromes

A l'heure actuelle, de nombreuses molécules fluorescentes sont proposées en vue de différencier micro-organismes vivants et micro-organismes morts (Lisle, 1999 ; King, 2000).

Ces fluorochromes peuvent être :

- des substrats du métabolisme bactérien libérant une molécule fluorescente après dégradation par les systèmes enzymatiques microbiens,
- des molécules généralement exclues par les cellules « intactes » mais pouvant pénétrer dans des cellules ayant leur membrane cytoplasmique lésée et ainsi augmenter leur fluorescence en s'intercalant dans les bases de l'ADN microbien.

La première catégorie de fluorochromes étant dépendante de l'activité enzymatique des micro-organismes, la fluorescence émise risque d'être sous-estimée suite à des états de stress ou de dormance des bactéries (Caruso *et al*, 2003).

Sachant que les trois désinfectants utilisés (l'acide peracétique, le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium et le chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide)) agissent sur l'intégrité membranaire (Maris, 1995), nous avons choisi d'utiliser comme marqueur de viabilité, un fluorochrome ne pénétrant que dans les micro-organismes dont la membrane cytoplasmique est désorganisée et donc perméable à ces molécules.

Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à un kit commercialisé par la société Molecular Probe (Kit live/dead V-7023) permettant la distinction entre cellules viables et cellules mortes mais également de différencier bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif dans le cas de cultures plurimicrobiennes.

Les marqueurs de viabilité de ce kit, utilisables simultanément, sont des agents intercalant des acides nucléiques *i.e.* le DAPI et le SYTOX Green[®].

Le DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole est une molécule de 350,3 Da se liant avec les acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN. Il est traditionnellement employé pour l'estimation du nombre total de micro-organismes et très couramment utilisé pour les marquages fluorescents multicolores. Le SYTOX Green[®], quant à lui, ne pénètre que dans les cellules dont la membrane plasmique est altérée pour se lier à l'ADN (Roth, 1997).

III.1.2. Mise en place du protocole

III.1.2.1. Coloration des micro-organismes

Pour chaque fluorochrome employé individuellement, des concentrations d'utilisation étaient préconisées par le fabricant. Pour le DAPI, elles sont de 3 μ M pour les bactéries en suspension et de 300nM pour les bactéries adhérentes. Pour le SYTOX Green[®], différentes gammes de concentrations d'utilisation sont proposées en fonction du micro-organisme étudié (bactéries ou cellules eucaryotes), elles sont comprises entre 0,5 et 5 μ M pour des cellules bactériennes en suspension. Ainsi, en fonction de la capacité du SYTOX Green[®] à pénétrer dans les micro-organismes, un ajustement de sa concentration était nécessaire pour qu'un excès de fluorochrome ne marque pas les cellules viables ; et inversement la concentration choisie doit permettre de détecter l'ensemble des cellules mortes.

Pour une utilisation simultanée de ces 2 fluorochromes, une adaptation de leurs concentrations a également été nécessaire. En effet, lié à l'ADN, le SYTOX Green[®] augmente sa fluorescence d'un facteur 500 (Lebaron, 1998 ; Roth, 1997) alors que celle du DAPI n'augmente que d'un facteur 100 (Shapiro, 2000). Ainsi, la concentration en DAPI a dû être augmentée pour permettre sa détection. Cette technique de coloration a d'abord été testée et validée sur cellules planctoniques avant d'être appliquée sur cellules adhérentes.

III.1.2.2. Essais sur cellules planctoniques

Les essais de colorations ont été réalisés avec un mélange des deux fluorochromes dont les concentrations étaient comprises entre 1,43 à 28,6 μ M pour le DAPI et de 0,5 à 5 μ M pour le SYTOX Green[®]. Compte-tenu des difficultés rencontrées pour photographier les cellules en suspension (rapide évanouissement de la fluorescence), nous ne présenterons ici que les photos des cellules colorées avec les concentrations optimales de fluorochromes.

Les résultats sont présentés sur la figure III-17. Les photographies présentées concernent un même champ observé avec les filtres spécifiques de détection de chaque fluorochrome (un couple filtre d'excitation/filtre d'arrêt pour chaque colorant).

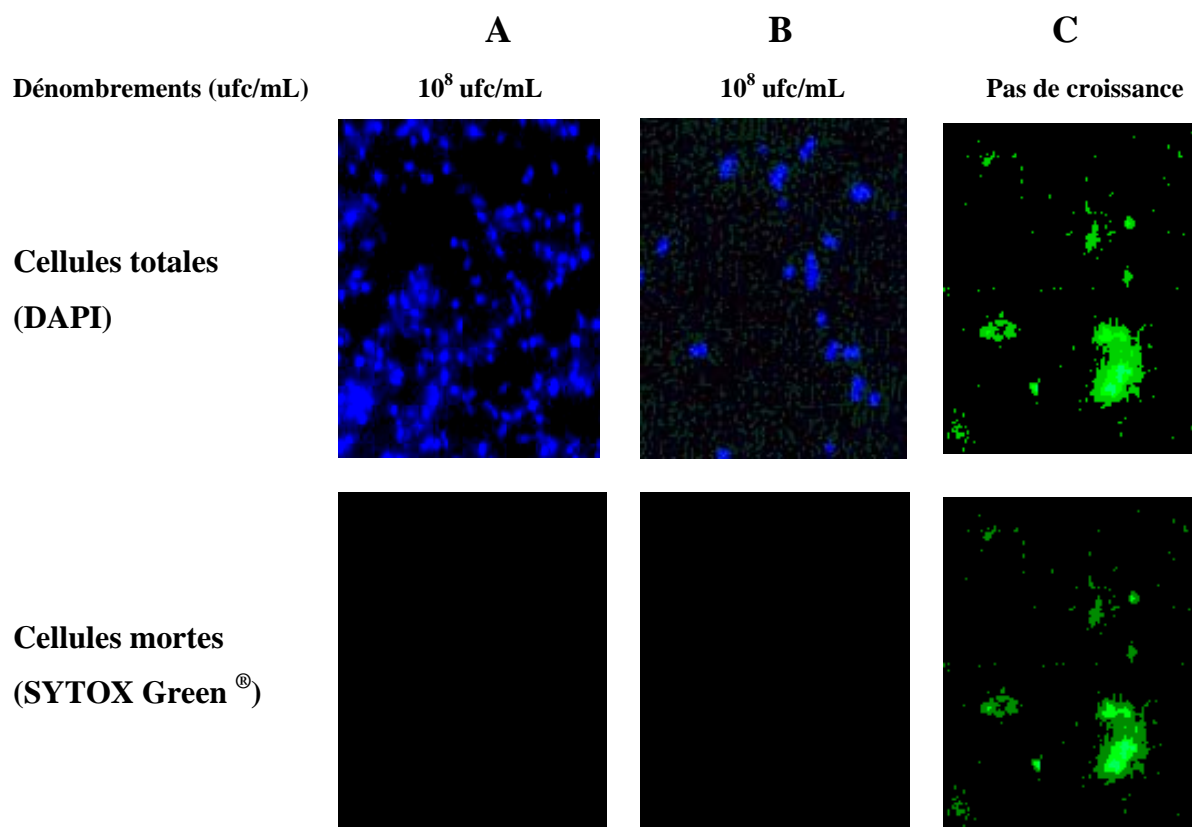


Figure III-17 : Observation au microscope à épifluorescence (obj. x 40) de *Listeria monocytogenes* 10357 (A : Cellules en phase stationnaire de croissance; B : Témoin de désinfection ; C : Test de désinfection).

Comme le montre la figure III-17-A, pour les cellules bactériennes récupérées en début de phase stationnaire de croissance ($\cong 10^8$ ufc/mL) et colorées par une solution de DAPI et de SYTOX Green[®] (aux concentrations respectives de 14,3 μ M et 0,5 μ M), aucune fluorescence n'a été observée à la longueur d'onde d'émission du SYTOX Green[®]. Ainsi, toutes les bactéries, marquées uniquement avec le DAPI, peuvent être considérées comme viables.

De même pour les bactéries mises en contact avec de l'eau distillée en remplacement du désinfectant pour les tests de désinfection (Figure III-17-B), toutes les cellules étaient marquées avec le DAPI et aucun marquage avec le SYTOX Green[®] n'a été détecté (Figure III-17-B). Les ensemencements en gélose nutritive ont par ailleurs confirmé la stabilité du nombre de cellules viables cultivables ($\cong 10^8$ ufc/mL).

Après l'action de la solution d'acide peracétique (5 minutes de contact avec une solution à 20 ppm), plus aucune croissance bactérienne n'a été obtenue après ensemencement en gélose TSA, indiquant ainsi la destruction totale des cellules de *L. monocytogenes* 103575 par ce désinfectant. Les observations au microscope à épifluorescence ont quant à elles montré que

l'ensemble des micro-organismes était marqué avec le DAPI mais également avec le SYTOX Green[®], mettant ainsi en évidence leur perte de viabilité. Le marquage des micro-organismes par le SYTOX Green[®] étant en accord avec les dénombrements des cellules viables cultivables obtenus après ensemencement en gélose nutritive, ce fluorochrome semble donc être un marqueur de viabilité adapté à notre étude.

Suivant les instructions du fournisseur, la concentration de SYTOX Green[®] nécessaire à la détection des bactéries mortes doit être comprise entre 0,5 et 5 μM , gamme de concentration que nous avons testé. Lebaron *et al* (1998) ont ainsi montré qu'une concentration de 1 μM de SYTOX Green[®] pouvait sous-estimer le nombre de cellules mortes, sous-estimation attribuée à la dégradation des acides nucléiques des bactéries stressées (carence nutritionnelle de 46 jours) et donc à une diminution de l'ADN disponible pour la « fixation » du SYTOX Green[®]. Dans nos conditions expérimentales, la concentration optimale en SYTOX Green[®] utilisée était à la limite inférieure des recommandations du fabricant (0,5 μM). En effet, l'utilisation d'une concentration supérieure de ce fluorochrome sur cellules planctoniques entraînait la coloration de cellules viables (observation de bactéries mobiles avec ce marqueur fluorescent). Par ailleurs, le SYTOX Green[®] émettant une fluorescence plus intense que le DAPI, et en accord avec les résultats de Fiksdal et Tryland (1999), une concentration de 14,3 μM de ce dernier était nécessaire pour améliorer sa détection.

Pour chaque souche étudiée, les essais de marquage cellulaire ont donc été réalisés avec des solutions de fluorochromes dont les concentrations étaient comprises entre 0,5 et 5 μM pour le SYTOX Green[®] et entre 1,43 et 28,6 μM pour le DAPI. La détection optimale des deux marqueurs fluorescents a ainsi été obtenue pour une concentration d'utilisation de 0,5 μM et 14,3 μM respectivement pour le SYTOX Green[®] et le DAPI sur une population bactérienne de 10^8 ufc/mL en suspension dans du NaCl 0,15 M.

III.1.2.3. Coloration sur cellules adhérentes

De même que pour les cellules bactériennes en suspension, un ajustement des concentrations de chacun des fluorochromes était nécessaire pour le marquage des bactéries adhérentes. Ainsi et afin d'obtenir un contraste suffisant pour distinguer les deux marqueurs fluorescents, sans sous ou surestimer le nombre de cellules mortes, des concentrations respectives de 71,5 et 2,5µM de DAPI et de SYTOX Green[®] étaient nécessaires, concentrations déterminées de la même manière que pour les cellules planctoniques mais sur des gammes de concentrations allant de 0,5 à 5 µM pour le SYTOX Green[®] et de 14,3 à 143 µM pour le DAPI. Si la concentration d'utilisation du SYTOX Green[®] est en accord avec les recommandations du fabricant, en revanche pour le DAPI, un ajustement a dû être réalisé. Ainsi, la concentration en DAPI est plus de 200 fois supérieure à celle préconisée. L'augmentation de cette concentration pourrait être due à un problème de diffusion du colorant jusqu'aux cellules bactériennes ainsi qu'à une surface de contact moindre entre les bactéries adhérentes et la solution colorante comparativement aux cellules planctoniques.

Le tableau III-14 présente les observations microscopiques de la biocontamination d'échantillons d'acier inoxydable AISI 316 par *S. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 et *P. aeruginosa* A22 en fonction des conditions de croissance préalables alors que la figure III-18 recense les dénombrements obtenus après ensemencement en gélose nutritive.

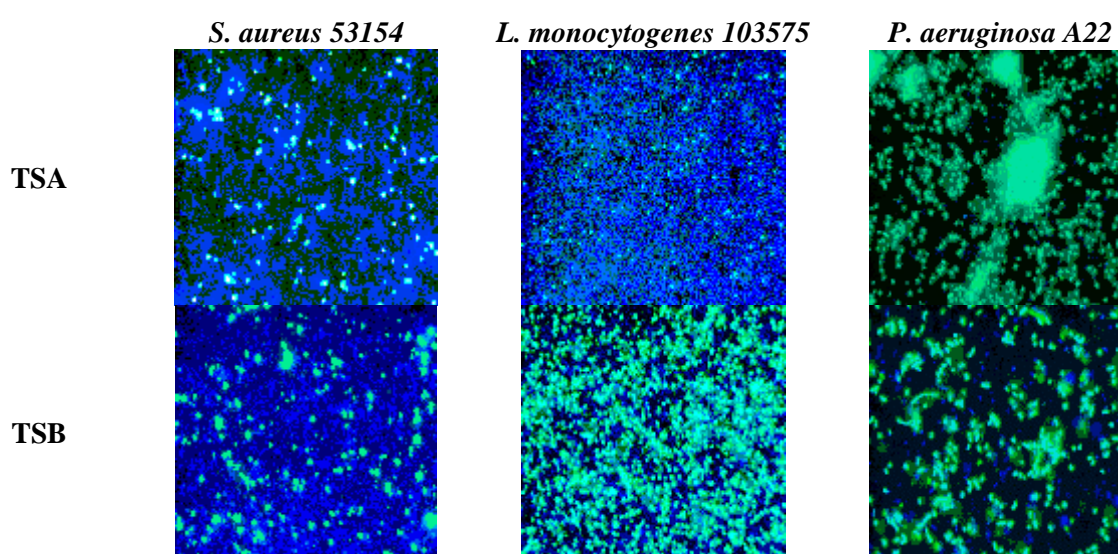


Tableau III-14 : Observation en microscopie à épifluorescence (obj x 40) de *S. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 et *P. aeruginosa* A22 adhérentes à l'acier AISI 316 en fonction des conditions de croissance.

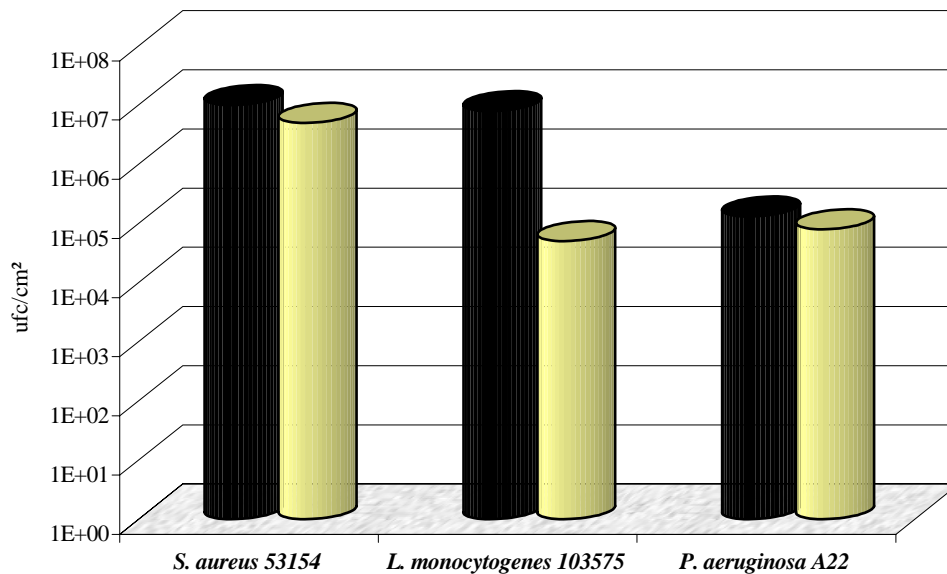


Figure III-18 : Dénombrement des cellules viables cultivables de *S. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 et *P. aeruginosa* A22 adhérentes à l'acier AISI 316 en fonction des conditions de croissance (■ : TSA, ■ : TSB).

Comme le montrent les observations microscopiques (Tableau III-14), cette technique de double coloration nous a permis d'observer l'influence des conditions de croissance sur le comportement bioadhésif des cellules bactériennes (conformément aux résultats du § II-1.) mais également sur la viabilité des cellules adhérentes. En effet, pour les deux souches à Gram positif, une mortalité (fluorescence verte) plus importante a été notée pour les cellules cultivées en bouillon nutritif comparativement aux cultures sur milieu gélosé, résultats en accord avec les dénombrements bactériens obtenus après ensemencement en gélose nutritive (Figure III-18). Les protocoles de croissance peuvent donc entraîner une physiologie différente des bactéries en fonction de leur environnement, et notamment leur adaptation à l'état adhérent.

Concernant *P. aeruginosa* A22, cultivée sur TSA ou en TSB, la majorité des cellules adhérentes fluorescent en vert (cellules mortes). Cette souche est donc apparue particulièrement sensible au stress lié à l'adhésion.

De plus, s'appuyant sur notre expérience, nous avons pu confirmer qu'en évitant la phase de séchage préalable aux observations microscopiques, la répartition des micro-organismes à la surface des échantillons d'acier inoxydable AISI 316 était plus homogène.

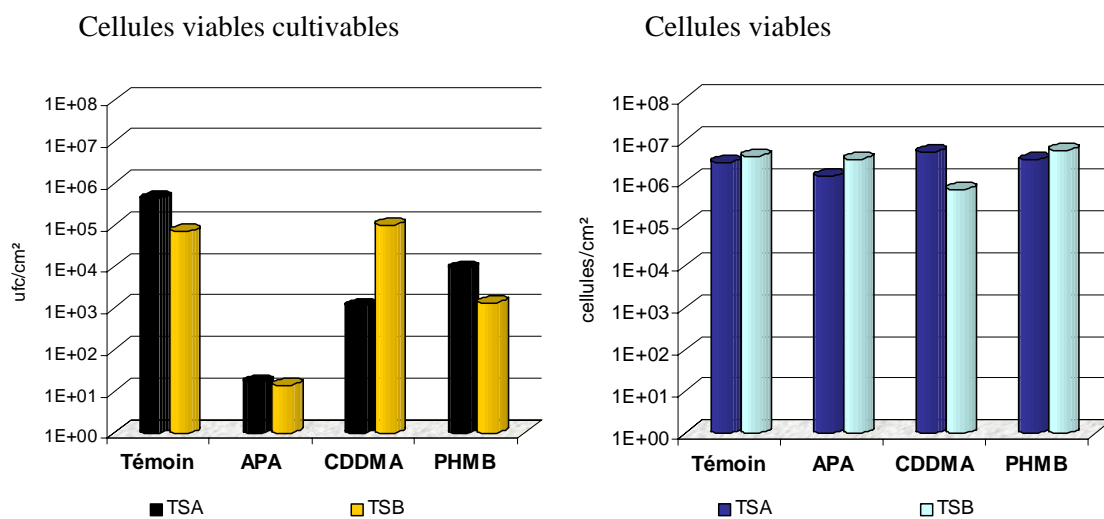
III.2. APPLICATION A LA DESINFECTION DES SURFACES

L'objectif de cette étape était de valider le kit de viabilité mis en place dans l'étape précédente pour tester l'activité bactéricide des agents antimicrobiens sur cellules adhérentes.

Les tests de désinfection ont été réalisés avec des solutions à 5000 ppm d'acide peracétique (APA), de chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDMA) et de poly(hexaméthylène-biguanide) (PHMB).

Les observations réalisées au microscope à épifluorescence ont permis de déterminer le nombre de cellules adhérentes viables (exprimé en cellules/cm²). Ces résultats ont été comparés au nombre de cellules adhérentes viables cultivables (ufc/cm²) dans les figures III-19, III-20 et III-21 respectivement pour les souches de *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*.

P. aeruginosa A22



P. aeruginosa 222P

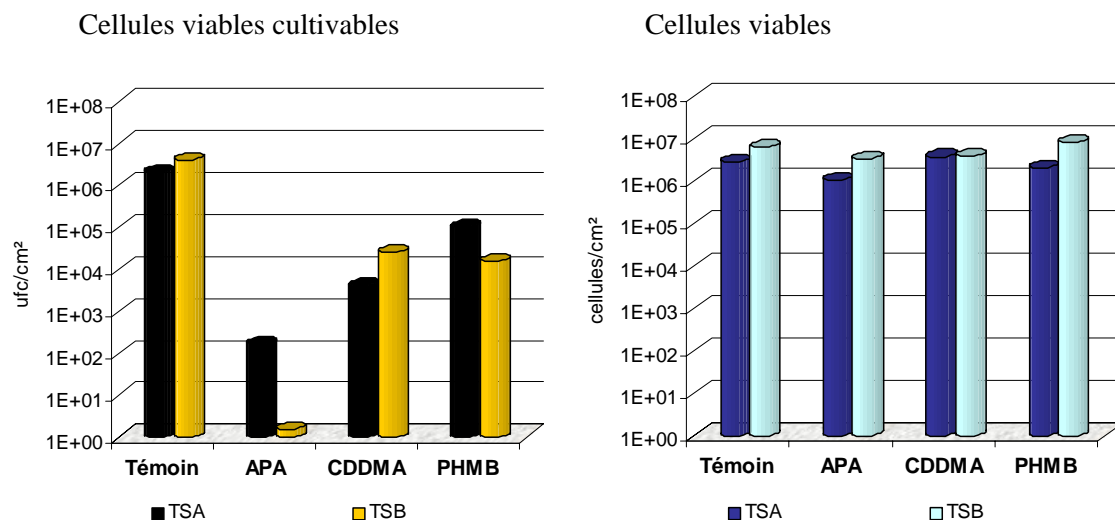
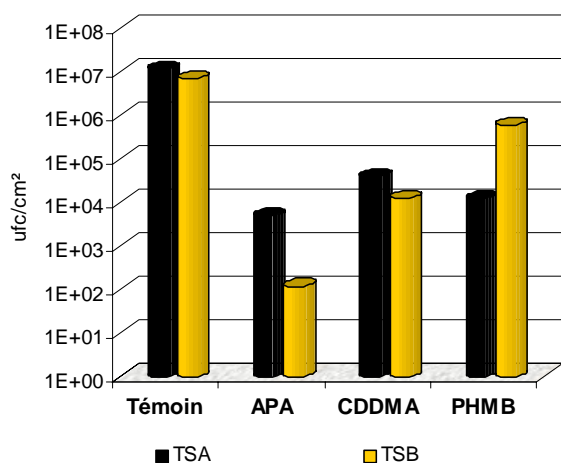


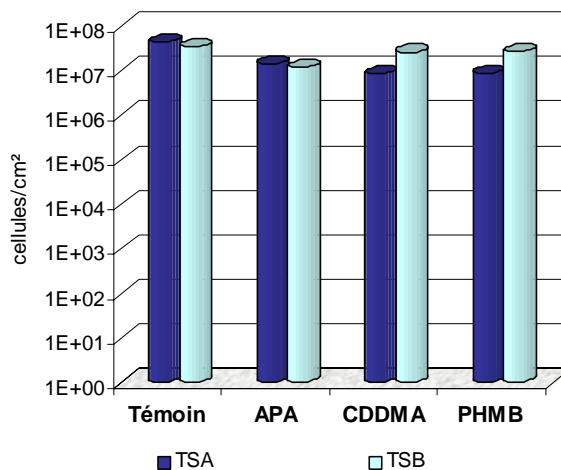
Figure III-19 : Evaluation de la viabilité des cellules de *P. aeruginosa* A22 et 222P adhérentes à l'acier après contact avec 5000 ppm de chacun des désinfectants.

***S. aureus* 53154**

Cellules viables cultivables

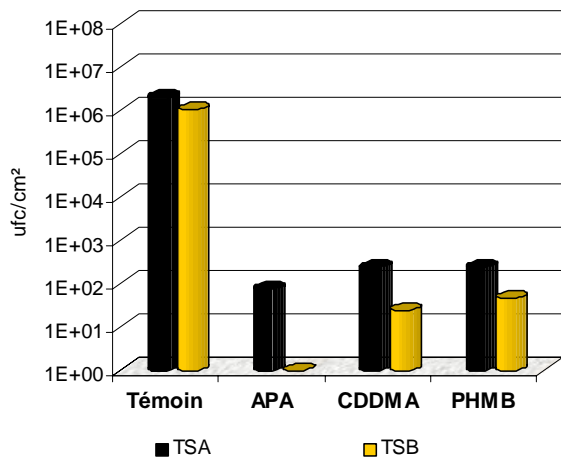


Cellules viables



***S. aureus* 221P**

Cellules viables cultivables



Cellules viables

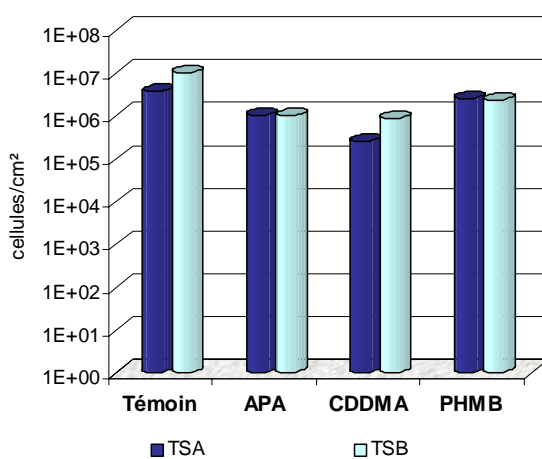
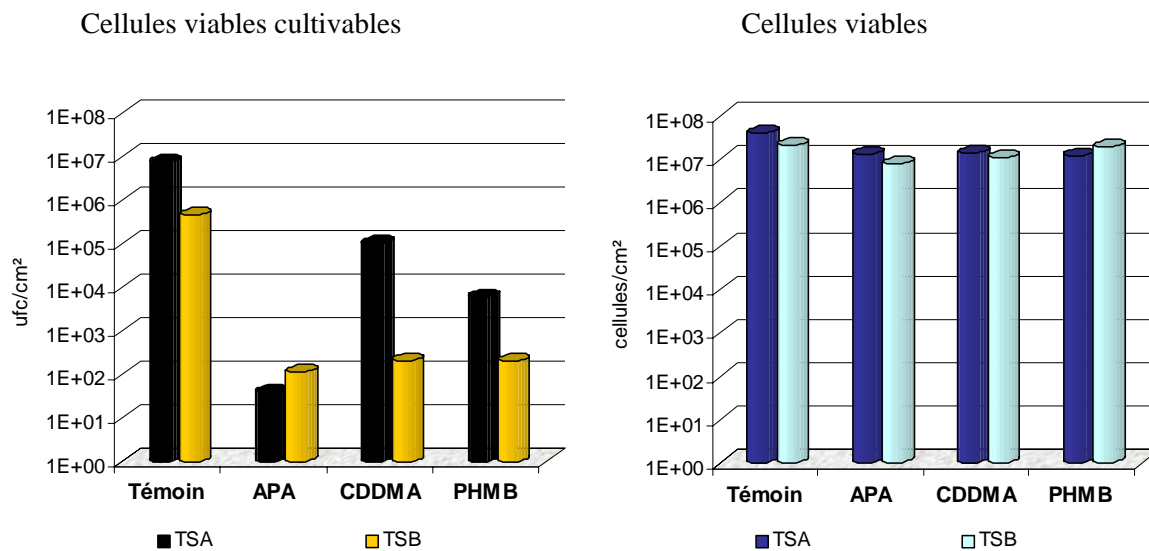


Figure III-20 : Evaluation de la viabilité des cellules de *S. aureus* 53154 et 221P adhérentes à l'acier après 5 minutes de contact avec 5000 ppm de chacun des désinfectants.

L. monocytogenes 103575



L. monocytogenes 177P

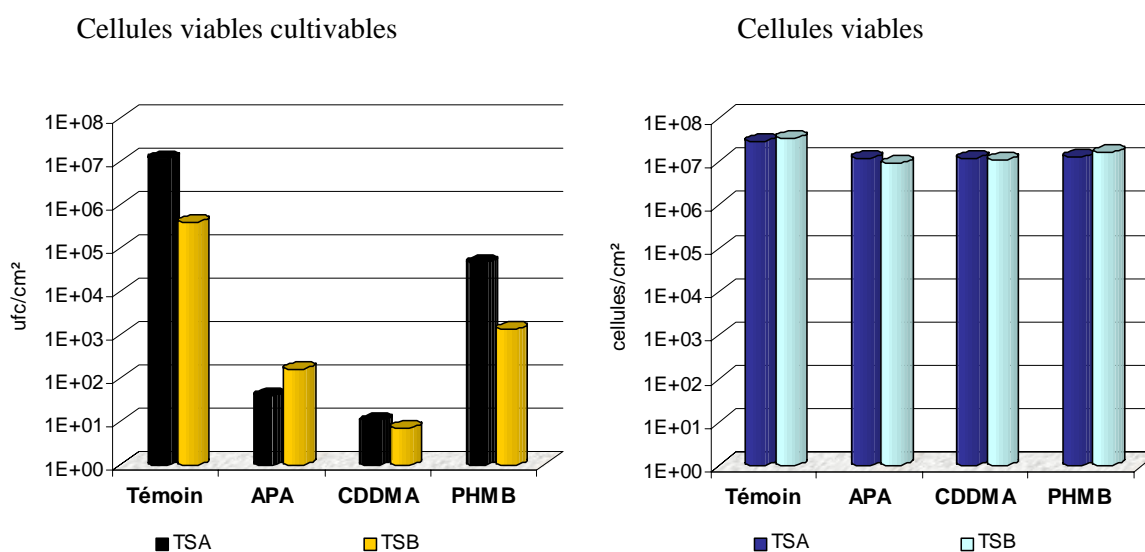


Figure III-21 : Evaluation de la viabilité des cellules de *L. monocytogenes* 103575 et 177P adhérentes à l'acier après 5 minutes de contact avec 5000 ppm de chacun des désinfectants.

Comme le montrent les résultats des figures III-19, III-20 et III-21, le nombre de cellules viables cultivables est généralement inférieur au nombre de cellules viables déterminé par microscopie à épifluorescence.

Pour les témoins de désinfection cette différence de résultats était particulièrement marquée pour *P. aeruginosa* A22 (souche de collection) (Figure III-19) *i.e.* $\cong 10^5$ cellules viables cultivables/cm² et $\cong 10^6$ cellules viables/cm². Cette souche à Gram négatif, sensible à l'absence de matière organique dans le milieu environnant (van Klingeren, 1998), apparaît donc peu résistante au stress de l'adhésion.

De même, pour les bactéries à Gram positif étudiées (Figures III-20 et III-21) les dénombrements des cellules viables cultivables étaient également inférieurs à ceux obtenus pour les cellules viables, plus particulièrement pour les cellules préalablement cultivées en TSB. Ces souches sont donc apparues moins sensibles au « stress » de l'adhésion après une croissance sur milieu solide, conditions de culture pendant lesquelles les micro-organismes peuvent être apparentés à des cellules « fixées ». Ainsi, et en accord avec les données obtenues précédemment (cf. § III-1.2.3), les conditions de croissance (milieu solide ou liquide) influencent donc l'état physiologique des cellules adhérentes.

Après le traitement des supports contaminés avec les trois désinfectants, quelle que soit la souche considérée, une diminution de la population bactérienne viable a pu être observée. Les observations microscopiques ont également permis de confirmer la plus faible activité bactéricide de la PHMB (comparativement à l'acide peracétique et à l'ammonium quaternaire) sur cellules adhérentes, données comparables aux dénombrements des cellules viables cultivables.

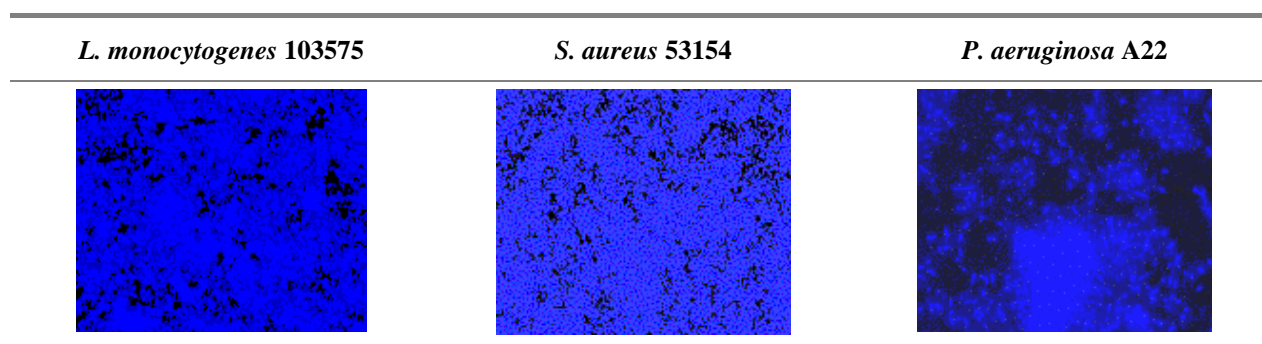


Tableau III-15 : Adhésion de *L. monocytogenes* 103575, *S. aureus* 53154 et *P. aeruginosa* A22 à l'acier inoxydable, observation au microscope à épifluorescence des cellules marquées avec le DAPI (flore totale).

Ainsi, les dénombrements des cellules adhérentes par microscopie à épifluorescence ont mis en évidence une résistance des micro-organismes adhérents vis à vis des désinfectants plus importante que celle observée avec les techniques classiques de microbiologie

(décrochage des cellules et mise en culture). Ce phénomène était plus particulièrement marqué pour les souches formant des amas bactériens telle que *P. aeruginosa* A22 (Tableau III-15). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les différences de résultats obtenues entre les deux techniques utilisées et plus particulièrement :

- La présence d'agrégats bactériens. En effet, l'utilisation d'un microscope à épifluorescence ne permet pas d'observer les cellules au sein de ces amas et un biais peut alors apparaître dans l'analyse des résultats. Cette technique ne peut donc être utilisée que pour des cellules adhérant en monocouche ; pour l'étude de biofilms ou de dépôts tridimensionnel, l'utilisation d'un microscope confocale laser permettrait d'étudier la viabilité des cellules dans la profondeur des dépôts et donc permettre des observations en trois dimensions.

- La cultivabilité des cellules. Après les essais de désinfection, nous avons pu observer une perte de cultivabilité des micro-organismes après 5 minutes de contact avec les différents désinfectants alors que les résultats obtenus avec les marqueurs de viabilité ont montré une réduction moins prononcée de la population bactérienne viable. En 1999, Caro *et al.* avaient observé qu'un traitement UV, de 3 minutes, d'une suspension de *S. typhimurium* entraînait une importante diminution de la population cultivable (moins de 15% des cellules) alors que 93% de cette même population avaient conservé son intégrité membranaire ainsi que son activité métabolique. Ainsi, un temps de contact court (5 minutes) entre micro-organismes et désinfectants n'entraînerait pas toujours une mort cellulaire mais plutôt une perte de « cultivabilité » des cellules bactériennes, perte susceptible d'être levée par des protocoles de revivification adaptés. Ainsi, l'utilisation de fluorochromes réagissant avec différentes fonctions cellulaires (chaînes de transport des électrons...) pourrait être envisagée pour étudier les différents états physiologiques des cellules adhérentes.

- Aux différentes étapes nécessaires à la réalisation des dénombrements des bactéries viables cultivables. En effet, ces dénombrements sont réalisés après décrochage des cellules des supports récepteurs sous l'action des ultra-sons, agent pouvant dans certains cas améliorer l'efficacité de molécules antimicrobiennes (Pitt *et al.*, 1994). De plus, la multiplication du nombre d'étapes intermédiaires (dilutions...) avant les ensemencements en gélose nutritive peut augmenter la perte des micro-organismes viables cultivables.

Ainsi, l'utilisation de fluorochromes pourrait non seulement permettre d'obtenir une évaluation rapide et *in situ* de l'efficacité d'un désinfectant sur cellules adhérentes mais également une évaluation de l'état physiologique des micro-organismes « fixés ».

III.3. CONCLUSION

Comme nous l'avons indiqué dans notre préambule, l'amélioration de l'efficacité des produits désinfectants nécessite le développement de méthodes tests permettant d'évaluer rapidement leur activité bactéricide sur des micro-organismes adhérant aux surfaces inertes. A cette fin, nous avons établi un protocole permettant d'observer in situ la viabilité des cellules adhérentes par microscopie à épifluorescence. Cette technique simple et rapide à mettre en œuvre permet d'obtenir des résultats dans la journée contrairement aux techniques microbiologiques classiques nécessitant plus de temps.

Néanmoins, des différences entre les deux protocoles ont été observé. En effet, les dénombrements des cellules viables cultivables obtenus par ensemencement étaient généralement inférieurs à ceux de la population viable déterminés par marquage fluorescent, laissant supposer une diminution de la cultivabilité des micro-organismes liée à différents stress (ultra-sons...) mais également à une perte de cellules viables cultivables à chaque étape du protocole de dénombrement par ensemencement en gélose nutritive.

Ce protocole de coloration, applicable pour des cellules adhérentes en monocouches sur supports inerts ayant montré sa validité, nous l'avons utilisé pour déterminer dans la dernière partie du travail de thèse l'influence de l'environnement (dureté de l'eau, film primaire) sur la bioadhésion et la décontamination des surfaces.

IV. FILMS PRIMAIRES ET QUALITE DE L'EAU : IMPACT SUR LA BIOADHESION ET LA VIABILITE CELLULAIRE

Tous les essais d'adhésion des microorganismes aux surfaces ainsi que les tests de désinfection des cellules adhérentes ont été réalisés jusqu'à présent dans des conditions modèles (surface propre, fluide simple...). Cependant, dans de nombreux secteurs d'activités, les surfaces sont rarement exemptes de contaminants extérieurs (chimique, microbiologique) de par leur « passé » et la nature des fluides environnants. En effet, quel que soit le domaine d'application (IAA ou secteur médical), les surfaces sont généralement en contact avec des milieux complexes contenant des protéines, des acides gras, des polysaccharides... et soumis à des procédures de désinfection et de rinçages réguliers.

Ainsi, l'encrassement des surfaces solides par des molécules organiques est un phénomène inévitable et le plus souvent indésirable (Wahlgren et Arnebrant, 1991), pouvant engendrer une perte de fonctionnalité de l'équipement. Cet encrassement des surfaces correspond généralement à une adsorption moléculaire à la surface du matériau en contact, phénomène dans lequel les protéines jouent un rôle prédominant (Garry, 1997).

Les surfaces sont également régulièrement en contact avec des formulations nettoyantes et/ou désinfectantes contenant, entre autres, des tensioactifs et/ou différents principes actifs. Ces molécules et macromolécules, également capables de s'adsorber sur les surfaces, sont donc susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques de surface de matériaux (Boulangé-Petermann, 1993).

L'objectif de cette dernière partie de l'étude était donc d'étudier l'impact de l'adsorption de différentes molécules chimiques, encrassantes et antimicrobiennes, sur la surface de l'acier inoxydable AISI 316 et de la qualité de l'eau, osmosée ou eau dure, sur la biocontamination des surfaces et la viabilité des cellules adhérentes, mais également sur leur résistance aux agents désinfectants.

IV.1. DETERMINATION DES CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DE L'ACIER CONDITIONNE OU NON

Les conditionnements de surface des échantillons d'acier ont été réalisés avec i) une solution pure d'une protéine modèle, la Sérum Albumine Bovine (SAB), ii) une solution organique complexe, le lait entier, et iii) les trois agents antimicrobiens préalablement utilisés dans les essais de désinfection (l'acide peracétique, le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium et le

chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide)). Le milieu de dilution des différentes molécules conditionnantes était l'eau osmosée ou l'eau dure à 20°F.

IV.1.1. Conditionnement par un encrassement organique

Le tableau III-16 regroupe les angles de contact mesurés à l'eau ainsi que les images obtenues par AFM de l'acier conditionné ou non avec les solutions encrassantes en fonction du liquide de dilution.

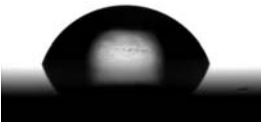


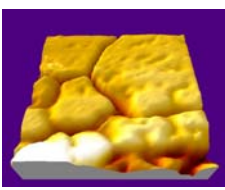
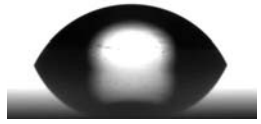
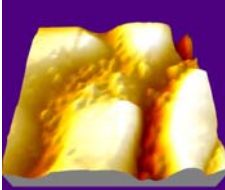
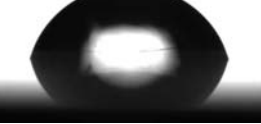
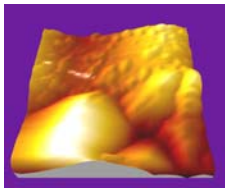
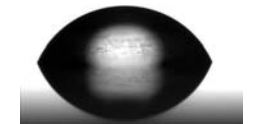
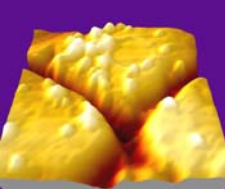
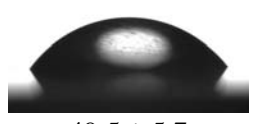
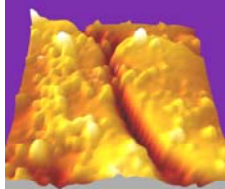
	Eau osmosée		Eau dure	
	Angle de contact à l'eau (°)	AFM	Angle de contact à l'eau (°)	AFM
Témoin	 69 ± 1,8		 57,4 ± 11,8	
SAB	 59,8 ± 12,7		 56,7 ± 13,7	
Lait	 62,3 ± 5,1		 49,5 ± 5,7	

Tableau III-16 : Angle de contact mesurés à l'eau (°) et observations en AFM de l'acier AISI 316 avant et après encrassement en fonction de l'eau utilisée (osmosée ou distillée).

Les angles de contact mesurés, à l'eau, au formamide et au diiodométhane, couplés à l'équation de Youn-van Oss (van Oss, 1988), nous ont quant à eux permis de calculer l'énergie de surface de l'acier AISI 316 (γ_s), ainsi que ses composantes van der Waals (γ^{LW}), donneur d'électrons (ou Lewis-base) (γ^-) et accepteur d'électrons (ou Lewis-acide) (γ^+), avant et après encrassement (Figure III-22).

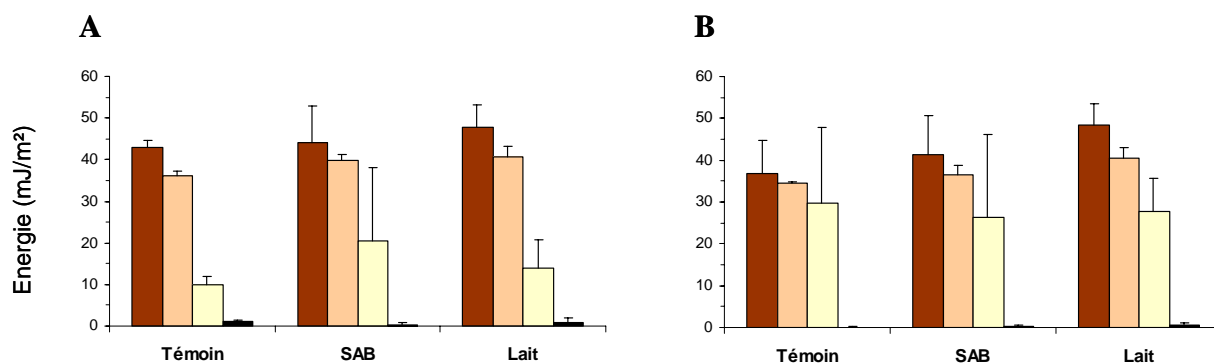


Figure III-22 : Caractéristiques énergétiques de l'acier (γ_s , γ^{LW} , γ^- et γ^+) suite à l'adsorption de molécules encrassantes en fonction de la qualité de l'eau : eau osmosée (A) ou en eau dure à 20°F (B).

IV.1.1.1. Influence de la qualité de l'eau

Avec des angles de contact mesurés à l'eau respectivement de 57,4° et 69°, l'acier inoxydable AISI 316 est apparu plus hydrophile après 1 heure d'immersion dans l'eau dure à 20°F comparativement à l'eau osmosée (Tableau III-17). Comme le montre la figure III-22, cette augmentation d'hydrophilie est liée à une nette augmentation de la composante γ^- (donneur d'électrons) des échantillons. Les évolutions de caractéristiques énergétiques de surface de l'acier observées sont très certainement dues aux ions présents dans l'eau dure. En effet, les ions s'adsorbent généralement spontanément à une surface solide immergée dans une solution de sels et peuvent ainsi en modifier les caractéristiques électriques de surface (Briant, 1989). Ainsi, l'acier étant chargé négativement (Boulangé-Petermann, 1993), les cations monovalents et divalents *i.e.* Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} , pourront s'adsorber et influencer les interactions électrostatiques entre les micro-organismes en suspension ainsi que les molécules et macromolécules en solution et le support récepteur. Cependant, l'augmentation du caractère électron-donneur laisse supposer une stratification des ions adsorbés.

IV.1.1.2. Solution modèle : la SAB

En accord avec des études précédentes (Allion, 2000 ; Chevallier, 2002), les résultats du Tableau III-16 montrent une augmentation de l'hydrophilie de surface du matériau suite à l'adsorption de la SAB. En effet, les angles de contact mesurés à l'eau étaient respectivement de 69° et 59,8° avant et après conditionnement en eau osmosée ; évolution d'hydrophilie de surface liée à une augmentation du caractère donneur d'électrons de l'acier (Figure III-22).

Il est à noter que le recouvrement de l'acier par la SAB n'est pas uniforme. En effet, une importante variation des angles de contact mesurés à l'eau (écart-types supérieurs à 10°) a pu

être constatée. Cette hétérogénéité d'adsorption de la SAB a été confirmée par les images obtenues par AFM. Les molécules de SAB étaient en majorité présentes dans les joints de grains ; reflétant ainsi soit une adsorption préférentiellement de cette protéine dans les joints de grain de l'acier, soit un réarrangement des molécules adsorbées suite au passage des interfaces liquide-air pendant les phases de rinçage et de séchage des échantillons.

En eau dure, nous avons noté peu de variations des angles de contact mesurés à l'eau entre les échantillons d'acier témoin et l'acier conditionné avec la protéine (Tableau III-16) mais les écarts-types importants indiquent toutefois une surface hétérogène. Il est à noter que les mesures d'angles de contact réalisées avec les trois liquides (eau, formamide et diiodométhane) ont montré une hausse de l'énergie de surface totale de l'acier due à une augmentation de sa composante de van der Waals. Les images obtenues par AFM ont confirmé la présence de molécules de SAB adsorbées aux supports d'acier mais cette adsorption est apparue plus éparse que pour les essais d'adsorption réalisés en eau osmosée. Ainsi, comme l'a montré précédemment Rubio (2002), les ions présents dans les solutions conditionnantes et dans l'eau de rinçage, en modifiant la conformation de la SAB ainsi que les propriétés de surface des matériaux, peuvent influencer la quantité ainsi que la disposition des molécules adsorbées à la surface de l'acier AISI 316.

De plus, l'adsorption de la SAB étant proportionnelle à la charge de surface des matériaux (Fukuzaki *et al.*, 1996 ; Krajewski *et al.*, 1998), leur neutralisation par les ions présents dans l'eau dure peut, en occupant des sites potentiel de fixation de la protéine, influencer l'adsorption de la SAB à l'acier inoxydable AISI 316.

IV.1.1.3. Solution complexe : le lait

Quel que soit le liquide de dilution utilisé (eau osmosée ou eau dure), un conditionnement de surface de l'acier AISI 316 par une solution de lait à 1% entraîne une augmentation de son hydrophilie de surface. En effet, l'angle de contact mesuré à l'eau passe de 69° à 62° et de 57° à 49° respectivement pour l'eau osmosée et l'eau dure. (Tableau III-16). Un conditionnement de surface par une solution de lait entraîne une augmentation de l'hydrophilie de surface de l'acier essentiellement liée à une hausse de sa composante de van der Waals de 36,2 à 40,6 mJ/m² pour l'eau osmosée et de 34,6 à 40,6 mJ/m² pour l'eau dure (Figure III-22).

Le conditionnement des échantillons d'acier par le lait entier est apparu plus homogène que celui par la SAB. En effet, les écart-types des angles de contact mesurés sont d'environ 5°. De plus, les images obtenues par AFM (Tableau III-16) ont montré que les constituants du lait

s'adsorbent aussi bien au niveau de la surface des grains que dans les joints de grains de l'acier; le dépôt de lait est apparu plus important que celui de la SAB.

Les constituants du lait ayant des propriétés différentes (point isoélectrique, charge nette, structure et stabilité en solution...) (Alais, 1974), ils auront des niveaux d'adsorption variables (McGuire et Krisdhasima, 1991) ; ainsi, la κ -caséine ayant un caractère amphiphile marquée et une structure « désordonnée », aura une adsorption supérieure à une protéine globulaire (β -lactoglobuline) aux surface de chrome (Wahlgren et Arnebrant, 1991). Dans une solution contenant plusieurs molécules et macromolécules, l'adsorption moléculaire, dépendante des interactions avec les couches de molécules préalablement adsorbées (Tie *et al*, 2003) pourrait donc induire une augmentation du niveau d'adsorption comparativement à des éléments pris séparément (Figure III-23).

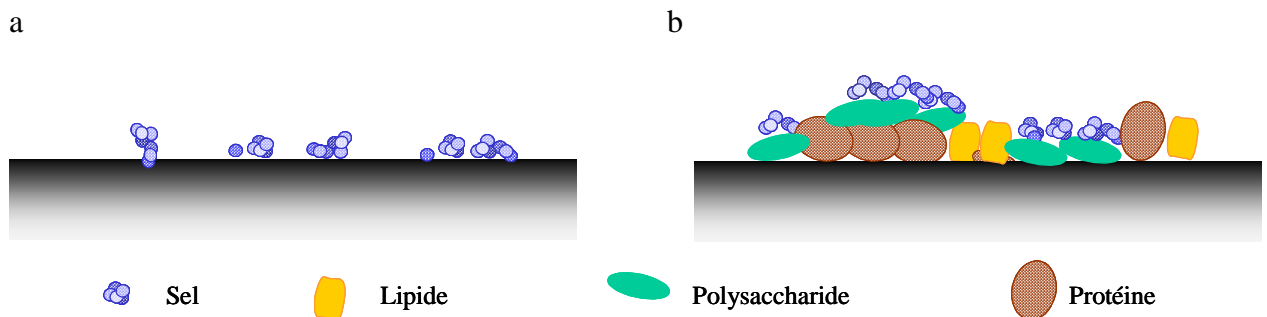


Figure III-23 : Schéma de l'adsorption moléculaire d'une solution pure (a) et d'une solution complexe (b).

Il est à noter que la solution de lait reconstituée utilisée est un mélange complexe de molécules et macromolécules (globules gras, protéines) mais également de sels minéraux (Alais, 1974). De ce fait, les ions présents dans les liquides de dilution et de rinçage n'ont que peu d'influence sur l'adsorption des composants du lait, contrairement à la solution de SAB (Tableau III-16).

IV.1.2. Adsorption des agents antimicrobiens

Le tableau III-17 regroupe les photos des angles de contact mesurés à l'eau sur l'acier inoxydable AISI 316 conditionné ou non avec les agents antimicrobiens en fonction du liquide de dilution utilisée (eau osmosée ou eau dure à 20°F).

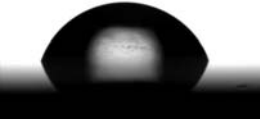
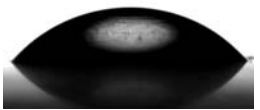
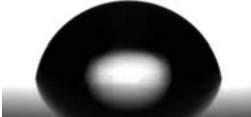
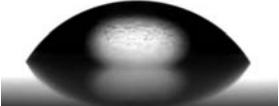
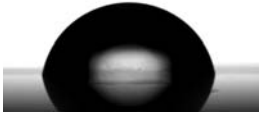

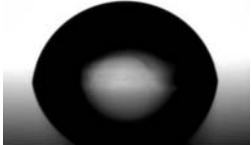
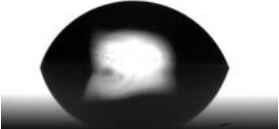
		Eau osmosée		Eau dure	
Témoin	$69 \pm 1,8$			$57,4 \pm 11,8$	
APA	$67,1 \pm 7,1$			$53,8 \pm 5,3$	
CDDMA	$71,1 \pm 7,2$			$58,4 \pm 9,6$	
PHMB	$77 \pm 11,1$			$65,3 \pm 7,1$	

Tableau III-17 : Angle de contact à l'eau (°) mesuré sur l'acier avant et après conditionnement par les agents antimicrobiens.

L'énergie de surface de l'acier AISI 316 (γ_s), ainsi que ses composantes van der Waals (γ^{LW}), donneur d'électron (ou Lewis-base) (γ^-) et accepteur d'électron (ou Lewis-acide) (γ^+), avant et après conditionnement par les désinfectants sont représentées sur la figure III-24.

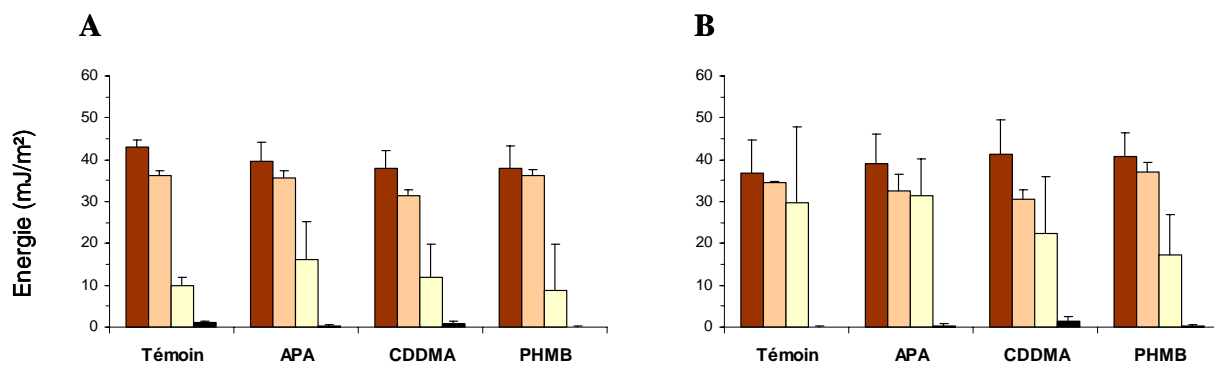


Figure III-24 : Caractéristiques énergétiques de l'acier (γ_s , γ^{LW} , γ^- et γ^+) suite à l'adsorption d'agents antimicrobiens en fonction de la qualité de l'eau : eau osmosée (A) ou eau dure à 20°F (B).

Concernant le traitement de surface de l'acier par les molécules antimicrobiennes, celui-ci est apparu moins marqué que pour les solutions encrassantes.

Comme le montrent les résultats du tableau III-17, et compte - tenu des écart-types, l'acide peracétique et l'ammonium quaternaire dilués en eau osmosée n'ont pas ou peu d'influence sur le caractère hydrophile de l'acier AISI 316. Les écart-types des angles mesurés à l'eau étant supérieur à 5°, une hétérogénéité de surface de l'acier a été observée suite au contact

des supports solides avec ces deux désinfectants. Il est à noter que le caractère donneur d'électron (γ^-) de l'acier augmente après une heure de contact avec l'APA en solution en eau distillée et diminue après une heure de conditionnement avec l'ammonium quaternaire dilué dans de l'eau dure (Figure III-24). Ainsi, même si les mesures d'AFM n'ont montré aucune différence entre les surfaces témoins et les surfaces conditionnées (résultats non montrés), les mesures d'angle de contact mettent en évidence une modification des surfaces après une heure de contact avec l'acide peracétique et l'ammonium quaternaire. En effet, par leur structure, les chlorures d'ammoniums quaternaires sont stables et peuvent s'adsorber aux surfaces chargées négativement, ce qui est généralement le cas des aciers inoxydables (Boulangé-Petermann *et al.*, 1995).

Concernant la PHMB, elle diminue l'hydrophilie de surface de l'acier (angles de contact mesurés à l'eau respectivement de 69° et 77° avant et après conditionnement avec cette molécule) ; réduction de l'hydrophilie de surface liée à une diminution du caractère donneur d'électron (γ^-) de l'acier (Figure III-24). Des résultats similaires ont pu être observés pour le désinfectant dilué en eau dure. Une diminution du caractère électrons donneur de l'acier a donc pu être observé après adsorption des deux molécules cationiques.

En accord avec des études précédentes (Boulangé-Petermann *et al.*, 1994 ; Sinde et Carballo, 2000), nous avons donc mis en évidence une évolution des propriétés physico-chimiques de surface de l'acier inoxydable en fonction des molécules utilisées dans les formulations nettoyantes et/ou désinfectantes, modification des caractéristiques physico-chimiques de surface pouvant influencer la biocontamination des matériaux (nombre et forces d'adhésion) et la viabilité des cellules adhérentes comme nous avons cherché à l'évaluer dans la dernière partie de notre étude.

IV.2. IMPACT SUR LE COMPORTEMENT BIOADHESIF ET LA VIABILITE DES MICRO-ORGANISMES ADHERENTS

IV.2.1. Molécules encrassantes

Le tableau III-18 présente les résultats obtenus à partir des observations réalisées au microscope à épifluorescence *i.e.* nombre de cellules adhérentes totales (T) et nombre de cellules mortes (M) par cm².

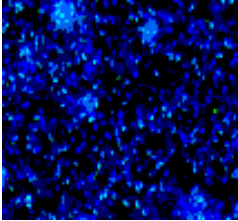
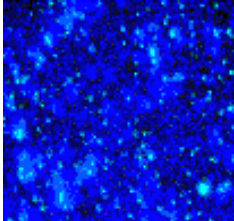
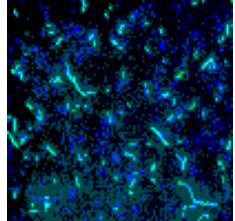
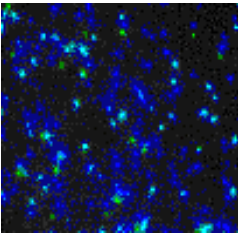
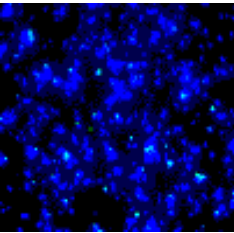
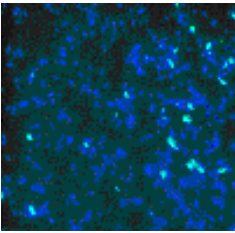
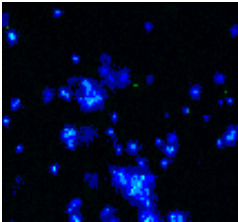
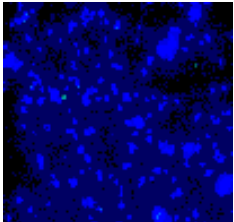
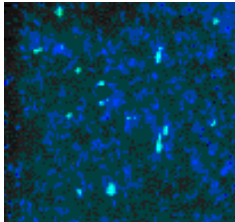
	<i>L. monocytogenes</i> 103575	<i>S. aureus</i> 53154	<i>P. aeruginosa</i> A22
Témoin	 <p>T : $2,3 \cdot 10^7$ M : $8,6 \cdot 10^6$</p>	 <p>T : $2,3 \cdot 10^8$ M : $1,0 \cdot 10^6$</p>	 <p>T : $2,9 \cdot 10^7$ M : $6,5 \cdot 10^7$</p>
SAB	 <p>T : $1,4 \cdot 10^4$ M : $4,0 \cdot 10^3$</p>	 <p>T : $1,1 \cdot 10^5$ M : $2,6 \cdot 10^3$</p>	 <p>T : $2,7 \cdot 10^4$ M : $1,7 \cdot 10^3$</p>
Lait	 <p>T : $2,6 \cdot 10^4$ M : $3,8 \cdot 10^3$</p>	 <p>T : $5,5 \cdot 10^4$ M : $1,8 \cdot 10^3$</p>	 <p>T : $3,1 \cdot 10^4$ M : $1,0 \cdot 10^3$</p>

Tableau III-18 : Adhésion (T : Nombre total de cellules adhérentes par cm^2) et viabilité (M : Nombre de cellules mortes par cm^2) des souches de collection à l'acier encrassé ou non (observations au microscope à épifluorescence obj. x40).

Comme le montrent les images des micro-organismes adhérents colorés avec la solution de DAPI-SYTOX GREEN[®], le liquide de suspension a peu d'influence sur l'adhésion des cellules bactériennes à l'acier inoxydable AISI 316. En effet, malgré l'impact de la nature de l'eau de rinçage utilisée sur les propriétés physico-chimiques de surface de l'acier inoxydable (cf §IV-1), l'eau dure utilisée (dont la conductivité de 0,79 est inférieure à celle du NaCl 0,15 M précédemment utilisé) n'a que peu ou pas d'effet sur le nombre de cellules adhérentes.

En revanche, l'encrassement organique de l'acier par la SAB et le lait, ayant un impact plus important que la qualité de l'eau sur les caractéristiques physico-chimiques de surface de l'acier, modifie potentiellement le comportement adhésif des cellules bactériennes aux supports solides.

Comme l'avaient préalablement mis en évidence les équipes d'Al-Makhlafi (1994) et de Barnes (1999), un conditionnement des surfaces solides par la SAB et des protéines de lait induit généralement une diminution du taux de biocontamination par les souches à Gram positif. Ainsi, malgré le faible impact du conditionnement par la SAB en eau dure sur les propriétés physico-chimiques de surface de l'acier, le nombre de cellules adhérentes des trois souches testées (*L. monocytogenes* 103575, *S. aureus* 53154 et *P. aeruginosa* A22) diminue d'un facteur 10^3 sur les surfaces encrassées avec la SAB ou les constituants du lait (Tableau III-18) ; résultats laissant supposer des forces d'adhésion différentes entre micro-organismes et supports pré-conditionnés ou non.

En accord avec différentes études (Al-Makhlafi *et al.*, 1994 ; Garry, 1997 ; Bower *et al.*, 1998, Allion, 2000), nous avons également pu observer une réduction de la mortalité des cellules adhérentes sur une surface encrassées. Cet effet était plus particulièrement marqué pour *P. aeruginosa* A22 dont le nombre de cellules adhérentes mortes diminue d'un facteur 10 suite à l'adsorption de matières organiques sur l'acier (respectivement $1,1 \cdot 10^4$, $1,7 \cdot 10^3$ et $1,0 \cdot 10^3$ cellules/cm² avant et après adsorption de la SAB et du lait pour des niveaux d'adhésion similaires). Ainsi, les molécules nutritives adsorbées peuvent servir de source nutritive (Samuelsson et Kirchman, 1990 ; Bower *et al.*, 1998) aux bactéries adhérentes et ainsi lever le stress nutritionnel.

IV.2.2. Principes actifs antimicrobiens

La figure III-25 présente les résultats d'adhésion, exprimés en $\text{Log}_{10}(\text{cellules/cm}^2)$ ainsi que la viabilité des cellules adhérentes sur l'acier traité avec les agents antimicrobiens.

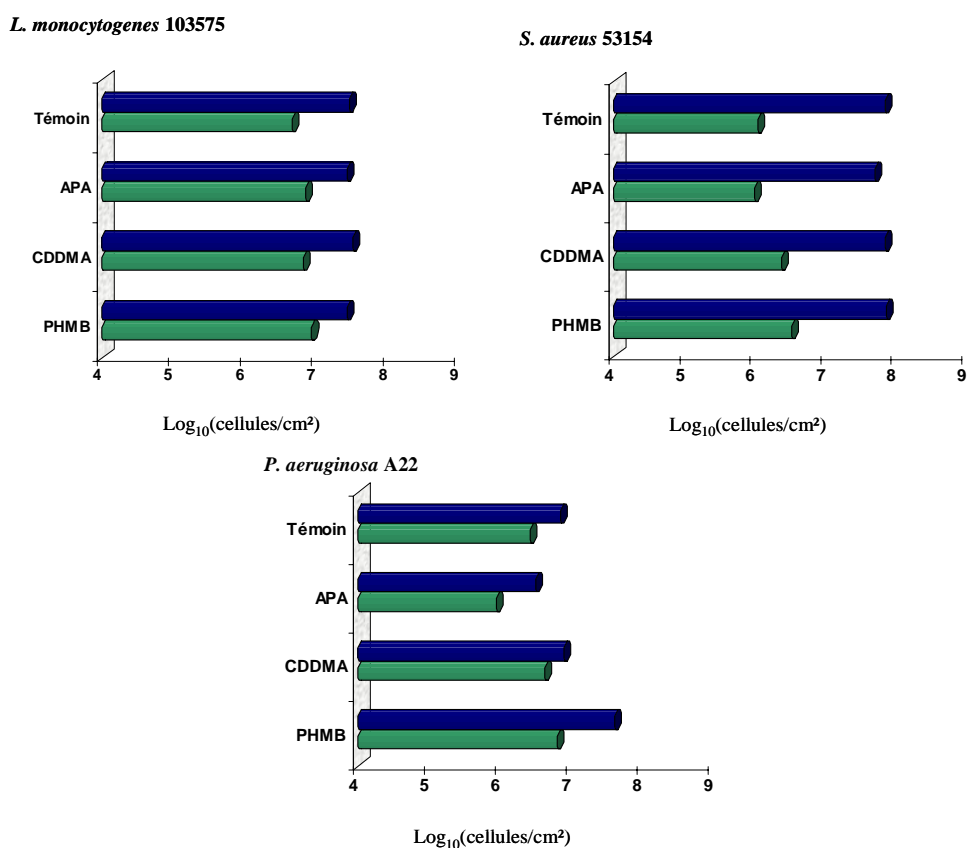


Figure III-25 : Comportement bioadhésif (■ : bactéries totales) et viabilité (■ : cellules mortes) des micro-organismes sur les supports conditionnés avec les agents désinfectants.

Dans nos conditions expérimentales, contrairement à Sinde et Carballo (2000), les traitements de surface de l'acier par les différents désinfectants sont apparus sans effet notable sur le comportement bioadhésif des micro-organismes étudiés (Figure III-25). En effet, les taux de biocontamination sont généralement similaires entre les surfaces conditionnées ou non. Seule la pré-adsorption de la PHMB a influencé l'adhésion de *P. aeruginosa* A22 sur l'acier. Ainsi, en diminuant la composante donneur d'électrons (Figure III-24) de l'acier et donc les interactions répulsives entre cette souche (présentant également un caractère donneur d'électrons marqué (cf. §I-1)) et la surface réceptrice, la PHMB augmente l'adhésion de *P. aeruginosa* A22 au support solide.

Les résultats présentés sur la figure III-25 montrent également un nombre important de cellules adhérentes mortes, résultats variant peu ou pas entre les différents traitements de surface des échantillons d'acier inoxydable AISI 316 (supports propres ou pré-conditionnés). D'une part, l'adsorption des molécules désinfectantes à la surface de l'acier, comme dans le cas de l'ammonium quaternaire par son pôle hydrophile chargé positivement, en les immobilisant entraîne alors une perte de l'activité bactéricide des désinfectants qui ne peuvent plus pénétrer les parois bactériennes. Par ailleurs, la préparation des échantillons solides

comprend une phase d'immersion dans une solution de RBS 35 à 2% (agent bactéricide) pendant 15 min. Les molécules de RBS 35 peuvent donc s'adsorber à la surface des supports solides et avoir une activité létale sur les micro-organismes adhérant, masquant ainsi l'activité antimicrobienne des autres désinfectants testés.

IV.3. APPLICATION A LA DESINFECTION

Ayant lever le stress nutritionnel, nous avons cherché à voir l'impact de cet encrassement sur la réponse des bactéries adhérentes aux désinfectants. Pour cela, nous avons testé la PHMB, désinfectant le moins efficace (§II-2) à une concentration de 5000 ppm sur *S. aureus* 53154, souche la moins sensible à ce désinfectant. Les figures III-26 et III-27 présente les résultats des tests de désinfection réalisés sur les cellules de *S. aureus* 53154 adhérentes à l'acier respectivement conditionné ou non par la SAB ou la PHMB.

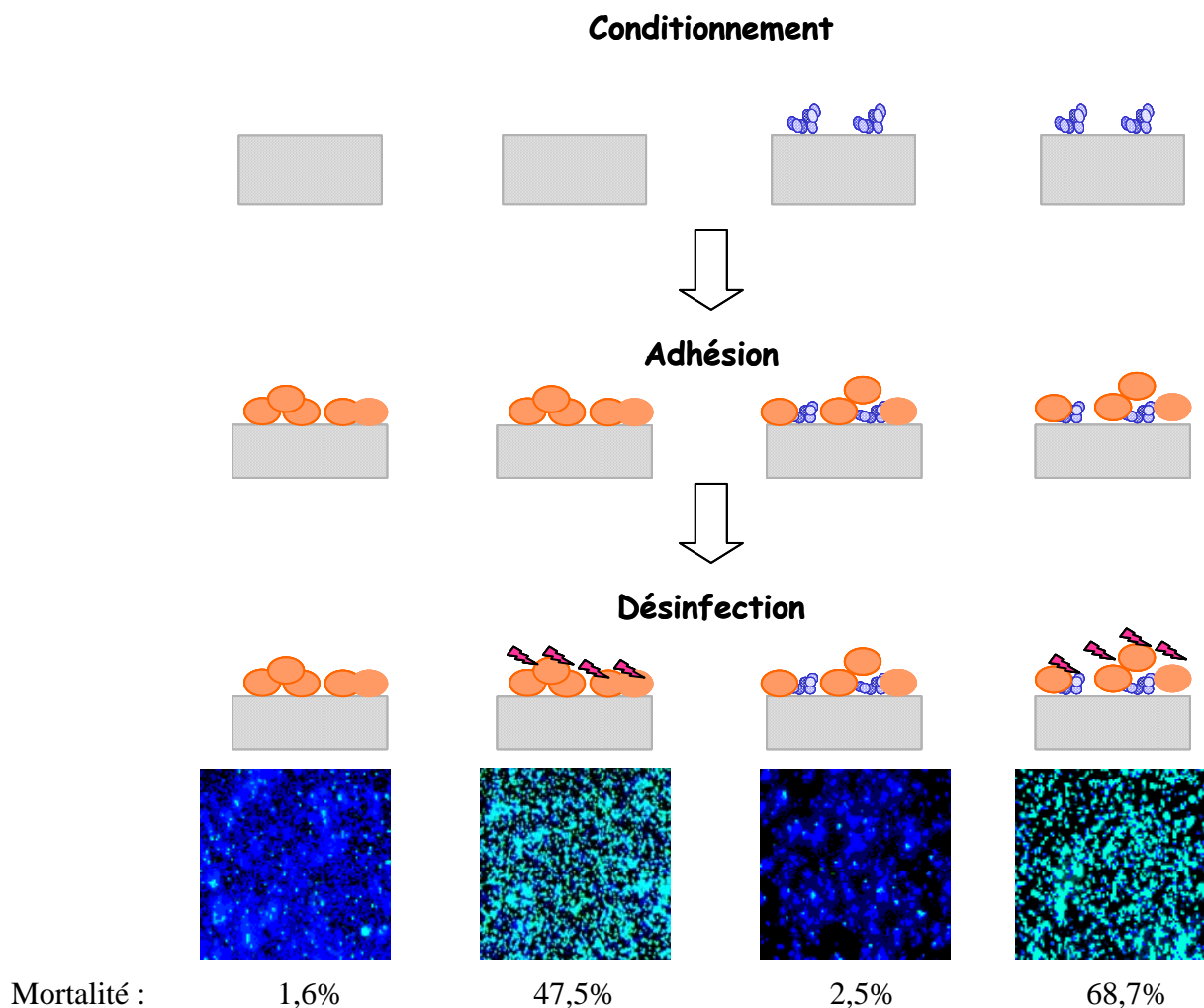


Figure III-26 : Influence du conditionnement de l'acier AISI 316 par la SAB sur la sensibilité de *S. aureus* 53154 à la désinfection avec la PHMB (% de cellules mortes).

Comme nous l'avons précédemment observé (cf III-1), et en accord avec des études antérieures (Al-Makhlafi *et al.*, 1994 ; Barnes, 1999), un conditionnement de surface par la SAB (Figure III-25) induit une diminution du taux de biocontamination par *S. aureus* 53154 (respectivement $6,8 \cdot 10^7$ et $9,9 \cdot 10^6$ cellules/cm² pour le témoin et le support encrassé avec la SAB) alors que la PHMB adsorbée n'a pas d'influence sur son adhésion à l'acier (Figure III-27).

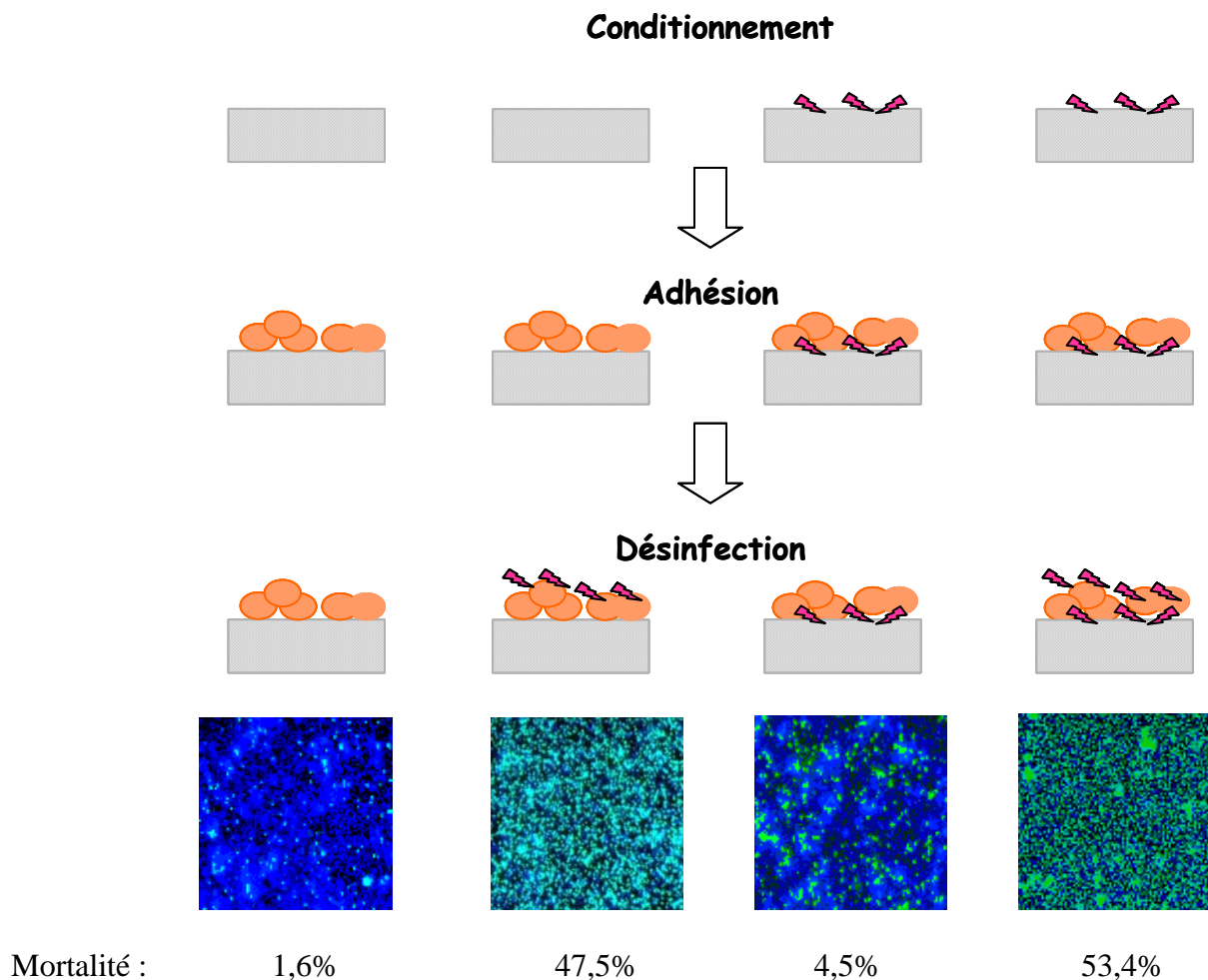


Figure III-27 : Influence du conditionnement de l'acier AISI 316 par la PHMB sur la sensibilité de *S. aureus* 53154 à la désinfection avec la PHMB (% de cellules mortes).

De plus, comme le montrent les résultats des figures III-26 et III-27, nous avons pu observer une faible mortalité des cellules adhérentes de *S. aureus* 53154 sur l'acier conditionné avec la SAB ou la PHMB (2,5 et 4,5% de la flore totale adhérente soit respectivement $2,5 \cdot 10^5$ et $3,3 \cdot 10^6$ bactéries adhérentes mortes) comparativement à l'acier propre ($1,1 \cdot 10^6$ cellules mortes soit 1,6% des cellules totales adhérentes).

Il est à noter qu'après le traitement de désinfection par la PHMB ; le pourcentage de la population adhérente morte passe de 47,5% de la flore totale adhérente sur l'acier non conditionné à respectivement 53,4% et 68,7% des bactéries totales adhérentes sur l'acier conditionné avec la PHMB et la SAB. Ainsi, les deux conditionnements de surface améliorent l'activité bactéricide de la PHMB sur cellules adhérentes.

L'augmentation du pouvoir létal de la PHMB peut certes être due à une diminution du nombre de cellules adhérentes (il y a alors un ratio molécules désinfectantes/cellules plus important) mais aussi et surtout à une modification de la physiologie des cellules adhérentes. En effet, l'adhésion microbienne aux surfaces, où peuvent se concentrer les nutriments, est une stratégie de survie des micro-organismes. Les cellules bactériennes en métabolisant les protéines adsorbées (Samuelsson et Kirchman, 1990 ; Bower *et al.*, 1998) modifient leur physiologie comparativement aux bactéries adhérentes à des surfaces exemptes de nutriments. Ainsi, et en accord avec une étude précédemment réalisée sur *Lactococcus lactis* (Allion 2000), un conditionnement protéique de la surface entraîne une augmentation de la population bactérienne viable adhérente. De ce fait, sachant que les biocides ont une meilleure activité sur les cellules non stressées (Lisle *et al.*, 1999), la PHMB tue plus de bactéries adhérentes.

Ainsi, les conditionnements de surface influencent non seulement le comportement bioadhésif des micro-organismes aux surfaces mais également leur activité métabolique et ainsi leur réactivité vis à vis des molécules désinfectantes.

IV.4. CONCLUSION

Dans cette dernière étape du travail, nous avons mis en évidence l'impact de la qualité de l'eau (force ionique, nature des ions présents) sur l'adsorption de molécules à la surface de l'acier, phénomène important car ayant un impact sur les forces d'adhésion entre micro-organismes et surface réceptrice.

*De plus, nous avons montré que les molécules encrassantes adsorbées ont une influence sur la viabilité des cellules adhérentes notamment sur *P. aeruginosa* A22, souche bactérienne particulièrement sensible à l'absence de matières organiques. Cependant, le conditionnement de l'acier par les principes actifs antimicrobiens a peu ou pas d'activité bactéricide sur les bactéries adhérentes suite à l'immobilisation des agents désinfectants par leur groupement fonctionnel ou encore à l'adsorption du RBS 35 pendant la préparation des échantillons d'acier.*

En revanche, il est à noter que l'encrassement des surfaces, notamment par des protéines, en modifiant la physiologie cellulaire améliore l'activité bactéricide d'un désinfectant, la PHMB, ayant peu d'efficacité bactéricide sur cellules adhérentes en 5 minutes de contact.

SYNTHESE GENERALE

Le principal objectif de cette étude était de mettre au point un protocole rapide permettant de déterminer l'activité antimicrobienne de produits désinfectants sur cellules adhérentes afin d'améliorer l'efficacité des formulations désinfectantes et/ou d'optimiser les procédures d'hygiène qui y sont associées.

Pour atteindre cet objectif, quatre étapes ont été définies comme suit :

- Choix des modèles microbiens et des protocoles de conservation et de croissance des micro-organismes sélectionnés. Pour cela, nous avons étudié l'impact de différentes conditions de conservation et de croissance sur les caractéristiques physico-chimiques de surface de souches sauvages et de collection ainsi que sur leur sensibilité aux désinfectants.

- Définition d'un protocole d'adhésion reproductible permettant de mettre en place un test pour évaluer l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens sur cellules adhérentes ; protocole reposant sur l'utilisation de méthodes classiques de microbiologie.

- Optimisation de ce protocole, notamment dans le caractère *in situ* ainsi que dans le délai d'attente des résultats.

- Ce protocole optimisé a ensuite été appliqué pour déterminer l'impact de l'environnement des micro-organismes (dureté de l'eau, présence d'un film primaire) sur leur comportement bioadhésif et sur la viabilité des cellules « fixées ».

Afin de standardiser les protocoles de conservation et de croissance des souches bactériennes pour la suite de l'étude, il était essentiel, dans un premier temps, de déterminer l'impact de ces protocoles sur *i)* les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries et *ii)* leur sensibilité à des agents antimicrobiens. Pour cela, nous avons testé différentes

conditions de stockage et de mise en culture sur des souches de collection ainsi que sur des souches sauvages.

Considérant que la conservation des micro-organismes doit avant tout assurer leur survie sur une période de temps donnée (Carvalho *et al.*, 2003, Mihoub, 2003), plusieurs techniques de stockage, basées sur la diminution de l'activité métabolique des micro-organismes sont proposées. Les micro-organismes peuvent être lyophilisés, congelés (à -20°C, -80°C ou -196°C) ou encore ensemencés sur gélose et stockés à 4°C.

Bien qu'essentiels, ces principes fondamentaux restent aujourd'hui et le plus souvent au libre arbitre des expérimentateurs. Ainsi, certaines équipes conservent leurs souches à 4°C, d'autres à -20°C ou à -80°C et ce, sur des durées variant de quelques semaines à plusieurs mois. Pour palier à cette diversité et faciliter la comparaison d'essais inter - laboratoires, des organismes de normalisation préconisent des protocoles standardisés. Ces protocoles reposent le plus souvent sur la réalisation d'un stock « primaire » congelé et d'un stock de travail pouvant être laissé à 4°C pendant plusieurs semaines (Anonyme, 2000a ; Anonyme, 2000b).

Cependant, sur la base des données obtenues, le stockage à 4°C sur gélose nutritive ne devrait être utilisé que pour des temps de stockage très courts (inférieurs à un mois) contrairement à la conservation à -80°C, notamment pour les bactéries psychrotrophes.

Concernant les conditions de culture et notamment l'état physique du milieu nutritif utilisé, une même variabilité peut être rencontrée. Il est aujourd'hui clairement établi que la composition du milieu (Bonet *et al.*, 1993 ; Horska *et al.*, 1993), le pH (Briandet, 1999 ; Steiner et Sauer, 2001) et la température d'incubation (Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000) peuvent influencer le métabolisme bactérien (Gügi *et al.*, 1991 ; Laurent *et al.*, 2000) ainsi que les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes (Hill et James, 1972 ; Briandet, 1999 ; Santiago *et al.*, 1999). En revanche, peu de travaux ont porté sur l'impact de l'état physique du milieu de culture (*i.e.* solide ou liquide) sur ces propriétés (Ljungh *et al.*, 1985 ; Bakholdina *et al.*, 2001 ; Kiers *et al.*, 2001).

Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude nous ont permis de mettre en évidence des caractéristiques physico-chimiques de surface différentes entre souches de collection et souches sauvages mais également de montrer une évolution de ces caractéristiques, notamment de l'hydrophilie de surface des souches bactériennes sélectionnées, en fonction de l'état physique du milieu de culture utilisé (gélose ou bouillon nutritif). Cet effet était nettement plus marqué pour les souches sauvages que pour les souches de collection.

En bouillon, les micro-organismes sont « libres » (cellules planctoniques) alors que sur gélose ils peuvent être apparentés à des cellules « fixées ». A l'image du développement des cellules en biofilms, les colonies bactériennes se développant sur gélose ne bénéficient pas d'un apport en éléments nutritifs et en oxygène homogène en tous points. Ce mode de croissance peut donc conduire à une hétérogénéité spatio-temporelle de l'activité métabolique des micro-organismes (Huang *et al.*, 1998 ; Lai *et al.*, 1997 ; Choo-Smith *et al.*, 2001 ; Sauer *et al.*, 2002.), et ainsi à une évolution de la composition élémentaire de paroi (Perrot *et al.*, 2000). Les micro-organismes cultivés sur TSA affichaient généralement une hydrophobie de surface plus importante que leur homologues cultivées en TSB.

Ainsi, cette évolution, vraisemblable réponse adaptative à leur environnement chimique et physique, pourrait modifier leur réponse à l'action d'agents antimicrobiens ainsi que leur comportement bioadhésif.

Sachant qu'au temps 0 de conservation, la température de stockage n'avaient pas d'influence sur les caractéristiques physico-chimiques de surface des micro-organismes, nous avons retenu pour la suite de l'étude les deux modes de croissance suivants :

- **Conservation des micro-organismes à - 80 °C (2 mois maximum) puis culture en TSB à 37°C (Protocole généralement utilisé dans les laboratoires de recherche).**
- **Conservation des bactéries à 4 °C (une semaine maximum) puis ensemencement sur TSA en pente et incubation à 37 °C (Protocole de croissance des micro-organismes selon les instructions des normes AFNOR).**

Ayant montré que les cellules bactériennes sélectionnées et plus particulièrement les souches sauvages, présentaient des propriétés physico-chimiques de surface différentes en fonction du modes de croissance choisi, nous nous sommes ensuite attachés à évaluer l'impact de ces conditions de culture sur leur réponse à la désinfection.

Les agents antimicrobiens sont généralement classés selon leur molécule constitutive dont la structure chimique, la charge et la taille déterminent leur activité sur les micro-organismes (Russell, 1991) mais également leur adsorption à la surface des cellules microbiennes (Joly, 1995). Ainsi, nous avons choisi de tester l'activité bactéricide de trois agents antimicrobiens appartenant à des familles chimiques différentes et généralement employés dans les

formulations désinfectantes *i.e.* un oxydant (l'acide peracétique), un ammonium quaternaire (le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium) et un sel de biguanide (le chlorure de poly(hexaméthylène-biguanide)).

Nous avons pu observer, dans nos conditions expérimentales, une augmentation de la concentration minimale bactéricide avec la taille et la spécificité du mode d'action de la molécule désinfectante. Ainsi, l'acide peracétique, petite molécule hydrophile à action antimicrobienne non spécifique, est apparu comme étant le plus efficace quelles que soient les conditions de culture testées avec des CMB inférieures ou égales à 20ppm. Concernant les agents antimicrobiens à action létale plus spécifique testés (l'ammonium quaternaire et le sel de biguanide), une nette influence des conditions de croissance des bactéries (milieu de culture solide ou liquide) a pu être mise en évidence sur leur activité bactéricide ; les micro-organismes affichant une hydrophilie de surface négligeable nécessitent des CMB plus élevée. De plus, des différences de sensibilité vis à vis des désinfectants entre les souches de collection et les souches sauvages ont pu être notées. Lorsque les souches de collection apparaissent plus résistantes que les sauvages, il peut alors y avoir une surestimation de la quantité de produit à utiliser entraînant ainsi d'éventuels problèmes écologiques lors de l'élimination des produits désinfectants. En revanche, une résistance plus importante des souches sauvages testées comparativement à celles utilisées pour les normes de désinfection, notamment pour la PHMB, induira une sous-estimation de la quantité de produit à utiliser.

Les micro-organismes soumis à une concentration peu ou pas efficace pourront alors s'adapter au désinfectant et leur élimination sera alors plus difficile. Des souches fraîchement isolées du terrain ou connues comme étant résistantes aux agents antimicrobiens devraient donc être ajoutées aux tests de validation des désinfectants avant leur mise sur le marché.

Après avoir étudié l'influence du milieu environnement (solide ou liquide) pendant la croissance des cellules sur leur sensibilité aux désinfectants, nous nous sommes intéressés à l'état adhérent, mode de développement généralement rencontré dans l'habitat naturel des micro-organismes, afin de mettre en place un protocole d'adhésion reproductible.

Dans cette seconde partie de l'étude, nous avons pu observer une évolution du comportement bioadhésif des cellules bactériennes en fonction du support solide utilisé

***i.e.* acier inoxydable AISI 316 ou PTFE ; mais également en fonction des conditions de croissance testées.**

Quelle que soit la technique de dénombrement des cellules adhérentes utilisées (décrochage et ensemencement des cellules en milieu nutritif ou observation microscopique), le protocole utilisé pour réaliser les essais d'adhésion permettait d'obtenir des résultats reproductibles.

Afin d'avoir suffisamment de cellules adhérentes dénombrables par des techniques classiques de microbiologie (décrochage et ensemencement en milieu nutritif) pour la suite des expérimentations, nous avons choisi d'utiliser l'acier inoxydable AISI 316 comme support récepteur pour les tests de désinfection sur cellules fixées.

En accord avec des études antérieures, nous avons, dans cette seconde partie de l'étude, également confirmé l'augmentation de la résistance des micro-organismes adhérant aux désinfectants comparativement à leurs homologues planctoniques.

Cependant, ce protocole, basé sur le décrochage et la mise en culture des micro-organismes, est lourd et long à mettre en œuvre. Ainsi, dans la troisième partie de l'étude, il est apparu nécessaire d'optimiser ce protocole et ainsi de développer une méthodologie simple et rapide permettant d'évaluer, *in situ*, l'activité bactéricide des désinfectants sur des micro-organismes adhérant à des surfaces inertes.

A cette fin, nous avons choisi d'utiliser deux fluorochromes : le premier permettant de différencier les micro-organismes viables des micro-organismes morts (SYTOX Green[®]) et le second marquant toutes les cellules quel que soit leur viabilité (DAPI). Le principe de cette double coloration est basé sur l'exclusion du SYTOX Green[®] par les cellules dites « intactes » et sur sa pénétration dans les cellules dont la membrane cytoplasmique lésée et donc mortes.

Cette technique a ainsi permis d'obtenir des résultats dans la journée alors que les techniques classiques nécessitent de 24 à 48 h de délai de réponse (temps de croissance de micro-organismes ensemencés en gélose nutritive). En accord avec les résultats obtenus par ensemencement en gélose nutritive, cette technique a permis de montrer l'augmentation de résistance des bactéries adhérentes aux désinfectants comparativement aux cellules planctoniques. Cependant, la présence d'amas bactériens peut gêner l'analyse des résultats et entraîner une sous ou une surestimation du nombre de cellules mortes. Ainsi, ce protocole n'est utilisable que pour des cellules fixées en monocouche. D'autres outils d'analyse, tel que

le microscope à focale laser, devront alors être employés pour l'étude de bactéries adhérant en amas ou en biofilms.

Il est à noter que le nombre de cellules viables cultivables obtenu par ensemencement était généralement inférieur à celui de la population viable déterminé par la double coloration ; différence probablement liée à une diminution de la cultivabilité des micro-organismes suite aux stress induit par la désinfection (Caro *et al*, 1999). Ainsi, la technique de double coloration *in situ* permet d'estimer l'efficacité antimicrobienne des agents bactéricides sur la population adhérente totale en limitant le nombre d'étapes intermédiaires (décrochage, dilutions successives) pouvant entraîner une perte du nombre de micro-organismes cultivables.

Dans la dernière partie de l'étude, cette technique a été appliquée à des cas plus proches des conditions réelles d'utilisation des désinfectants *i.e.* présence de matières encrassantes, dureté de l'eau. Nous avons ainsi montré que les molécules encrassantes adsorbées pouvaient avoir un impact sur la viabilité des cellules adhérentes notamment sur *P. aeruginosa* A22, souche bactérienne particulièrement sensible à l'absence de matières organiques. Cependant, les principes actifs antimicrobiens adsorbés préalablement à l'adhésion bactérienne n'ont eu que peu ou pas d'activité bactéricide sur les bactéries adhérentes.

Enfin, il est important de noter qu'un conditionnement des surfaces, notamment par des protéines, en modifiant le métabolisme des cellules adhérentes, probablement en levant le stress nutritionnel, a permis d'améliorer l'activité bactéricide d'un désinfectant, la PHMB, peu d'efficacité sur cellules adhérentes.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Comme indiqué précédemment, la biocontamination des surfaces reste un problème d'actualité dans de nombreux secteurs d'application et en particulier dans le domaine médical et les industries agro-alimentaires. Pour réduire ou éliminer les germes indésirables (bactéries pathogènes ou d'altération), des actions curatives basées sur l'utilisation d'agents antimicrobiens sont régulièrement pratiquées avec une plus ou moins grande efficacité. Optimiser ces actions demeure donc un enjeu majeur sur lequel les Laboratoires ANIOS et l'Unité de recherche en bioadhésion et hygiène des matériaux de l'INRA focalisent une partie de leurs activités. Cette optimisation passe notamment par le développement de nouvelles formulations désinfectantes, formulations dont il convient de tester l'efficacité par une méthode standardisée, simple et rapide à mettre en œuvre, non seulement sur cellules planctoniques mais également sur cellules adhérentes (et non pas simplement déposées). C'est pour développer une telle méthodologie (jusqu'à présent inexistante) que le travail ici présenté a été réalisé. Néanmoins et outre l'aspect appliqué, cette étude visait également à comprendre l'impact de paramètres environnementaux (conservation, croissance, état libre ou fixé) sur la réactivité des cellules bactériennes vis-à-vis de molécules antimicrobiennes.

D'un point de vue applicatif, ayant montré que l'usage de souches de collection associé à un mode de conservation et de croissance donné pouvait entraîner une sous ou sur-estimation de l'activité bactéricide des molécules antimicrobiennes testées, nous recommandons à l'issue de ce travail de réaliser les tests de désinfection sur des souches sauvages et de collection (à Gram positif et à Gram négatif) conservées à -80°C et cultivées sur gélose ou en bouillon nutritif.

Concernant les essais d'adhésion (essais préliminaires à la désinfection), il nous paraît aujourd'hui important de les réaliser sur supports hydrophobes et hydrophiles, dans un milieu simple ou complexe et d'éliminer les germes « simplement déposés » par un rinçage en eau distillée et/ou en eau dure (notamment lorsque l'on veut simuler des situations « réelles »). Les dénombrements microbiens quant à eux devraient être effectués *in situ* de façon à limiter les « passages d'interfaces liquide/air » et éviter les stress physiologiques liés aux techniques de décrochage. Ces mêmes recommandations peuvent être préconisées pour les essais de

désinfection. Enfin et compte tenu des écarts parfois observés entre dénombrements classiques (après ensemencement en gélose nutritive) et dénombrements par microscopie à épifluorescence, il nous semble aujourd'hui important de poursuivre les travaux initiés et notamment d'évaluer l'impact d'étapes de revivification (étapes couramment pratiquées sur cellules stressées) sur les résultats de dénombrements de flore viable cultivable ayant « résisté au stress » de l'adhésion et de la désinfection. L'utilisation de fluorochromes spécifiques de certaines fonctions métaboliques ou encore la synthèse de protéines fluorescentes (via l'insertion du gène de la Green Fluorescent Protein par exemple) par les bactéries fixées pourraient également permettre d'évaluer leur activité physiologique et donc de distinguer les cellules mortes, des cellules stressées, en phase de dormance, ou encore des cellules viables cultivables. Il serait alors possible de déterminer l'impact de l'état adhérent sur le métabolisme bactérien.

Par ailleurs, la technique de dénombrement *in situ* par microscopie à épifluorescence, bien que simple et rapide à mettre en œuvre, reste limitée à l'étude de systèmes en deux dimensions *i.e.* adhésion cellulaire en monocouche. Pour étendre ce type de techniques à des systèmes plus complexes impliquant des agrégats cellulaires et des biofilms, il suffit de remplacer le microscope à épifluorescence par un microscope à focale laser (MCL). En outre, ce microscope pourrait nous permettre de « suivre » la diffusion de molécules antimicrobiennes au travers d'édifices bactériens plus ou moins complexes. Ces expérimentations permettraient ainsi d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des molécules désinfectantes sur cellules « fixées ».

De plus, cette technique de distinction entre cellules viables et cellules mortes pourrait être appliquée à l'étude de biofilms plurimicrobiens. L'ajout de marqueurs immunochimiques permettrait ainsi la différenciation entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif et entre différentes espèces bactériennes. Il serait alors possible d'observer d'une part la répartition des différentes espèces bactériennes au sein de ces biofilms et d'autre part les interactions microbiologiques (compétition, commensalisme...) entre espèces bactériennes vis-à-vis « d'agressions » extérieures telles que des procédés de désinfection chimiques ou différents traitements physiques (chaleur, UV...).

Enfin, même si cette technique a été élaborée pour évaluer l'activité bactéricide des produits désinfectants sur cellules adhérentes, elle pourrait également être utilisée pour la mise au point de nouveaux matériaux ayant un effet anti-adhésion et/ou antimicrobien pour les industries agro-alimentaires ou le domaine médical.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aaron S.D., Ferris W., Ramotar K., Vandemheen K., Chan F. and Saginur R. 2002. Single and Combination Antibiotic Susceptibility of Planktonic, adherent, and Biofilm-Grown *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Cultured from Sputa of Adults with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, pp 4172-4179.

Alais C. 1974. Sciences du lait. Principes et techniques laitières.

Allion A. 2000. Etude de l'adsorption protéique aux interfaces solide-liquide : conséquences sur l'adhésion bactérienne. Diplôme d'Etudes Approfondies en Sciences Alimentaires, ENSIA.

Al-Makhlafi H., McGuire J. and Daeschel M. 1994. Influence of Preadsorbed Milk Proteins on Adhesion of *Listeria monocytogenes* to Hydrophobic and Hydrophilic Silica Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp 3560-3565.

Al-Masaudi S.B., Day M.J. and Russell A.D. 1988. Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, antiseptics and disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, pp 329-337.

An Y.H. and Friedman R.J. 1998. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces. *Journal of Biomed. Mater. Res.* , 43, pp 338-348.

Anderl J.N., Franklin M.J. and Stewart P.S. 2000. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, pp 1818-1824.

Annous B.A., Becker L.A., Bayles D.O., Labeda D.P. and Wilkinson B.J. 1997. Critical role of anteiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, pp 3887-3894.

Anonyme. 1997. Norme AFNOR NF EN 1276. Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité.

Anonyme, 1998. Recueil de normes et réglementations : Antiseptiques et désinfectants, *Association française de normalisation*, AFNOR ed., Paris.

Anonyme. 2000a. Testing Disinfectants against *Staphylococcus aureus*. AOAC. Official Method 991.48.

Anonyme. 2000b. Norme AFNOR NF EN 12353. Antiseptiques et désinfectants chimiques - Conservation des souches microbiennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide et fongicide.

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

Asther M., Bellon-Fontaine M.-N., Capdevila C., and Corrieu G., 1990. A thermodynamic Model to Predict *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 Adhesion to Various Solid Carriers in Relation to Lignin Peroxidase Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, pp 477-482.

Baillie G.S. and Douglas L.J. 1998. Iron-Limited Biofilms of *Candida albicans* and Their Susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, pp 2146-2149.

- Bakholdina S.I., Krasikova I.N., Buzoleva L.S., Shubin F.N., Solov'eva T.F. 2001. Effects of culture method and growth phase on free lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochem. (Mosc)*, 66, pp 415-421.
- Barbusiaux C., Saglio J.F., Chavarot A. et Berer G. 1993. Arrêté du 15 juin 1993 modifiant et complétant l'arrêté du 27 octobre 1975 relatif aux produits de nettoyage du matériel pouvant se trouver en contact avec des denrées alimentaires. *Journal Officiel de la République Française*, 20 juillet 1993.
- Barnes L.M., Lo M.F., Adams M.R. and Chamberlain A.H.L. 1999. Effect of Milk Proteins on Adhesion to Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp 4543-4548.
- Bartoli M. et Dusseau J.Y. 1995. Oxydants. Dans : *Antiseptie et Désinfection*. Fleurette J., Fresney J. et Reverdy M.E. (Eds.), Editions Eska, pp 305-314.
- Bayles D.O., Annous B.A. and Wilkinson B.J. 1996. Cold stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes* in Response to Temperature Downshock and Growth at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, pp 1116-1119.
- Beerens H. 1985. Critères de choix des désinfectants dans l'industrie alimentaire. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon*, 18, 205-214.
- Bellon-Fontaine M.-N., Mozes N., van der Mei H., Sjollema J., Cerf O., Rouxhet P.G. and Busscher H.J. 1990. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*, 17, pp 93-106.
- Bellon-Fontaine M.-N. et Cerf O. 1991. Mécanisme d'adhésion des micro-organismes aux surfaces : facteurs influant sur l'adhésion. *Industries agro-alimentaires*, Jan-Fév, pp 13-17.
- Bellon-Fontaine M.-N., Rault J. and Van Oss C. J. 1996. Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Coloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 7, pp 47-53.
- Besnard V. 2002. L'état viable non cultivable d'un pathogène d'intérêt majeur en hygiène des aliments : *Listeria monocytogenes*. Etude de la physiologie, des conditions de retour à l'état cultivable et de la virulence. Thèse de Doctorat, faculté des Sciences et Technologies de Nantes. 242p.
- Best M., Kennedy M.E. and Coates F. 1990. Efficacy of a Variety of Disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp 377-380.
- Blackman I.C. and Franck J.F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. *Journal of Food Protection*, 59, pp 827-831.
- Block S.S. 1977. Definition of Terms. In: *Disinfection, Sterilisation and Preservation*. Block S.S. (Ed), Lea & Febiger (Philadelphia), pp 1025-1029.
- Bonet R., Simon-Pujol M.D. et Congregado F. 1993. Effects of Nutrients on Exopolysaccharide Production and Surface properties of *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, pp 2437-2441.
- Boulangé-Petermann L. 1993. Etude physico-chimique et électrochimique de l'adhésion de *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus thermophilus* à des surfaces d'acier inoxydable. Thèse de doctorat, Université de Nancy I, 146p.

- Boulangé-Petermann L., Baroux B. et Bellon-Fontaine M.-N. 1994. Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces métalliques : Nettoyabilité des surfaces d'acier inoxydable. *industries agro-alimentaires*, Octobre, pp 671-676.
- Boulangé-Petermann L., Doren A., Baroux B. and Bellon-Fontaine M.-N. 1995. Zeta Potential Measurements on Passive Metals. *Journal of Colloid and Interface Science*, 171, pp 179-186.
- Bouttier S., Linxe C., Bellon-Fontaine M.-N. and Fourniat J. 1997. Attachment of *Salmonella choleraesuis choleraesuis* to Beef Muscle and Adipose Tissues. *Journal of Food Protection*, 60, pp 16-22.
- Bower C.K., Daeschel M.A. and McGuire J. 1998. Protein Antimicrobial Barriers to Bacterial Adhesion. *Journal of Dairy Science*, 81, pp 2771-2778.
- Brading M.G., Jass J. and Lappin-Scott H.M. 1995. Dynamics of Bacterial Biofilm Formation. In Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. (Eds), *Microbial Biofilms*, pp 15-45, University Press, Cambridge.
- Briant J. 1989. Phénomènes d'interface, agents de surface : Principes et modes d'action. Editions Technip, Paris, 340p.
- Briandet R. 1999. Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms – Aspects physico-chimiques. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes, 170p.
- Broxton P., Woodcock P.M., Heathly F. and Gilbert P. 1984. Interaction of some polyhexamethylenebiguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, pp 115-124.
- Buncic S. and Avery S.M. 1996. Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37°C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Letters in Applied Microbiology*, 23, pp 18-22.
- Bunthof C.J., van den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F.M. and Abee T. 1999. Rapid Fluorescence Assessment of the Viability of Stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp 3681-3689.
- Busscher H.J., Weerkamp H.C, van der Mei H.C., van Pelt A.W.J. de Jong H.P. and Arends J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, pp 980-983.
- Busscher H.J., Weerkamp A.H. 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, pp 165-173.
- Busscher H.J., Bos R. and van der Mei H.C. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbioly Letters*, 46, pp 229-234.
- Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G. and Roques C. 2002. Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46, 1469-1474.
- Caro A., Got P., Lesne J., Binard S. and Baleux B. 1999. Viability and Virulence of Experimentally Stressed Nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp 3229-3232.
- Carter D.C. and Ho J.X. 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Prot. Chem.*, 45, pp 153-205.

- Caruso G., Mancuso M. and Crisafi E. 2003. Combined fluorescent antibody assay and viability staining for the assessment of the physiological states of *E. coli* in seawaters. *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp 225-233.
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X. and Gibbs P.. 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, pp 947-952.
- Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N. and Hébraud M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28 : Surface Physicochemical properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp 728-737.
- Chevallier I. 2002. Influence des interactions acido-basiques sur l'encrassement et la biocontamination de supports métalliques oxydés. Thèse de Doctorat – Université Paris XI Orsay, 155p.
- Choo-Smith L.-P., Maquelin K., van Vreeswijk T., Bruining H.A., Puppels G.J., ngo Thi N.A., Kirschner C., Naumann D., Ami D., Villa A.M., Orsini F., Doglia S.M., Lamfarraj H., Sockalingum G.D., Manfait M., Allouch P. and Endtz H.P. 2001. Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp 1461-1469.
- Chumkhunthod P., Schraft H. and Griffiths M.W. 1998. rapid Monitoring Method to Assess Efficacy of Sanitizers against *Pseudomonas putida* Biofilms. *Journal of Food Protection*, 61, pp 1043-1046.
- Crémieux A. et Freney J. 1995. Bases fondamentales de l'action antimicrobienne des antiseptiques et des désinfectants : les mécanismes d'action antimicrobienne. Dans : *Antiseptie et désinfection*, Fleurette J., Freney J. et Reverdy M.E., eds., Editions Eska, pp 23-37.
- Darbord J.-C. 1998. Evolution de la normalisation: antiseptiques et désinfectants. *Annales pharmaceutiques françaises*, 56, pp 45-46.
- Darouiche R.O. 2001. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence, *Clinical Infection Disease*, 33, pp 1567-1572.
- Davies D.G., Chakrabarty A.M. and Geesey G.G. 1993. Exopolysaccharide Production in Biofilms: Substratum Activation of Alginate Gene Expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, pp 1181-1186.
- De Beers D., Srinivasan R. And Stewart P.S. 1994. Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp 4339-4344.
- Donlan R.M. and Costerton J.W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, pp 167-193.
- Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Microbes and Infection*, 5, pp 1213-1219.
- Dupré A. 1869. Théorie mécanique de la chaleur, Gauthier-Villars, Paris, pp 367-370.
- Duval J. 1989. Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens. *Bactériologie médicale*, pp 273-296
- Fiedler F. 1988. Biochemistry of the Cell Surface of *Listeria* Strains : A Locating General View. *Infection*, 16, pp S92-S97.

- Fiksdal L. and Tryland I. 1999. Effect of u.v. light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* β -D-galactosidase activity and other potential viability parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 87, pp 62-71.
- Fletcher M. 1976. The Effects of Proteins on Bacterial Attachment to Polystyrene. *Journal Genetic Microbiology*, 94, pp 400-404.
- Fletcher M. and Loeb G.I. 1979. Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine Pseudomonad to Solid Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, pp 67-72.
- Fletcher M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*, 170, pp 2027-2030.
- Freney J. 1995. Composés phénoliques. Dans : *Antisepsie et désinfection*, Fleurette J., Freney J. et Reverdy M.E., eds., Editions Eska, pp 90-134.
- Frank J. and Koffi R. 1990. Surface-adherent Growth of *Listeria monocytogenes* is Associated with Increased Resistance to Surfactant Sanitizers and Heat. *Journal of Food Protection*, 53, pp 550-554
- Fukuzaki S., Urano H. and Nagata K. 1996. Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Metal Oxide Surfaces. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 81, 163-167.
- Garry P. 1997. Propriétés physico-chimiques de surface en polyurethane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon. 124p.
- Gélinas P. and Goulet J. 1983. Efficacité de huit désinfectants sur trois types de surfaces contaminées par *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, pp 1715-1729.
- Giovannaci I., Ermel G., Salavt G., Vendevre J.L. and Bellon-Fontaine M.-N. 2000. Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 88, pp 992-1000.
- Gomez-Suarez C., Busscher H.J. and van der Mei H. 2001. Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid interfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp 2531-2537.
- Good R.J. 1960. Theory for estimation of surface interfacial energies. III. Estimation of surface energy of solids from contact angle data. *Journal of Physical Chemistry*, 64, 561.
- Gugi B, Orange N, Hellio F, Burini JF, Guillou C, Leriche F and Guespin-Michel JF. 1991. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 173, pp 3814-3820.
- Guilbert P., Pemberton D. and Wilkinson D.E. 1990. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, pp 585-592.
- Guiot E., Georges P., Brun A., Fontaine-Aupart M. P., Bellon-Fontaine M. N. and Briandet R. 2002. Heterogeneity of Diffusion Inside Microbial Biofilms Determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy Under Two-photon Excitation. *Photochemistry and Photobiology*, 75, pp570-578.
- Hamilton W.A. 1971. Membrane Active Antibacterial Compounds. In : *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. Hugo W.B. ed Academic press, London, pp 77-93.

- Hancock I.C. 1991. Microbial Cell Surface Architecture. *In Microbial Cell Surface Analysis : Structural and Physicochemical Methods*, eds., pp 21-59.
- Hancock R.E.W. 1998. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infection Disease*, 27 (Suppl 1), pp S93-S99.
- Herry J.-M, Bellon-Fontaine M.-N. et Kondjoyan A. 2003. Analyse de la remise en suspension par une bulle d'air de particules solides adhérant sur une surface plane. Colloque Prosetia Rennes.
- Heidelberg J.F., Shahamat M., Levin M., Rahman I., Stelma G., Grim C. and Colwell R.R. 1997. Effect of Aerosolization on Culturability and Viability of Gram-Negative Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, pp 3585-3588.
- Hiemenz P.C., Rajagopalan R. 1997. Principles of Colloid and Surfaces Chemistry. Marcel Dekker Inc., New York.
- Hill A.W. and James A.M. 1972. Effect of growth temperature on surface properties of cells of *Staphylococcus aureus* with particular reference to methicillin-resistance. *Microbios*, 6, pp 169-178.
- Hoffman R.K., 1971. Toxic Gases. Dans : *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. Hugo W.B. (ed.) Academic press, London, pp 226-285.
- Hood S.K. and Zottola E.A. 1995. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37, pp 145-53.
- Horská E., Pokorný J., Labajová M. 1993. Changes of surface charge and hydrophobicity of the outer bacterial membrane depending on the cultivation medium. *Biología (Bratislava)*, 48, pp 343-347.
- Huang C. T., Xu K., McFeters G. A. and Stewart P. S. 1998. Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase Expression within Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp 1526-1531.
- Hugo W.B. 1992. Mode of action of non-antibiotic antibacterial agents. *In : Pharmaceutical Microbiology*. W.B. Hugo et A.D. Russell, eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 288-294.
- Hugo W.B. and Russell A.D. 1992. Types of antimicrobial agents. *In : Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation*. A.D. Russell, W.B. Hugo et G.A. Ayliffe, Eds Blackwell Scientific Publications, 7-88.
- James A.M. 1991. Charge properties of microbial cell surfaces. *In: Microbial cell surface analysis*. Mozes N., Handley P.S., Busscher H.J. and Rouxhet P.G. (Eds), VCH Publishers, New York, pp 221-262.
- John S.F., Derrick M.R., Jacob A.E. and Handley P.S. 1996. The combined effects of plasma and hydrogel coating on adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* to polyurethane catheters. *FEMS Microbiology Letters*, 144, pp 241-247.
- Joly B. 1995. La résistance microbienne à l'action des antiseptiques et désinfectants. *Dans : : Antiseptie et désinfection*, Fleurette J., Freney J. et Reverdy M.E. (Eds), Editions Eska, pp 52-65.
- Jones C.E., Shama G., Jones D. , Roberts I.S. and Andrew P.W. 1997. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 83, pp 31-35.

- Jones M.V., Herd T.M. and Christie H.J. 1989. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios*, 58, pp 49-61.
- Joseph B., Otta S.K., Karunasagar I. And Karunasagar I. 2001. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, pp 367-72.
- Jucker B.A., Harms H. and Zehnder A.J.B. 1996. Adhesion of the Positively Charged Bacterium *Stenotrophomonas(xanthomonas) maltophilia* 70401 to Glass and Teflon. *Journal of Bacteriology*, 178, pp 5472-5479.
- Kiers P.J.M., Bos R., van der Mei H.C. and Busscher H.J. 2001. The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology*, 147, pp 757-762.
- King M.A. 2000. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 243, pp 155-166.
- Korber D.R., Lawrence J.R., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W., 1995. Growth of Microorganisms on Surfaces. In Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. (Eds), *Microbial Biofilms*, pp 15-45, University Press, Cambridge.
- Krajewski A., Piancastelli A. and Malavolti R. 1998. Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z-potential. *Biomaterials*, 19, 637-641.
- Lai H.-C., Lai M.-J., Lin-Chao S., Lu K.-T. and Ho S.-W. 1997. Population Cell Differentiation of *Serratia marcescens* on Agar Surface and in Broth Culture. *Journal of Microbiology and Immunology*, 30, pp 242-254.
- Langsrud S. and Sundheim G. 1996. Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, pp 411-418.
- Langsrund S., Sundheim G. and Borgmann-Strahsen R. 2003. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp 874-882.
- Laurent P., Buchon L., Guespin-Michel J.F. and Orange N. 2000. Production of Pectate Lyases and Cellulases by *Chryseomonas luteola* Strain MFCL0 Depends on the Growth Temperature and the Nature of the Culture Medium: Evidence for Two Critical Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp 1538-1543.
- Lebaron P., Catala P. and Parthuisot N. 1998. Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp 2697-2700.
- Lee J.C., Takeda S., Livolsi P.J. and Paoletti L.C. 1993. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 61, pp 1853-1858.
- Lifshitz E.M. 1955. Teoria molekoularnir cil pritiagenia megdou tverlimi telami. *Zurnal Eksperimentalnoj I Teoricezkoj Fiziki*, 29, 94.
- Lisle J.T., Pyle B.H. and McFeters G.A. 1999. The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chlorine disinfected *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 29, pp 42-47.

- Ljungh A., Hjerten S. and Wadstrom T. 1985. High Surface Hydrophobicity of Autoaggregating *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Human Infections Studied with the Salt Aggregation Test. *Infection and Immunity*, 47, pp 522-526.
- Loughlin M.F., Jones M.V and Lambert P.A. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, pp 631-639.
- Lundén J., Autio T., Markkula A., Hellström S and Korkeala H. 2003. Adaptative and cross-adaptative response of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82, pp 265-272.
- Luppens S.B.I., Reij M.W., van der Heijden R.W.L., Rombouts F.M. and Abee T. 2002. Development of a standard Test To Assess the Resistance of *Staphylococcus aureus* Biofilm Cells to Disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp 4194-4200.
- 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. *Journal of Food Protection*, 53, pp 742-746.
- Mah T.-F. C. and O'Toole G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology*, 9, pp 34-39.
- Man N.-K., Degremont A., Darbord J.-C. Collet M. and Vaillant P. 1998. Evidence of Bacterial Biofilm in Tubing from Hydraulic Pathway of Hemodialysis System. *Artificial Organs*, 22, pp 596-600.
- Maris P. 1995. Modes of action of disinfectants. In : *Disinfectants : actions and applications*, McDaniel H.A., ed., Revue Scientifique et Technique de l'Office International d'Epizootics, 14, pp 47-55.
- McCarter L., Hilmen M. and Silverman . 1988. *Cell*, 54, pp345.
- McDonnell G. and Russell A.D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, pp 147-179.
- McEldowney S. and Fletcher M., 1986. Effect of Growth Conditions and Surface Characteristics of Aquatic Bacteria on Their Attachment to Solid Surfaces. *Journal of General Microbiology*, 132, pp 513-523.
- McFeters G.A., Yu F.P., Pyle B.H. and Stewart P.S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *Journal of Microbiological Methods*, 21, pp 1-13.
- McGuire J. and Krisdhasima V. 1991. Surface Chemical Influences on Protein Adsorption Kinetics. *Food Technology*, Dec., pp 92-96.
- Méchin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B. and Leveau J.Y. 1999. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86, pp 859-866.
- Merianos J. 1991. Quaternary Ammonium Antimicrobial Compounds. In : *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block S.S., ed., Lea and Febiger, 225-255.
- Meylheuc T. 2000. Influence de biosurfactants sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes* à des surfaces inertes – Conséquences sur la désinfection. Thèse de doctorat, Université Paris XI, 191p.

- Mihoub F. 2003. Influence de la conservation au froid des échantillons alimentaires sur la viabilité des micro-organismes présents. Essais de cryoprotection : Approches microbiologique et protéomique. Thèse de doctorat Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Massy.
- Mortimer F.C., Mason D.J. and Gant V.A. 2000. Flow Cytometric Monitoring of Antibiotic-Induced Injury in *Escherichia coli* Using Cell-Impermeant Fluorescent Probes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, pp 676-681.
- Mougin K and Haidara H. 2002. Complex Pattern Formation in Drying Dispersions. *Langmuir*, 18, pp 9566-9569.
- Mougin K, Haidara H. and Castelain G. 2001. Controlling the two-dimensional adhesion and organization of colloidal gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 193, pp 231-237.
- Nagai K., Murata T., Ohta S., Zenda H., Ohnishi M. and Hayashi T. 2003. Two Different Mechanisms Are Involved in the Extremely High-Level Benzalkonium Chloride Resistance of a *Pseudomonas fluorescens* Strain. *Microbiology and Immunology*, 47, pp 709-715.
- Naumova I.B., Shashkov A.S. 1997. Anionic Polymers in Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. *Biochemistry*, 62, pp 947-982.
- Navarre W.W., Schneewind O. 1999. Surface Proteins of Gram-positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63, pp 174-229.
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L. et Schaechter M. 1994. Physiologie de la cellule bactérienne : une approche moléculaire. Ed., Masson, 487p.
- Ntsama-Essomba C. 1996. Mécanismes de résistance aux désinfectants de *Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* obtenus en biofilms. Thèse, Université Paris-Sud, 209p.
- Oie S., Huang Y., Kamiya A., Konishi H. and Nakazawa T. 1996. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 85, pp 223-230.
- O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, 54, pp 49-79.
- Papageorgiou D. K. and Marth E.H. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in Whey and Skim Milk Containing 6 or 12% Sodium Chloride. *Journal of Food Protection*, 52, pp 625-630.
- Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P. and Bellon-Fontaine M.-N. 1997. Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *Casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, pp 1725-1731.
- Peng J.S., Tsai W.C and Chou C.C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 65, pp 105-111.
- Perrot F., Hébraud M., Charlionet R., Junter G-A. and Jouenne T. 2000. Protein patterns of gel-entrapped *Escherichia coli* cells differ from those of free-floating organisms. *Electrophoresis*, 21, pp 645-653.
- Pieto V. et Bardoneschi G. 1988. L'élimination des micro-organismes: Désinfection. Dans : *Microbiologie Alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire*. Eds. Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca F. Ed Tec & Doc Lavoisier, pp 291-307.

- Piette J.-P. G. and Idziak E.S. 1992. A Model Study of Factors Involved in Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, pp 2783-2791.
- Pitt W.G., McBride M.O., Lunceford J.K., Roper R.J. and Sagers R. 1994. Ultrasonic Enhancement of Antibiotic Action on Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, pp 2577-2582.
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C. and Lejeune P. 1999. Abiotic Surface Sensing and Biofilm-Dependent Regulation of Gene Expression in *Escherichia col.* *Journal of Bacteriology*, 181, pp 5993-6002.
- Reid G., Bialkowska-Hobrzanska H., van der Mei H.C. and Busscher H.J. 1999. Correlation between genetic, physico-chemical surface characteristics and adhesion of four strains of *Lactobacillus*. *Journal of Colloids and Surfaces: B*, 13, pp 75-81.
- Reverdy M.E. 1995a. Les Ammonium Quaternaires. *Dans : Antiseptie et désinfection*, Fleurette J., Freney J. et Reverdy M.E., eds., Editions Eska, 174-198.
- Reverdy M.E. 1995b. La Chlorhexidine. *Dans : Antiseptie et désinfection*, Fleurette J., Freney J. et Reverdy M.E., eds., Editions Eska, pp 135-168.
- Rijnaarts H.H.M, Norde W., Lyklema J. and Zehnder A. 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, pp 191-197.
- Roth B.L., Poot M., Yue S.T. and Millard P.J. 1997. Bacterial Viability and Antibiotic Susceptibility Testing with SYTOX Green Nucleic Acid Stain. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, pp 2421-2431.
- Roy B., Ackermann H.-W., Pandian S., Picard S. and Goulet J. 1993. Biological Inactivation of Adhering *Listeria monocytogens* by Listeriaphages and a Quaternary Ammonium Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, pp 2914-2917.
- Rubio C. 2002. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI. 213p.
- Russell A.D. 1991. Principles of Antimicrobial Activity. *In : Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block S.S., ed., Lea and Febiger, pp 29-58.
- Russell A.D. 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 155-165.
- Rutter P.R. and Vincent B. 1980. Adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects. *In: Microbial Adhesion to surfaces*. Ellis Horwood publishers, London.
- Sakagami Y., Yokoyama H., nishimura H., Ose Y. and Tashima T. 1989. Mechanism of Resistance to Benzalkonium Chloride by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, pp 2036-2040.
- Samuelsson M.-O. and Kirchman D.L. 1990. Degradation of Adsorbed Protein by Attached Bacteria in Relationship to Surface Hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp 3643-3648.
- Samranki M.M., Roques C. and Michel G. 1997. Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, pp 751-758.

- Santiago N.I, Zipf A. et Bhunia A. 1999. Influence of Temperature and Growth Phase on Expression of a 104-Kilodalton *Listeria* Adhesion Protein in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp 2765-2769.
- Sasahara K.C. and Zottola E.A. 1993. Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Utilizes a Primary Colonizing Microorganism in Flowing Systems. *Journal of Food Protection*, 56, pp 1022-1028.
- Sauer K. and Camper A.K. 2001. Characterisation of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth. *Journal of Bacteriology*, 183, pp 6579-6589.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. and Davies D.G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, pp 1140-1154.
- Seeliger H.P.R. et Jones D. 1986. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383AL. In Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G (Eds.). The Williams & Wilkins, Baltimore, Md, pp 1235-1245.
- Shapiro H.M. 2000. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 42, pp 3-16.
- Sinde E. and Carballo J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluoroethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, pp 439-447.
- Société Française d'hygiène hospitalière. 2003. Liste Positive Désinfectants. *Hygiènes*, XI, pp_204-221.
- Stanley N.R., Britton R.A., Grossman A.D. and Lazazzera B.A. 2003. Identification of Catabolite Repression as a Physiological Regulator of Biofilm Formation by *Bacillus subtilis* by Use of DNA Microarrays. *Journal of Bacteriology*, 185, pp 1951-1957.
- Steiner P., Sauer U. 2001. Proteins Induced during Adaptation of *Acetobacter aceti* to High Acetate Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp 5474-5481.
- Suller M.T.E. and Lloyd D. 1999. Fluorescence Monitoring of Antibiotic-Induced Bacterial Damage Using Flow Cytometry. *Cytometry*, 35, pp 235-241.
- Tabata A., Nagamune H., Maeda T., Murakami K., Miyake Y. and Kourai H. 2003. Correlation between Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membran Protein OprR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, pp 2093-2099.
- Takeo Y., Oie S, Kamiya A., Konishi H. and Nakazawa T. 1994. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*, 79, pp 19-26.
- Thomas L., Maillard J.-Y., Lambert R.J.W. and Russell A.D. 2000. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *Journal of Hospital Infection*, 46, pp 297-303.
- Tie Y., Calonder C. and van Tassel P.R. 2003. Protein adsorption: kinetics and history dependence. *Journal of Colloid Interface Science*, 268, pp 1-11.

- To M.S., Favrin S., Romanova N. and Griffiths M. 2002. Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modification of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp 5258-5264.
- Trueman J.R. 1971. The Halogens. In : *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. Hugo W.B. ed Academic press, London, pp 137-183.
- Vacheethasane K., Temenoff J.S., Higashi J.M., Gary A., Anderson J.M., Bayston R. and Marchant R.E. 1998. Bacterial surface properties of clinically isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene. In: WILEY J. et SONS (Eds).
- van der Mei H.C., Brokke P., Dankert J., Feijen J., Rouxhet P.G. and Busscher H.J. 1989. Physicochemical Surface Properties of Nonencapsulated and Encapsulated Coagulase-Negative Staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, pp 2806-2814.
- van der Mei H.C., Leonard A.J., Weerkamp A.H., Rouxhet P.G. and Busscher H.J. 1988. Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and nonfibrillar mutants: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of Bacteriology*, 70, pp 2462-6.
- van Klingeren B., Koller W., Bloomfield S.F., Böhm R., Cremieux A. and Holah J. 1998. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, pp 289-296.
- van Oss C.J. 1996. Forces interfaciales en milieux aqueux. 402 p. Masson.
- van Oss C.J., Chaudhury M.K., Good R.J. 1988. Interfacial Lifshitz van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem. Rev.* 88, pp 927-941.
- Vanhaecke E., Remon J.-P., Moors M., Raes F., de Rudder D. et van Peteghem A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L Stainless Steel: Role of Cell Surface Hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp 788-795.
- Vatanyoopaisarn S., Nazli A., Dodd C.E.R., Rees C.E.D. and Waites W.M. 2000. Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp 860-863.
- Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C. and Lejeune P. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 Mutant Strain Able To Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New *ompR* Allele That Increase Curli Expression. *Journal of Bacteriology*, 180, pp 2442-2449.
- Visser J. 1976. Adhesion of colloidal particles. *Journal of Colloid Interface Science*, 3, p 714.
- von Loosdrecht M.C., Lyklema J., Norde W., Schraa G. and Zehnder A.J. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial Steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, pp 1898-1901.
- von Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W. and Zehnder A.J.B. 1990. Influence of Interfaces on Microbial Activity. *Microbiological Review*, 54, pp 75-87.
- Wahlgren M., Arnebrant T., 1991. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in Biotechnology*, 9, 201-208.
- Walter III M.C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J. and Stewart P.S. 2003. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas*

aeruginosa Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, pp 317-323.

Williams I., Paul F., Lloyd D., Jepras R. and Venables W.A. 1999. Flow cytometry and others techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology*, 145, pp 1325-1333.

Xu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C.-T. and McFeters G.A. 1998. Spatial Physiological Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Is Determined by Oxygen Availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp 4035-4039.

ANNEXES

Annexe I : La dureté de l'eau

La dureté de l'eau est définie par le titre hydrotimétrique, qui correspond à la présence de sels de calcium et de magnésium. Plus une eau est riche en calcium et en magnésium, plus elle est dite « dure ». Inversement, une eau pauvre en calcaire est dite « douce ». Ainsi, l'importance du calcium (calcaire) dans l'eau est le principal critère déterminant sa dureté. La dureté associée à l'acidité de l'eau définissent son agressivité : une eau douce associée à un pH acide donne une eau agressive.

La dureté de l'eau s'exprime par un indice, ou titre hydrotimétrique, TH, exprimé en degrés, chaque degré résultant du calcul suivant : 1 degré (°F) = 4 mg/l de calcium ou 2,43 mg/l de magnésium ou 10 mg de calcaire.

Les eaux sont classées en fonction de leur TH : 0 à 6 degrés = eau très douce

6 à 15 degrés = eau douce

15 à 30 degrés = eau moyennement dure

30 degrés = eau dure.

Préparation de l'eau dure

Solution A

MgCl ₂ - 6H ₂ O	19,84g
CaCl ₂ - H ₂ O	46,24g
Eau distillée qsp	1000 mL

Solution B

NaHCO ₃	35,02g
Eau distillée qsp	1000 mL

Solution A	6 mL
Solution B	8 mL
Eau distillée qsp	1000 mL

pH $7 \pm 0,2$, stérilisée par filtration (\varnothing : 0,22 μ m ; Stéritop, Millipore, France)

Annexe II : Milieux de Croissance

Tryptone Soja Agar : TSA (Biomérieux)

Tryptone digestion pancréatique de caséine	15g
Peptone de soja, digestion papaïque de farine de soja	5g
NaCl	5g
Gélose	15g
Eau distillée	1000 mL

Tryptone Soja Bouillon : TSB (Biomérieux)

Tryptone digestion pancréatique de caséine	15g
Peptone de soja, digestion papaïque de farine de soja	5g
di-Potassium hydrogénophosphate	2,5g
Glucose	2,5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000 mL

Annexe III : Composition chimique de l'acier inoxydable AISI 316

Fe	Cr	Ni	Mn	Si	Mo	Cu	Ti	C	S	N
67,61%	17,04%	11,13%	1,25%	0,38%	2,13%	0,39%	<0,001	254ppm	25ppm	346ppm

STORAGE AND GROWTH CONDITIONS OF BACTERIAL STRAINS: WHAT IMPACT ON THEIR PHYSICOCHEMICAL SURFACE PROPERTIES?

A. ALLION^{1,2}, F. DURAND², J. CRIQUELION², G. RAUWEL², M.-N. BELLON-FONTAINE^{1*}.

¹ *Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, Massy, France.*

² *Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, France.*

Storage-growth impact on cell surface

Corresponding author. Mailing address: INRA-UBHM, 25 Avenue de la République, 91300 Massy, France.

Phone: 33 1 69 53 64 00.

Fax: 33 1 60 13 36 01.

E-mail: bellon@massy.inra.fr.

1 SUMMARY

2 INTRODUCTION

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 Bacterial strains and storage conditions.

3.2 Growth conditions and preparation of bacterial suspensions.

3.3 Physicochemical characterisation of the bacterial cell surface

3.4 Statistical analysis.

4 RESULTS

5 DISCUSSION

6 ACKNOWLEDGEMENTS

7 REFERENCES

1. SUMMARY

AIMS: TO STUDY THE EFFECTS OF STORAGE AND GROWTH CONDITIONS ON THE PHYSICOCHEMICAL SURFACE PROPERTIES (HYDROPHOBICITY OR HYDROPHILICITY, LEWIS ACID-BASE AND ELECTROPHORETIC MOBILITY PROPERTIES) OF BACTERIAL STRAINS.

Methods and Results: These characteristics were determined for *Staphylococcus aureus* CIP53154, *Listeria monocytogenes* CIP103575, *Listeria monocytogenes* 129P and *Pseudomonas aeruginosa* CIPA22 under a variety of storage conditions (-80°C and 4°C for 0, 1 or 2 months) and growth conditions (solid and liquid media).

Whatever the storage and growth protocols, the physicochemical surface properties of *Ps. aeruginosa* A22 were very similar. In contrast, Gram positive strains were more sensitive to these factors. Cells cultivated on solid media (TSA) were more hydrophobic than cells grown in liquid (TSB), and duration of storage affected the microbial surface charge, especially in the case of *L. monocytogenes* stored at 4°C.

Conclusions: Storage and growth conditions probably have a marked influence on the physicochemical surface properties of Gram-positive strains. Storage at -80°C should be preferred to +4°C, particularly for psychrophilic bacteria.

Significance and Impact of the Study: Changes to cellular physicochemical surface characteristics, and their probable adaptive response to the environment, probably modify both bacterial adhesion and resistance to biocides.

Keywords : physicochemical surface properties, storage conditions, growth conditions, hydrophobicity

2 INTRODUCTION

The cellular envelope of micro-organisms is a key element in their metabolic activity and their interactions with the environment. In particular, it is involved in the adsorption of molecules from the surroundings (nutrients, antimicrobial agents, etc.), as well as in the initiation of bioadhesive phenomena such as microbial adhesion, cell aggregation and the formation of biofilms. For bacterial physiologists, the composition of this envelope remains one of the tools of value for identification and classification, notably in enabling a distinction between Gram-positive and Gram-negative organisms. Indeed, although the cell wall of Gram positive bacteria is mainly composed of peptidoglycan (30 to 50% of the dry weight of the cell wall), polysaccharides (teichoic, teichuronic and lipoteichoic acids) and surface proteins (Hancock, 1991), that of Gram-negative bacteria is made up of peptidoglycan covered by an external membrane in which proteins, lipoproteins and lipopolysaccharides can insert themselves (Hancock, 1991; Neidhardt *et al.*, 1994). This composition, like the conformation of cell wall constituents, may nevertheless vary between genera and microbial species, as well as a function of environmental parameters (Fiedler, 1988; Neidhardt *et al.*, 1994; Naumova and Shashkov, 1997; Navarre and Schneewind, 1999). Bonet *et al.* (1993) have observed that the synthesis of exopolysaccharides and capsule formation in *Aeromonas salmonicida* A450 required the presence of glucose in the culture medium. In addition, Steiner and Sauer (2001) have showed that changes to medium acidity could modulate the expression of certain proteins in *Acetobacter aceti*. Physical state (solid or liquid) may also influence microbial physiology, as shown by Ljungh *et al.* (1985), Lee *et al.* (1993) and, more recently, Bakholdina *et al.* (2001) and Kiers *et al.* (2001).

Temperature is another key factor in bacterial metabolism (Neidhardt *et al.*, 1994). In particular, it may influence the production of certain surface proteins (Santiago *et al.*, 1999), extracellular appendages (Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000), and cell morphology modification (Briandet, 1999). When temperatures are close to or lower than 0°C (case of storage temperatures),

they not only cause a deceleration in metabolic activity (the basis for storage protocols) but may also induce the expression of specific Cold Acclimatisation Proteins (Caps) (Bayles *et al.*, 1996) and/or modify the fatty acid composition of the cytoplasmic membrane (Annous *et al.*, 1997 ; Jones *et al.*, 1997). With the knowledge that a strong link exists between surface physicochemical properties and the composition of the microbial envelope (van der Mei *et al.*, 1989; Bonet *et al.*, 1993; Briandet *et al.*, 1999a; Boonaert and Rouxhet, 2000), it is then reasonable to ask whether storage and culture conditions might not affect hydrophobic/hydrophilic characteristics, Lewis acid-base properties and the electrical charge of microbial cells, all of which are involved in numerous interfacial phenomena, including those referred to above.

In this context, we sought to assess the effect of standard storage conditions (4°C or -80°C over a period of 2 months) and growth conditions (in broth or on agar) on the surface physicochemical characteristics of widely used strains, particularly those employed during procedures to validate the bactericidal activity of disinfectants, i.e. *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 (Gram-negative bacillus), *Staphylococcus aureus* CIP 53 154 (Gram-positive capsule forming coccus) and *Listeria monocytogenes* CIP 103 575 (Gram-positive bacillus). A further strain of *Listeria monocytogenes* (wild-type strain) was also included in this study: *L. monocytogenes* 129P. Hydrophobicity/hydrophilicity and the Lewis acid-base characteristics of the strains were assessed using the MATS (microbial adhesion to solvent) method, while the global surface charge was determined from measurements of electrophoretic mobility, using microelectrophoresis.

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 Bacterial strains and storage conditions.

Staph. aureus strain CIP53154, *Ps. aeruginosa* CIPA22 and *L. monocytogenes* CIP103575 were provided by Institut Pasteur (France), while *L. monocytogenes* 129P was isolated from an industrial

plant surface. For each of these strains, and in accordance with the NF EN 12353 standard (Anon., 2000b), two storage conditions were applied, one at -80°C and the other at +4°C.

Stock at -80°C was performed by suspending the micro-organisms in Tryptone Soy Broth (BioMérieux, France) before application to Tryptone Soy Agar (BioMérieux, France). After 24 hours of incubation at 37°C, the bacterial mat was collected by scraping into 10 ml of a cryoprotectant solution (beef extract: 3 g l⁻¹ ; tryptone, pancreatic digestion: 5 g l⁻¹, glycerol 150 g l⁻¹). The bacterial suspension thus obtained was diluted to 1:10 in the same cryoprotectant solution, incubated for 30 minutes at 20°C, and then distributed into cryotubes in 200 µl aliquots prior to storage at -80°C.

Stock at 4°C was carried out on bacterial cultures stored at -80°C and then isolated on TSA prior to incubation for 24 hours at 37°C. The agars were then stored for a maximum of 2 months at 4°C.

3.2 Growth conditions and preparation of bacterial suspensions.

All experiments were performed on three separate cultures using micro-organisms stored for 0, 1 and 2 months at 4°C and -80°C and then cultured on TSA or in TSB.

Bacterial growth. Bacterial cultures on solid agar were obtained after three successive inoculations for 24 hours at 37°C on agar in a sloping position (TSA).

Cells stored at 4°C and -80°C were sub-cultured twice in TSB at 37°C before the working culture. For the working culture, 1 ml of the second sub-culture was inoculated into 100 ml of a fresh medium and incubated at 37°C until the stationary stage was reached. Growth curves were recorded to determine the beginning of the stationary stage (data not shown).

Bacterial suspensions. Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 7000 × g at +4°C, and then washed twice with and re-suspended in the relevant sterile suspending liquid (NaCl 1.5 × 10⁻¹ or 1.5 × 10⁻³ mol l⁻¹).

3.3 Physicochemical characterisation of the bacterial cell surface

Electrophoretic Mobility. In order to measure electrophoretic mobility (EM), bacteria were suspended in NaCl 1.5×10^{-3} mol l⁻¹. The pH of the suspension was adjusted in the range of pH 2 to 9 by adding nitric acid (HNO₃) or potassium hydroxide (KOH). Electrophoretic mobility was measured using a 50-V electric field and a Laser Zetameter (CAD Instrumentation, France). The results were based on an automated video analysis of approximately 200 particles for each measurement. In order to inhibit the motility of *Ps. aeruginosa* cells because of flagella activity, formaldehyde (0.7% v/v) was added to the culture prior to centrifugation (Bouttier *et al.*, 1997).

Microbial adhesion to solvents. The partitioning method previously described by Bellon-Fontaine *et al.* (1996) is based on a comparison between microbial cell affinity with a monopolar or apolar solvent. The monopolar solvent may be an electron-acceptor or electron-donor solvent, but both solvents must exhibit similar van der Waals surface tension components.

On this basis, we selected the following pairs of solvents: (i) chloroform (Sigma), an electron-acceptor solvent, with hexadecane (Sigma), an apolar *n*-alkane and (ii) ethyl acetate (Sigma), a strong electron-donor solvent, with decane (Sigma), an apolar *n*-alkane.

Experimentally, 2.4 ml of a suspension containing approximately 10^8 cells in NaCl 1.5×10^{-1} mol l⁻¹ was vortex-mixed for 60 s with 0.4 ml of the solvent under investigation. The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure complete separation of the two phases before a sample (1 ml) was carefully collected from the aqueous phase and the optical density measured at 400 nm. The percentage of cells binding to each solvent was subsequently calculated using the equation: % affinity = $100 \times [1 - (A_1/A_0)]$, where A_0 is the optical density of the bacterial suspension measured at 400 nm before mixing, and A_1 is the absorbance after mixing.

3.4 Statistical analysis.

ANOVA variance analysis and principal-component analysis (PCA) were performed using Statgraphics (Manugistic™, Rockville, Md).

4 RESULTS

The results of electrophoretic mobility measurements obtained under the different conditions for storage and growth tested, are shown in Figures 1 to 4 for *Ps. aeruginosa* A22, *Staph. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 and *L. monocytogenes* 129P, respectively. Whatever the microbial species considered and the experimental conditions prevailing (storage and growth), the strains appeared to be electronegative within the studied range of pH values. However, this electronegativity was less marked with *Staph. aureus* 53154 than with the two strains of *L. monocytogenes* or *Ps. aeruginosa*. Although this property remained stable for Gram-negative bacteria, it nevertheless evolved for the three Gram-positive organisms. Thus we observed a significant increase in the global surface charge of strains, depending on the duration of storage, at a temperature of 4°C. This effect was particularly marked in the two *L. monocytogenes* strains ($P < 0.05$). At -80°C, no significant effect of storage duration could be demonstrated on these electrical characteristics of bacteria ($P > 0.05$).

In contrast, a considerable impact of the physical state of the culture medium could be noted on the electrical properties of the three Gram-positive bacteria: culture on TSA (when compared to growth in TSB) generated an increase in surface electronegativity for *Staph. aureus* 53154 and a reduction in this property for the two *L. monocytogenes* strains.

The results of MATS tests are grouped in Tables 1 to 4 for *Ps. aeruginosa* A22, *Staph. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 and *L. monocytogenes* 129P, respectively. Although *Ps. aeruginosa* A22 appeared to be strongly hydrophilic (weak affinity with hexadecane and decane), whatever the method and period of storage or the type of culture medium employed, the three Gram-positive bacteria exhibited intermediate values for surface hydrophilicity (approximately 50% affinity with apolar solvents). In the case of *L. monocytogenes* and *Ps. aeruginosa*, this hydrophilicity was associated with more or less marked Lewis acid-base characteristics (high affinity with chloroform and ethyl acetate when compared with apolar solvents), while for *Staph. aureus*, it was linked to a principally Lewis base property. In line with data on electrophoretic

mobility, and although no significant variations in these properties could be demonstrated as a function of storage and growth conditions regarding the three collection strains ($P>0.05$), a change was observed in the wild-type strain. Thus, after two months of storage at 4°C, *Listeria monocytogenes* 129P appeared to be more hydrophilic, particularly after growth in TSB. Finally, we noted that growth in broth significantly increased ($P<0.05$) the hydrophilic nature of Gram-positive micro-organisms (when compared with the data obtained after culture on agar).

If all the data obtained were grouped in a single, principal component analysis, (Figure 5), it appeared clear that each bacterial species exhibited physicochemical surface properties which differed from the other two species (one group of data per bacterial species). Furthermore, and under the experimental conditions tested, we noted that only the Gram-positive strains analysed exhibited surface characteristics which were capable of changing as a function of storage conditions (duration and protocol) and, above all, of the culture method employed.

5 DISCUSSION

The storage and culture of micro-organisms remain key stages in most microbiological procedures, regardless of the phenomenon under study. However, although they are essential, it remains true that these fundamental protocols are usually left to the discretion of those conducting the experiments. Thus some laboratories store their strains at 4°C and others at -20°C or -80°C, for periods which may vary from a few weeks to several months. As for the culture conditions, and notably the physical state of the nutrient medium employed, the same degree of variability may be encountered. To resolve this problem of diversity, and therefore facilitate the comparison of test results between laboratories, standardisation organisations have recommended standardised protocols in their norms. These protocols are usually based on producing a frozen "primary" stock and a working stock which can be stored at 4°C for several weeks (Anon., 2000a; Anon., 2000b). Although the impact of these experimental differences on bacterial physiology has been the subject of numerous studies, little work has been done on their physicochemical surface properties. Because

these properties depend on the composition of the bacterial envelope, which in turn is closely involved in interfacial phenomena (microbial adhesion, biofilms, disinfection etc.), legitimate questions (as mentioned above) are raised as to the impact of storage and growth conditions on the hydrophilicity, Lewis acid-base characteristics and electrophoretic mobility of strains belonging to different bacterial species. Based on a review of the literature, we chose to test two of the most widely employed conditions for storage (in a cryoprotectant solution at -80°C and on agar at $+4^{\circ}\text{C}$) using the same culture medium but presented in two different physical states, i.e. solid (agar) and liquid (broth). As shown above, the tests were performed on three micro-organisms which are frequently recommended in disinfection standards, and a wild-type strain isolated from an industrial site.

As a general rule, and in line with recent studies (Briandet, 1999, Meylheuc, 2000), we not only observed differences in the physicochemical surface characteristics of the three bacterial species tested, but also between the two strains of *L. monocytogenes*. As suggested by Hancock (1991) and Neidhardt *et al.* (1994), it is the architecture and nature of the chemical groups present on the surface of bacterial cells which determine the physicochemical surface characteristics of micro-organisms. Thus, the negligible affinity with apolar solvents exhibited by *Ps. aeruginosa* A22 may be due to the hydrophilic portion of the lipopolysaccharides present on the surface of Gram-negative bacteria, while the weak hydrophilicity of Gram-positive bacteria may be linked to the presence of lipoteichoic acids and hydrophobic macromolecules anchored in their cell wall. As for the negative surface charge of bacteria, this may be directly linked to the presence of ionised groups (phosphate, carboxylic, sulphate, amine) of macromolecules making up the cell wall of Gram-positive bacteria and the outer membrane of Gram-negative bacteria (Rijnaarts *et al.*, 1995). Cellular architecture and the composition of bacterial capsule constituents therefore present inter and intra-species variations which lead to different physicochemical surface properties (van der Mei *et al.*, 1989; Pelletier *et al.*, 1997; Giovannacci *et al.*, 2000). However, and as we have

demonstrated, these properties are not "set in stone" and may evolve, depending on the physical and chemical environment of micro-organisms, and more particularly the conditions prevailing during their storage and growth.

The storage of micro-organisms must first of all ensure their survival over a given period of time (Carvalho *et al.*, 2003, Mihoub, 2003). Several storage techniques have been proposed, based on reducing the metabolic activity of micro-organisms. They may be freeze-dried, frozen (to -20°C, -80°C or -196°C), or inoculated on agar and then stored at +4°C. Having selected freezing at -80°C and refrigeration at +4°C, we were able to note a marked evolution in the physicochemical surface properties of some bacteria during their storage at +4°C, notably for psychrophilic strains such as *L. monocytogenes*, these findings being in agreement with those obtained by Briandet *et al.* (1999a). At this temperature, these bacteria are indeed capable of growing (Papageorgiou and Marth, 1989) and adapting their physiology by synthesising, for example, specific proteins (Caps, or Cold acclimatisation proteins) (Bayles *et al.*, 1996), or by modifying the fatty acid composition of their membranes (Annous *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997). The different adaptations of *L. monocytogenes* to temperatures close to zero may therefore have considerable effects upon their physicochemical surface properties (Briandet *et al.*, 1999b) and also on their pathogenic potential, as shown by Buncic and Avery in 1996. In contrast, storage at -80°C in a cryoprotectant solution seems (at least for a period of two months) to sufficiently reduce bacterial metabolism to restrict phenotypic evolutions and conserve the physicochemical surface properties of micro-organisms (Briandet *et al.* 1999b). Based on the data obtained, storage at +4°C on nutrient agar should therefore only be used for very short periods of storage (less than one month), in contrast with storage at -80°C, and particularly for psychrophilic bacteria.

As for the conditions for growth, it is clearly established today that the composition of a medium (Bonet *et al.* 1993; Horská *et al.* 1993), the pH (Briandet *et al.* 1999a) and the incubation temperature (Hill and James, 1972; Briandet *et al.*, 1999b, Santiago *et al.*, 1999) can affect the

physicochemical surface properties of micro-organisms. In contrast, few studies have concerned the impact of the physical state of the culture medium (i.e. solid or liquid) on these properties (Ljungh *et al.*, 1985; Kiers *et al.*, 2001). Under the experimental conditions tested, only Gram-positive strains demonstrated significant variations in terms of their hydrophilicity and surface electronegativity, as a function of the culture method employed (i.e. on agar or in broth). These results agree with those found by Ljungh *et al.* (1985), who demonstrated the more marked surface hydrophobicity of *Staph. aureus* strains cultured on solid agar than in nutrient broth. The chemical compositions of the culture media were similar, so that differences in physicochemical surface properties could therefore be attributed to the culture method employed alone (agar or nutrient broth). In a broth, micro-organisms are "free" (planktonic cells), while on agar they can be assimilated with "fixed" cells. Like the development of cells in biofilms, bacterial colonies developing on agar do not benefit from a nutrient and oxygen input which is homogenous from all sides. This mode of development may therefore lead to spatiotemporal heterogeneity in the metabolic activity of micro-organisms (Lai *et al.* 1997; Huang *et al.* 1998; Choo-Smith *et al.* 2001; Sauer *et al.* 2002), and consequently changes to the elemental composition of their cell wall (Perrot *et al.*, 2000). The physical state of the culture (solid or liquid) therefore influences the near environment of micro-organisms and hence their physicochemical surface properties, as we have demonstrated.

To summarise, the work carried out in the context of this study allowed us to demonstrate changes in the physicochemical surface characteristics of *Staph. aureus* 53154, *L. monocytogenes* 103575 and *L. monocytogenes* 129P as a function of the storage protocol, duration of storage and physical state of the culture medium employed. However, no general rule could be established, i.e. an increase or reduction in the hydrophilicity and/or electronegativity of the surface of strains, under the conditions applied. On the other hand, these changes, which probably constituted an

adaptive response to the chemical and physical environment, may in particular modify their bioadhesive behaviour and their response to the action of antimicrobial agents.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank R. Briandet, T. Meylheuc, J. Rault et M. Renault for their help and their valuable comments on this work and V. Hawken for English translation of the manuscript.

7 REFERENCES

Anon. (2000a). AOAC. Official Method 991.48. Testing Disinfectants against *Staphylococcus aureus*.

Anon. (2000b). Norme AFNOR NF EN 12353. Antiseptiques et désinfectants chimiques - Conservation des souches microbiennes utilisées pour la détermination de l'activité bactéricide et fongicide.

Annous B.A., Becker L.A., Bayles D.O., Labeda D.P. and Wilkinson B.J. (1997) Critical role of anteiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, **63**, 3887-3894.

Bakholdina S.I., Krasikova I.N., Buzoleva L.S., Shubin F.N. and Solov'eva T.F. (2001) Effects of culture method and growth phase on free lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 415-421.

Bayles D.O., Annous B.A. and Wilkinson B.J. (1996) Cold stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes* in Response to Temperature Downshock and Growth at Low Temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, **62**, 1116-1119.

Bellon-Fontaine M.-N., Rault J. and Van Oss C.J. (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces. B : Biointerfaces*, **7**, 47-53.

- Bonet R., Simon-Pujol M.D. and Congregado F. (1993) Effects of Nutrients on Exopolysaccharide Production and Surface properties of *Aeromonas salmonicida*. *Applied Environmental Microbiology*, **59**, 2437-2441.
- Boonaert C.J.P. and Rouxhet P.G. (2000) Surface of Lactic Acid Bacteria : Relationships between Chemical Composition and Physicochemical Properties. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 2548-2554.
- Bouttier S., Linxe C., Ntsama C., Bellon-Fontaine M.-N. and Fourniat J. (1997) Attachment of *Salmonella choleraesuis choleraesuis* to Beef Muscle and Adipose Tissues. *Journal of Food Protection*, **60**, 16-22.
- Briandet R. (1999) Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms – Aspects physico-chimiques. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes.
- Briandet R., Leriche V., Carpentier B. and Bellon-Fontaine M.-N. (1999a) Effects of the Growth Procedure on the Surface Hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their Adhesion to Stainless Steel. *Journal of Food Protection*, **62**, 994-998.
- Briandet R, Meylheuc T., Maher C. and Bellon-Fontaine M.-B. (1999b) *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *Applied Environmental Microbiology*, **65**, 5328-5333.
- Buncic S. and Avery S.M. (1996) Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37°C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Letters in Applied Microbiology*, **23**, 18-22.
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X. and Gibbs P. (2003) Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 947-952.
- Choo-Smith L.-P., Maquelin K., van Vreeswijk T. *et al.* (2001) Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. *Applied Environmental Microbiology* **67**, 1461-1469.
- Fiedler F. (1988) Biochemistry of the Cell Surface of Listeria Strains : A Locating General View. *Infection*, **16**, S92-S97.

- Giovannaci I., Ermel G., Salavt G., Vendevre J.L. and Bellon-Fontaine M.-N. (2000) Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 992-1000.
- Hancock I.C. (1991) Microbial Cell Surface Architecture. In *Microbial Cell Surface Analysis : Structural and Physicochemical Methods* ed. Mozes N., Handley P.S., Busscher H.J. and Rouxhet P.G. pp. 21-59. VCH publishers.
- Hill A.W. and James A.M. (1972). Effect of growth temperature on surface properties of cells of *Staphylococcus aureus* with particular reference to methicillin-resistance. *Microbios*, **6**, 169-178.
- Huang C. T., Xu K., McFeters G.A. and Stewart P. S. (1998) Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase Expression within Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation. *Applied Environmental Microbiology*, **64**, 1526-1531.
- Horská E., Pokorný J. and Labajová M. (1993) Changes of surface charge and hydrophobicity of the outer bacterial membrane depending on the cultivation medium. *Biológia (Bratislava)*, **48**, 343-347.
- Jones C.E., Shama G., Jones D., Roberts I.S and Andrew P.W. (1997) Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 31-35.
- Kiers P.J.M., Bos R., van der Mei H.C. and Busscher H.J. (2001) The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar. *Microbiology*, **147**, 757-762.
- Lai H.-C., Lai M.-J., Lin-Chao S., Lu K.-T. and Ho S.-W. (1997) Population Cell Differentiation of *Serratia marcescens* on Agar Surface and in Broth Culture. *Journal of Microbiology and Immunology*, **30** : 242-254.
- Lee J.C., Takeda S., Livolsi P.J. and Paoletti L.C. (1993) Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **61**, 1853-1858.

- Ljungh A., Hjerten S. and Wadstrom T. (1985) High Surface Hydrophobicity of Autoaggregating *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Human Infections Studied with the Salt Aggregation Test. *Infection and Immunity*, **47**, 522-526.
- Meylheuc T. (2000) Influence de biosurfactants sur l'adhésion de *Listeria monocytogenes* à des surfaces inertes – Conséquences sur la désinfection. Thèse de doctorat, Université Paris XI.
- Mihoub F. (2003) Influence de la conservation au froid des échantillons alimentaires sur la viabilité des micro-organismes présents. Essais de cryoprotection : Approches microbiologique et protéomique. Thèse de doctorat Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Massy.
- Naumova I.B. and Shashkov A.S. (1997) Anionic Polymers in Cell Walls of Gram-Positive Bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 947-982.
- Navarre W.W. and Schneewind O. (1999) Surface Proteins of Gram-positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 174-229.
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L. and Schaechter M. (1994) Structure et fonction des parties de la cellule bactérienne. In *Physiologie de la cellule bactérienne : une approche moléculaire*. ed Neidhardt F.C., Ingraham J.L. and Schaechter M. pp.28-56 Paris: Masson.
- Papageorgiou D.K. and Marth E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in Whey and Skim Milk Containing 6 or 12% Sodium Chloride. *Journal of Food Protection*, **52**, 625-630.
- Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P. and Bellon-Fontaine M.-N. (1997) Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Applied Environmental Microbiology*, **63**, 1725-1731.
- Perrot F., Hébraud M., Charlionet R., Junter G-A. and Jouenne T. (2000) Protein patterns of gel-entrapped *Escherichia coli* cells differ from those of free-floating organisms. *Electrophoresis*, **21**, 645-653.
- Rijnaarts H.H.M, Norde W., Lyklema J. and Zehnder A.J.B. (1995) The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **4**, 191-197.

Santiago N.I, Zipf A. and Bhunia A.K. (1999) Influence of Temperature and Growth Phase on Expression of a 104-Kilodalton *Listeria* Adhesion Protein in *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*, **65**, 2765-2769.

Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. and Davies D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, **184**, 1140-1154.

Steiner P. and Sauer U. (2001) Proteins Induced during Adaptation of *Acetobacter aceti* to High Acetate Concentrations. *Applied Environmental Microbiology*, **67**, 5474-5481.

van der Mei H.C., Brokke P., Dankert J., Feijen J., Rouxhet P.G. and Busscher H.J. (1989) Physicochemical Surface Properties of Nonencapsulated and Encapsulated Coagulase-Negative Staphylococci. *Applied Environmental Microbiology*, **55**, 2806-2814.

Vatanyoopaisarn S., Nazli A., Dodd C.E.R., Rees C.E.D. and Waites W.M. (2000) Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 860-863.

Table 1 Percentage affinity to solvents (Chl: Chloroform, Hx: Hexadecane, Dc: Decane and EA: Ethyl Acetate) of *Ps. aeruginosa* A22 as a function of storage and growth conditions.

Medium	Stock	Period (months)	Chl	Hx	Dc	E A
TSA	+4°C	0	74 ± 2	2 ± 1	0 ± 0	27 ± 6
		1	70 ± 5	1 ± 2	0 ± 0	26 ± 1
		2	66 ± 9	5 ± 4	2 ± 3	24 ± 5
	-80°C	0	74 ± 4	2,6± 3	2 ± 2	26 ± 8
		1	71 ± 12	3 ± 3	2 ± 2	25 ± 6
		2	68 ± 3	7 ± 7	6 ± 5	25 ± 4
TSB	+4°C	0	84 ± 5	0 ± 1	0 ± 0	29 ± 12
		1	79 ± 3	2 ± 2	0 ± 1	33 ± 1
		2	84 ± 4	6 ± 2	2 ± 1	25 ± 1
	-80°C	0	83 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	31± 10
		1	81± 4	1 ± 1	0 ± 0	28 ± 7
		2	74 ± 5	4 ± 2	1 ± 2	26 ± 3

Table 2 Percentage affinity to solvents (Chl: Chloroform, Hx: Hexadecane, Dc: Decane and EA: Ethyl Acetate) of *Staph. aureus* 53154 as a function of storage and growth conditions.

Medium	Stock	Period (months)	Chl	Hx	Dc	E A
TSA	+4°C	0	98 ± 1	64 ± 7	61 ± 7	13 ± 10
		1	98 ± 2	77 ± 10	79 ± 8	40 ± 28
		2	97 ± 2	74 ± 11	74 ± 11	56 ± 30
	-80°C	0	96 ± 3	59 ± 7	67 ± 12	8 ± 7
		1	97 ± 2	69 ± 15	77 ± 9	35 ± 31
		2	98 ± 1	76 ± 4	74 ± 5	51 ± 22
TSB	+4°C	0	94 ± 4	47 ± 8	60 ± 9	2 ± 2
		1	98 ± 2	66 ± 8	75 ± 5	4 ± 4
		2	96 ± 4	61 ± 14	62 ± 15	10 ± 11
	-80°C	0	97 ± 4	45 ± 6	69 ± 9	1 ± 1
		1	98 ± 3	68 ± 9	72 ± 10	12 ± 10
		2	96 ± 3	58 ± 15	69 ± 18	8 ± 8

Table 3 Percentage affinity to solvents (Chl: Chloroform, Hx: Hexadecane, Dc: Decane and EA: Ethyl Acetate) of *L. monocytogenes* 103 575 as a function of storage and growth conditions.

Medium	Stock	Period (months)	Chl	Hx	Dc	A E
TSA	+4°C	0	80 ± 5	50 ± 7	53 ± 7	36 ± 2
		1	90 ± 1	56 ± 1	55 ± 2	33 ± 1
		2	89 ± 4	54 ± 3	59 ± 8	28 ± 2
	-80°C	0	76 ± 5	53 ± 7	58 ± 6	36 ± 1
		1	85 ± 1	54 ± 4	57 ± 1	34 ± 1
		2	88 ± 3	59 ± 6	59 ± 10	28 ± 3
TSB	+4°C	0	78 ± 5	43 ± 2	43 ± 5	21 ± 4
		1	79 ± 4	49 ± 6	48 ± 4	23 ± 3
		2	82 ± 3	44 ± 5	45 ± 4	20 ± 3
	-80°C	0	73 ± 6	40 ± 2	43 ± 3	19 ± 3
		1	82 ± 4	45 ± 7	49 ± 3	17 ± 2
		2	93 ± 1	63 ± 7	62 ± 11	20 ± 5

Table 4 Percentage affinity to solvents (Chl: Chloroform, Hx: Hexadecane, Dc: Decane and EA: Ethyl Acetate) of *L. monocytogenes* 129P as a function of storage and growth conditions.

Medium	Stock	Period (months)	Chl	Hx	Dc	E A
TSA	+4°C	0	92 ± 2	61 ± 4	58 ± 3	55 ± 2
		1	89 ± 3	60 ± 4	53 ± 5	46 ± 11
		2	79 ± 7	59 ± 7	55 ± 7	52 ± 4
	-80°C	0	89 ± 7	67 ± 8	66 ± 10	36 ± 3
		1	94 ± 3	75 ± 4	72 ± 7	30 ± 5
		2	84 ± 3	64 ± 9	54 ± 10	42 ± 12
TSB	+4°C	0	81 ± 7	51 ± 4	47 ± 3	60 ± 4
		1	73 ± 5	40 ± 6	34 ± 5	38 ± 4
		2	63 ± 6	26 ± 8	23 ± 6	35 ± 4
	-80°C	0	82 ± 3	54 ± 5	49 ± 4	49 ± 11
		1	76 ± 3	47 ± 2	40 ± 3	32 ± 1
		2	78 ± 4	46 ± 5	42 ± 4	35 ± 4

Figure 1: Electrophoretic mobility (E.M.) of *Ps. aeruginosa* A22 at pH 2 to 9 depending on storage and growth conditions (A: 4°C-TSA; B: 4°C-TSB; C: -80°C-TSA; D: -80°C-TSB).

Figure 2: Electrophoretic mobility (E.M.) of *Staph. aureus* 53 154 at pH 2 to 9 depending on storage and growth conditions (A: 4°C-TSA; B: 4°C-TSB; C: -80°C-TSA; D: -80°C-TSB).

Figure 3: Electrophoretic mobility (E.M.) of *L. monocytogenes* 103 575 at pH 2 to 9 depending on storage and growth conditions (A: 4°C-TSA; B: 4°C-TSB; C: -80°C-TSA; D: -80°C-TSB).

Figure 4: Electrophoretic mobility (E.M.) of *L. monocytogenes* 129P at pH 2 to 9 depending on storage and growth conditions (A: 4°C-TSA; B: 4°C-TSB; C: -80°C-TSA; D: -80°C-TSB).

Figure 5: Principal-component analysis of combined physicochemical properties (affinity for the solvents used with MATS method and electrophoretic mobilities of bacteria) of each strains grown on TSA (black symbols) or in TSB (clear symbols) for 0 (T0), 1 (T1) and 2 (T2) months of storage at 4°C (circle) and at -80°C (square).

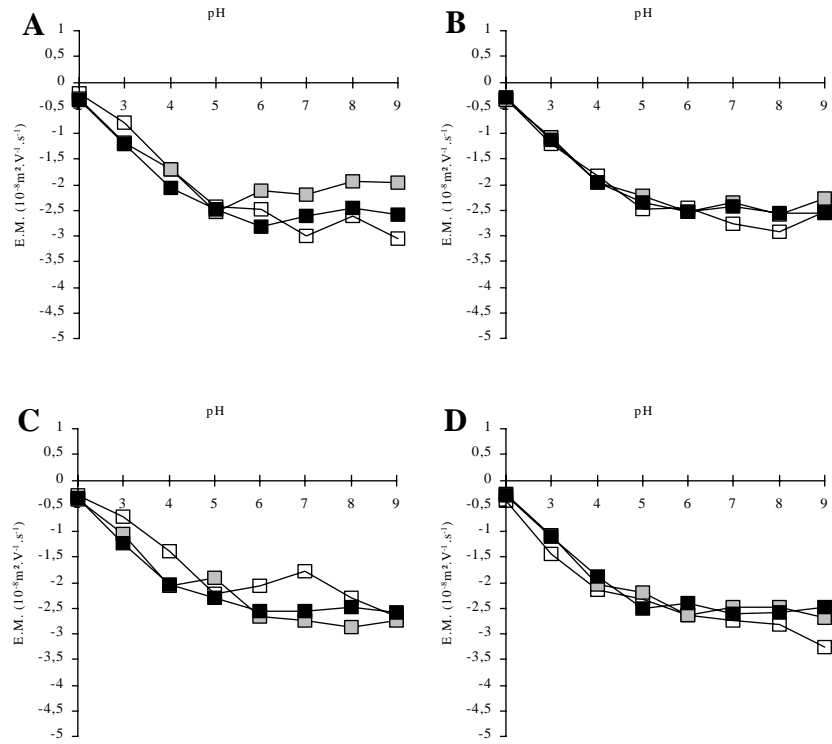


Figure 1

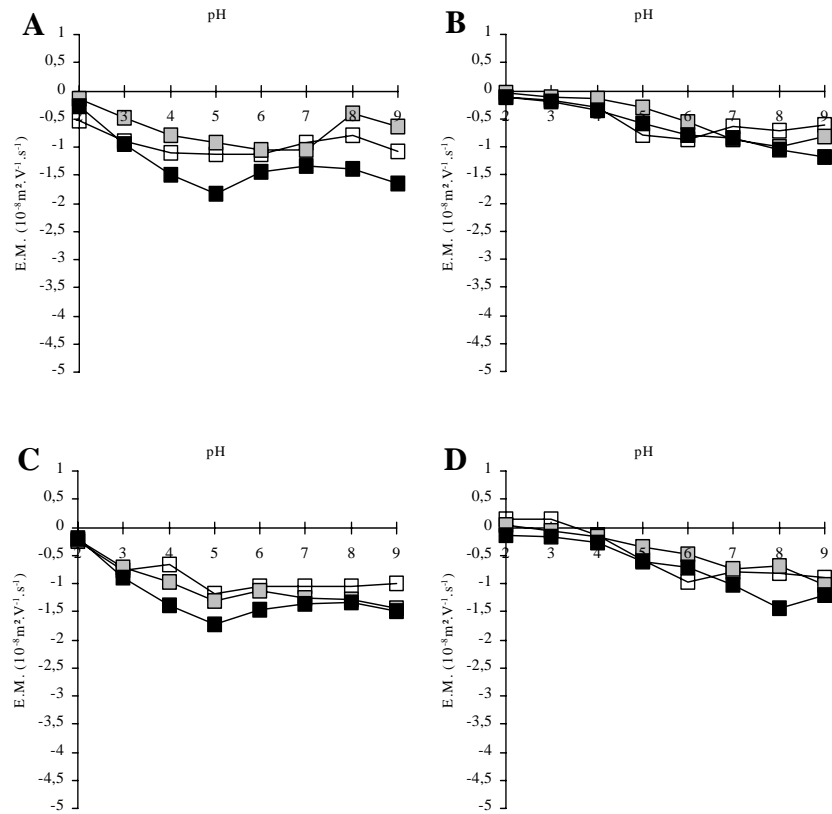


Figure 2

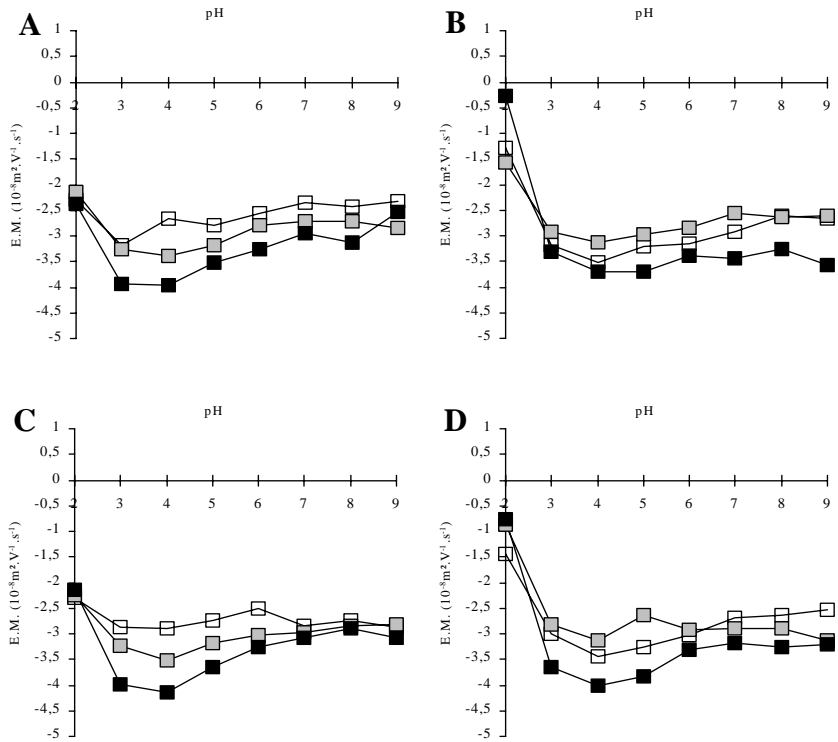


Figure 3

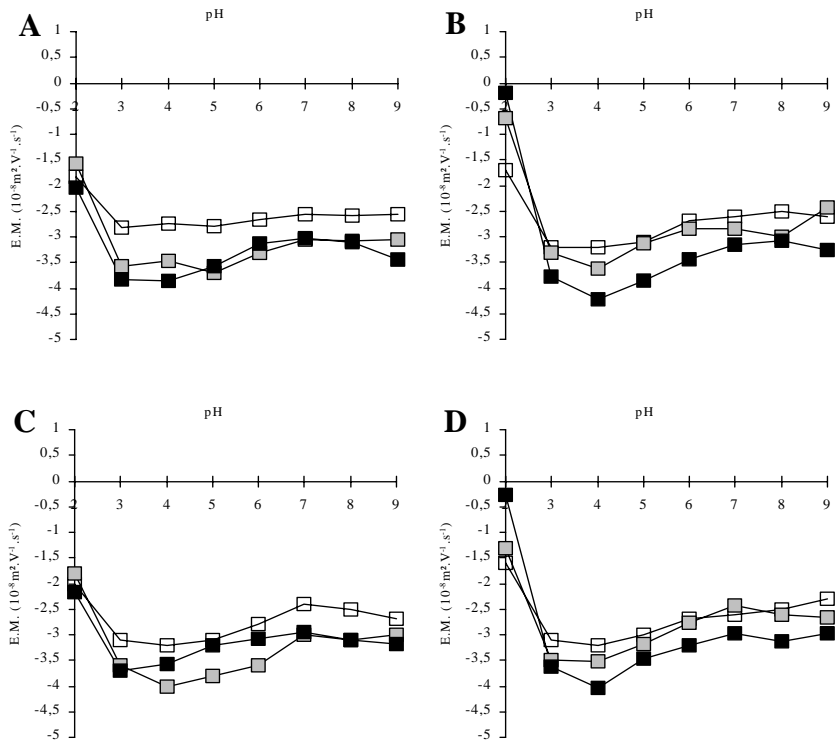


Figure 4

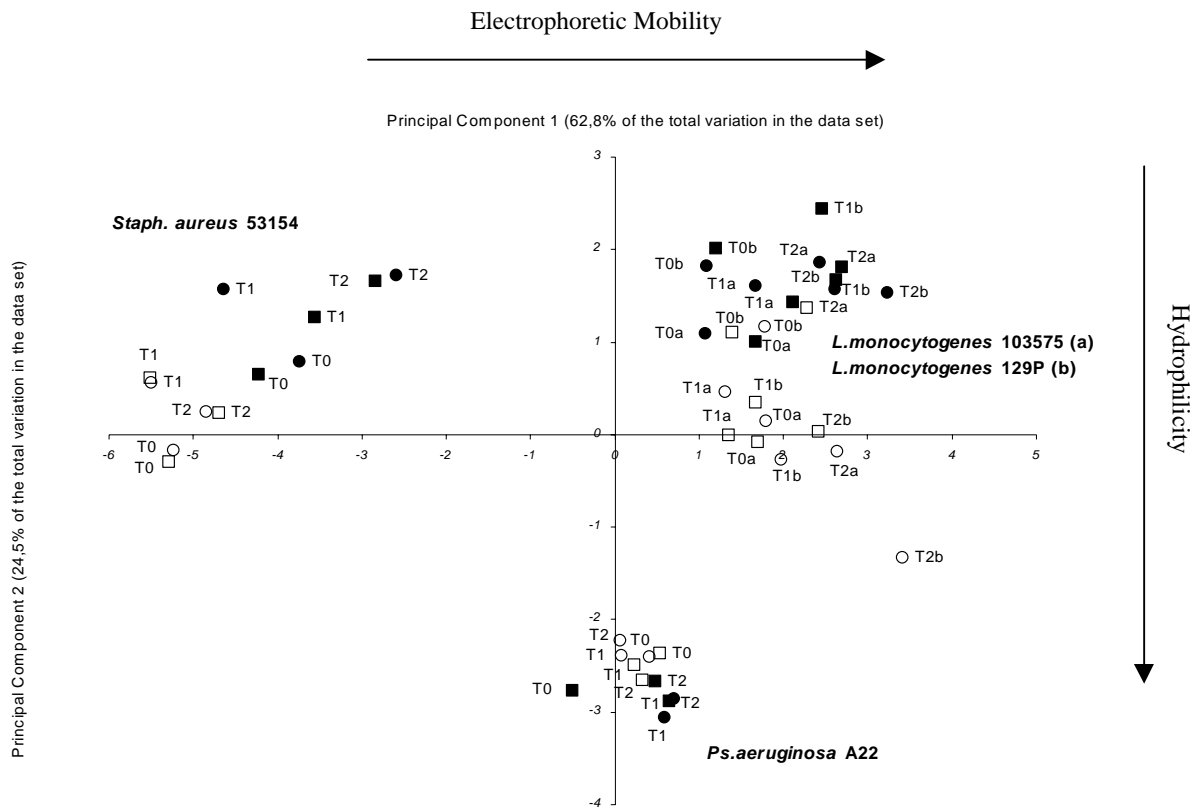


Figure 5

INFLUENCE OF STORAGE (DURATION & PROTOCOL) AND GROWTH CONDITIONS ON PHYSICO-CHEMICAL SURFACE PROPERTIES OF WILD TYPE AND BACTERIA FROM COLLECTION

A. ALLION^{1,2}, F. DURAND², J. CRIQUELION², G. RAUWEL², M.-N. BELLON-FONTAINE¹

INRA, Unité de recherche en bioadhésion et hygiène des matériaux, Massy, France¹ - Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes², France.

AIM OF THE STUDY: The objective of this study was to determine the influence of storage and growth conditions on hydrophobicity, Lewis acid-base properties and electrophoretic mobility of wild type and bacteria from collection.

MATERIALS AND METHODS:

Bacterial strains, storage and growth conditions :

St. aureus 53154 (Sa 53154), *Ps. aeruginosa* A22 (Pa A22) and *L. monocytogenes* 103575 (Lm 103575) were provided from Institut Pasteur Collection (France); whereas *L. monocytogenes* 129P (Lm 129P) was isolated from food industry. Each strain was stored at -80°C in cryoprotective solution and at +4°C on TSA (Biomérieux, France), during 2 months maximum. All experiments were realised at 0, 1 and 2 months of storage. For all experiments, cells were subcultured twice on the same medium as the final culture. Bacteria grown on Tryptone Soy Agar (TSA) or on Tryptone Soy Broth (TSB) at 37°C.

Physicochemical characterisation of bacterial cells :

Cells were cleaned by three successive centrifugations (7000 g, 10 minutes, 4°C) and resuspensions in the relevant liquid (NaCl 1,5.10⁻³ mol.l⁻¹ for electrophoretic mobility and NaCl 0,15 mol.l⁻¹ for MATS method).

Microelectrophoresis : Microbial cells electrophoretic mobility was measured as a function of pH in the range 2-9 by addition of KOH or HNO₃. Measurements were realised under an electrical field of 50 Volts using a laser zetameter (SEPHY, France).

M.A.T.S. (Microbial Adhesion To Solvents) : This method is based on comparing microbial cell affinity to a polar solvent and microbial cell affinity to a nonpolar solvent. The polar solvent can be electron acceptor or electron donor, but both solvents must have similar van der Waals surface tension components. The following pairs of solvents were used : chloroform, electron acceptor solvent, and hexadecane ; and ethyl acetate, electron donor solvent and decane.

2,4 ml of microbial suspension (A₀ ~ 0,8 at 400nm) and 0,4 ml of solvent were strongly shaken during 60 s of manner to form an emulsion. After 15 min. of settling, optical density of the aqueous phase was measured (A₁). The percentage of bound cells was determined by the following relationship : % Affinity = 100 x [1 - (A₁/A₀)].

Statistical analysis. A principal component analysis was performed by using Statgraphics Plus for Windows (Manugistic, Rockville, Md).

RESULTS:

Growth Conditions	Stock	Time	Pa A22				Sa 53154				Lm 103 575				Lm 129P			
			Chl	Hx	Dc	A.E	Chl	Hx	Dc	A.E	Chl	Hx	Dc	A.E	Chl	Hx	Dc	A.E
TSA	4°C	0	74	1,6	0,2	26,9	98	63,7	60,7	12,8	80	49,8	52,5	36,4	91,9	61,3	58,2	54,7
		1	70,4	0,8	0,1	26,2	97,8	76,9	78,6	39,7	90,2	55,8	55,3	33,5	88,7	60,2	53,1	46,2
		2	66,4	4,9	2,6	24,2	97,2	74,5	74,4	56,1	89,7	54,4	59,2	27,9	79,4	59,4	54,8	51,7
	-80°C	0	73,7	2,6	1,9	26,6	96,4	59,6	67,3	8,4	76,5	53,4	58,2	36,3	89,5	67	66,3	36,6
		1	70,7	2,9	1,5	25	97,6	69,1	76,7	35,1	85	54,1	56,9	34,2	94	75,1	72,3	30,3
		2	68,4	7,3	6,2	25,4	98	75,9	73,8	51,4	87,9	58,7	59,4	28,4	84,1	64	54,2	42,4
TSB	4°C	0	83,7	0,3	0	28,9	93,8	47,6	60	2,1	78,5	43	42,9	20,6	81,5	50,8	47,1	60
		1	79,4	2	0,4	32,8	98	66,2	75,5	4,4	78,9	49	48,1	23,4	73,1	40,5	34,5	38,6
		2	83,8	5,8	2,6	25,6	96,1	61,3	62,4	9,8	82,5	43,8	44,7	20,2	62,9	26	22,9	34,9
	-80°C	0	83	0	0	30,6	96,6	44,9	68,8	0,6	73,3	40,1	42,8	19,2	82	53,7	48,8	49,2
		1	80,7	1,1	0,1	28,5	98,2	67,9	72,1	12	81,7	45,6	49	16,8	76,4	46,6	39,8	32,5
		2	74,4	3,7	1,3	26	96,2	58,2	69,6	7,7	93,3	62,7	62,5	20	77,8	46,4	42,5	35

Table 1 : Affinity of each bacterial strain to the solvents (MATS test) as a function of conservation and growth conditions (Chl: Chloroform; Hx : Hexadecane; Dc: Decane and AE : Ethyl Acetate)

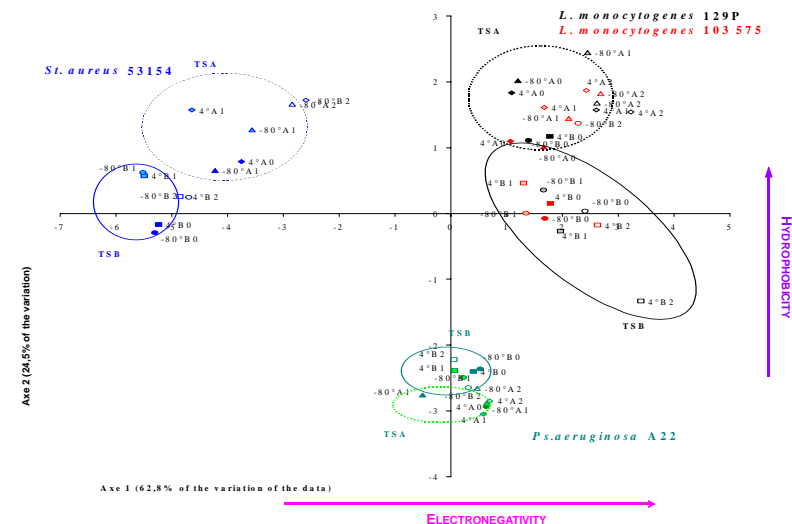


Fig. 2: Principal Component Analysis. The first axis was closely related with microbial cell affinity to chloroform and with electronegativity of bacteria; and inversely connected with microbial cell affinity for ethyl acetate. The second axis is related with hydrophobicity of cell surface.

CONCLUSION:

In our experimental conditions, each bacterial specie has physico-chemical surface properties different from the others. Storage conditions seem to have little influence on these surface properties of *Ps. aeruginosa* A22; on the other hand, growth conditions had an impact on cell hydrophobicity.

Dispersion of the results obtained for the Gram positive strains indicates that the factors studied seem to have an important influence on physico-chemical surface properties of these strains. Grown on TSA, bacterial cells appear more hydrophobic than in TSB. Moreover, those surface characteristics evolve with the storage conditions. The results of this study have shown that bacterial storage at 4°C shouldn't have to be used for long time conservation, unlike storage at -80°C. Moreover, the different physico-chemical surface properties of the strains, as a function of growth conditions, could indicate various adhesion behaviour on surfaces.

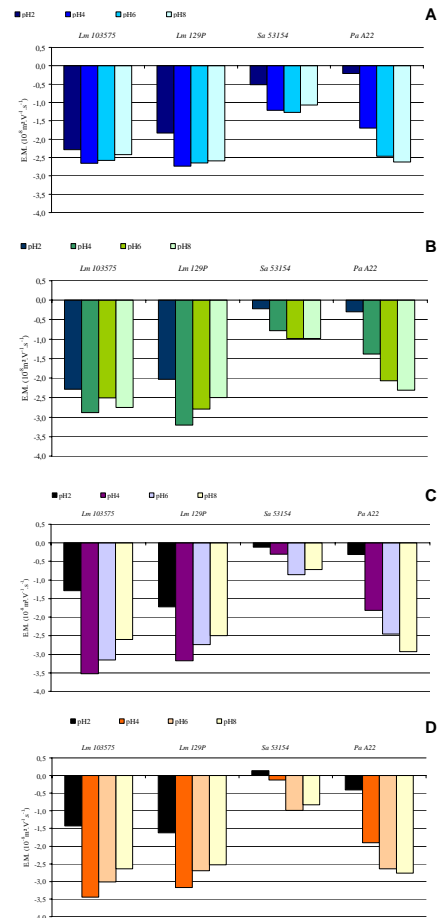


Fig. 1 : Electrophoretic mobility of cells grown on TSA at T0 of conservation at 4°C (A) and -80°C (B) and grown in TSB at T0 of conservation at 4°C (C) and -80°C (D) .

PLANKTONIC / SESSILE BACTERIA: IMPACT OF STORAGE AND GROWTH PROTOCOLS ON CELL SENSITIVITY TO DISINFECTANTS.

A. ALLION^{1,2}, F. DURAND², J. CRIQUELION², G. RAUWEL², M.-N. BELLON-FONTAINE¹

⁽¹⁾ INRA - Unité de recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, 25, avenue de la République F-91744 Massy Cedex, France

⁽²⁾ Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes², France

AIM OF THE STUDY

To compare the efficiency of disinfectants on planktonic or sessile pathogenic bacteria grown under different experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

•Bacterial strains

S. aureus CIP 53154 (S1) and *Ps. aeruginosa* A22 (P1) were provided by Institut Pasteur (France), while *S. aureus* 221 (S2) and *Ps. aeruginosa* 222 (P2) were clinical isolates.

•Storage and growth conditions

For each of these strains, and in accordance with the NF EN 12353 standard, two storage conditions were applied, one at -80°C in cryoprotective solution and the other at 4°C on TSA (Biomérieux, France).

Bacterial cultures on solid agar were obtained after three successive inoculations for 24 hours at 37°C on agar in a sloping position (TSA) of the stock at 4°C. For cultures in a liquid medium (TSB) (Biomérieux, France), two pre-cultures of 24 hours and 8 hours of the cells stored at -80°C were done before a final inoculation at a rate of 1% (v/v) at a temperature of 37°C. All experiments were performed on cells in the stationary phase of growth.

- Bacterial suspensions

Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 7000g at 4°C, and then washed twice with and re-suspended in NaCl 1.5 × 10⁻¹ mol.l⁻¹. Microbial suspensions were diluted to obtain a cell concentration of approximately 1.5 to 3 × 10⁸ CFU/ml. Bacterial

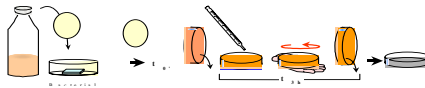
•Adhesion test

- Solid surface preparation

Samples of stainless steel AISI 316 (Goodfellow, UK) were soaked for 15 minutes in a 2% (v/v) of a commercial RBS 35 detergent (Société des Traitements Chimiques de Surface, France), rinsed five times for 5 minutes in tap water and then rinsed five times for 5 minutes in demineralized water.

- Microbial adhesion experiments

Solid surfaces were immersed in 25 ml of bacterial suspension and adhesion assays were performed by sedimentation for 3 hours at 20°C. To remove non-adherent bacteria, the surface were rinsed five times in NaCl 1.5 × 10⁻¹ mol.l⁻¹.



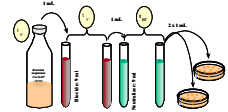
•Disinfection test

- Bactericidal compounds

Biocides chosen were peracetic acid (PAA), didecyl-dimethylammonium chloride (DDAC) and polyhexamethylene biguanide (PHMB). They were obtained from Laboratoires ANIOS (France).

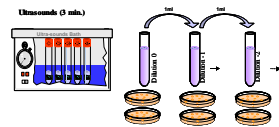
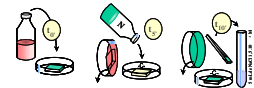
Test on planktonic cells

The assays for determination of the activities of the compounds were performed according to the NF-EN 1040 procedure.



Test on sessile cells

The assays for determination of the activities of the compounds were performed according to a protocol adapted from the NF-EN 1040 procedure.



RESULTS

Strains	Media	Biocides		
		PAA	DDAC	PHMB
<i>S. aureus</i> 53154	TSA	8	20	80
	TSB	8	20	ND
<i>S. aureus</i> 221	TSA	10	10	80
	TSB	16	20	20

Table I :CMB (ppm) of disinfectants on suspensions of *S. aureus* strains

Strains	Media	Biocides		
		PAA	DDAC	PHMB
<i>Ps. aeruginosa</i> A22	TSA	4	20	20
	TSB	4	10	10
<i>Ps. aeruginosa</i> 222	TSA	4	5	400
	TSB	8	10	40

Table II :CMB (ppm) of disinfectants on suspensions of *Ps. aeruginosa* strains

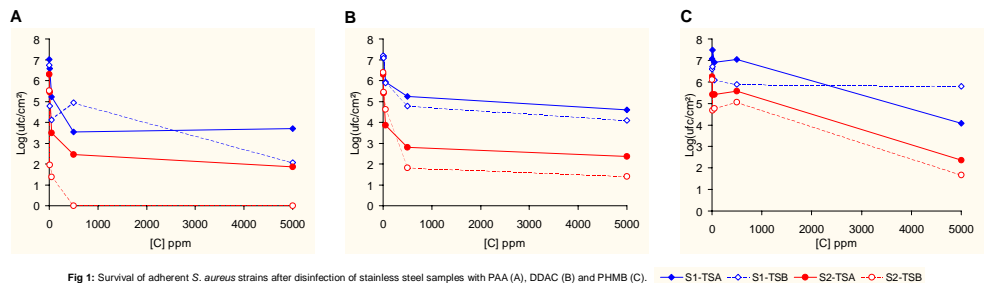


Fig 1: Survival of adherent *S. aureus* strains after disinfection of stainless steel samples with PAA (A), DDAC (B) and PHMB (C).

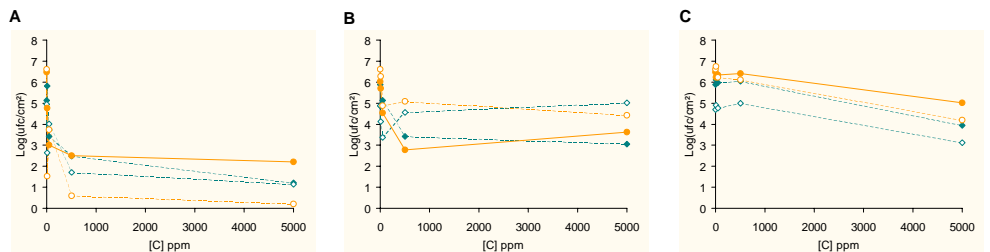


Fig 2: Survival of adherent *Ps. aeruginosa* strains after disinfection of stainless steel samples with PAA (A), DDAC (B) and PHMB (C).

CONCLUSION

In this study, we showed that storage and growth conditions may have an impact on bacterial susceptibility to biocide, especially for non-oxidative disinfectants. So, growth conditions, modifying the cell wall components, can influence the number of the targets of the antimicrobial agents and so its activity on planktonic cells. According to previous studies, sessile state of micro-organisms have a strong impact on bactericidal activity of the disinfectants. Even though, the PAA seems to be the more effective on adherent *Pseudomonas* strains, whatever the strain and the storage and growth conditions, we observed an increase of the resistance (100 to 1,000 fold) of the adherent bacteria to the three biocides. Moreover, as planktonic cells, growth conditions can lead variations of the susceptibility of the micro-organisms tested to biocides.

PLANKTONIC / SESSILE BACTERIA: IMPACT OF STORAGE AND GROWTH PROTOCOLS ON CELL SENSITIVITY TO DISINFECTANTS.

A. ALLION^{1,2}, F. DURAND², J. CRIQUELION², G. RAUWEL², M.-N. BELLON-FONTAINE¹

⁽¹⁾INRA - Unité de recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, 25, avenue de la République F-91744 Massy Cedex, France—⁽²⁾Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes², France

THE AIM OF THE STUDY was to compare the efficiency of disinfectants on planktonic or sessile pathogenic bacteria grown under different storage and growth conditions.

MATERIALS AND METHODS

•Bacterial strains

S. aureus CIP 53154 (S1), *L. monocytogenes* 103575 (L1) and *Ps. aeruginosa* CIP A22 (P1) were provided by Institut Pasteur (France), while *S. aureus* 221 (S2) and *Ps. aeruginosa* 222 (P2) were clinical isolates and *L. monocytogenes* 177 (L2) was food plant isolate.

•Storage and growth conditions

For each of these strains, and in accordance with the NF EN 12353 standard, two storage conditions were applied, one at -80°C in cryoprotective solution and the other at 4°C on TSA (Biomérieux, France). Bacterial cultures on solid agar were obtained after three successive inoculations for 24 hours at 37°C on agar in a sloping position (TSA) of the stock at 4°C. For cultures in a liquid medium (TSB) (Biomérieux, France), two pre-cultures of 24 hours and 8 hours of the cells stored at -80°C were done before a final inoculation at a rate of 1% (v/v) at a temperature of 37°C. All experiments were performed on cells in the stationary phase of growth.

- Bacterial suspensions

Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 7000g at 4°C, and then washed twice with and resuspended in NaCl 1.5 × 10⁻¹ mol.l⁻¹. Microbial suspensions were diluted to obtain a cell concentration of approximately 1.5 to 3 × 10⁸ CFU/ml.

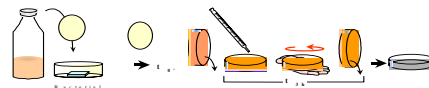
•Adhesion test

- Solid surface preparation

Samples of stainless steel AISI 316 (Goodfellow, UK) were soaked for 15 minutes in a 2% (v/v) of a commercial RBS 35 detergent (Société des Traitements Chimiques de Surface, France), rinsed five times for 5 minutes in tap water and then rinsed five times for 5 minutes in demineralized water.

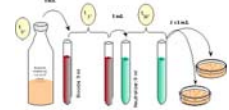
- Microbial adhesion experiments

Solid surfaces were immersed in 25 ml of bacterial suspension and adhesion assays were performed by sedimentation for 3 hours at 20°C. To remove non-adherent bacteria, the surface were rinsed five time in NaCl 1.5 × 10⁻¹ mol.l⁻¹.



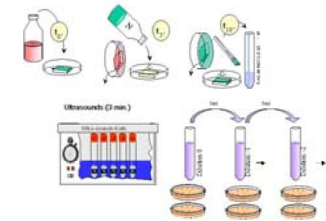
Test on planktonic cells

The assays for determination of the activities of the compounds were performed according to the NF-EN 1040 procedure.



Test on sessile cells

The assays for determination of the activities of the compounds were performed according to a protocol adapted from the NF-EN 1040 procedure.



•Disinfection test

- Bactericidal compounds

Biocides chosen were peracetic acid (PAA), didecyldimethylammonium chloride (DDAC) and polyhexamethylene biguanide (PHMB). They were obtained from Laboratoires ANIOS (France).

RESULTS

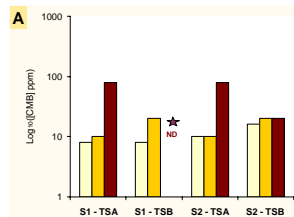


Fig 1: Log₁₀(MBC) of each disinfectant (symbols) for *S. aureus* suspensions

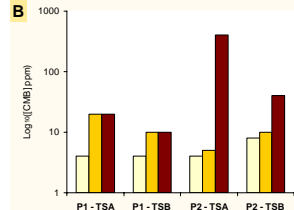


Fig 2: Log₁₀(MBC) of each disinfectant (symbols) for *Ps. aeruginosa* suspensions

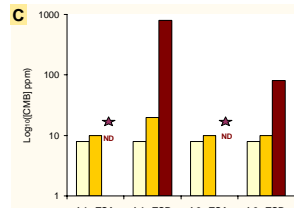


Fig 3: Log₁₀(MBC) of each disinfectant (symbols) for *L. monocytogenes* suspensions

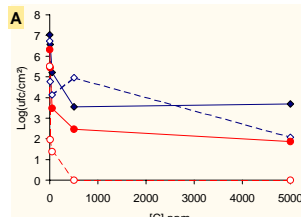
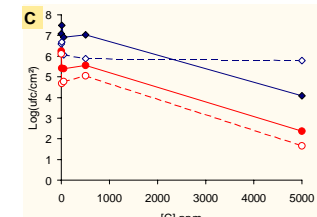
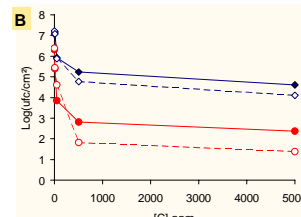


Fig 4: Survival of adherent *S. aureus* strains after disinfection of stainless steel samples with PAA (A), DDAC (B) and PHMB (C).



Legend: S1-TSA (solid blue), S1-TSB (dashed blue), S2-TSA (solid red), S2-TSB (dashed red)

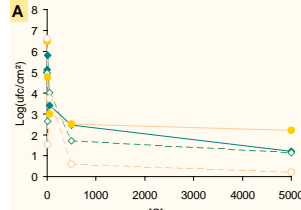
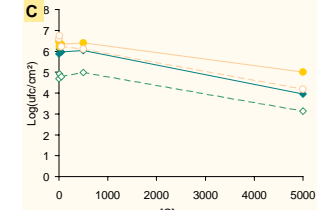
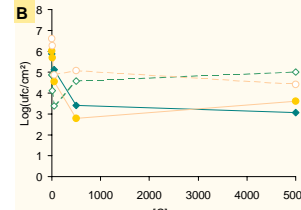


Fig 5: Survival of adherent *Ps. aeruginosa* strains after disinfection of stainless steel samples with PAA (A), DDAC (B) and PHMB (C).



Legend: P1-TSA (solid blue), P1-TSB (dashed blue), P2-TSA (solid red), P2-TSB (dashed red)

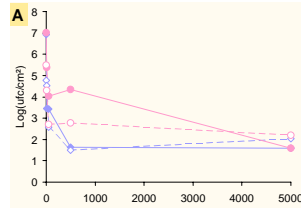
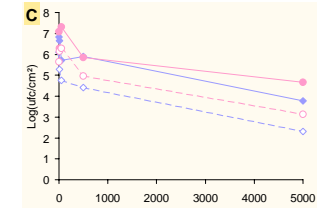
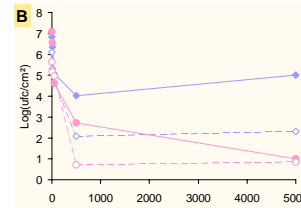


Fig 6: Survival of adherent *L. monocytogenes* strains after disinfection of stainless steel samples with PAA (A), DDAC (B) and PHMB (C).



Legend: L1-TSA (solid blue), L1-TSB (dashed blue), L2-TSA (solid red), L2-TSB (dashed red)

CONCLUSION

In this study, we showed that storage and growth conditions may have an impact on bacterial susceptibility to biocide, especially for non-oxlydative disinfectants. So, growth conditions, modifying the cell wall components, can influence the number of the targets of the antimicrobial agents and so its activity on planktonic cells.

According to previous studies, sessile state of micro-organisms have a strong impact on bactericidal activity of the disinfectants. Even though, the PAA seems to be the more effective on adherent *Pseudomonas* strains, whatever the strain and the storage and growth conditions, we observed an increase of the resistance (100 to 1,000 fold) of the adherent bacteria to the three biocides. Moreover, as planktonic cells, growth conditions can lead variations of the susceptibility of the micro-oranisms tested to biocides.

Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides - Mise au point d'une technique rapide pour déterminer *in situ* l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens -

Résumé : La maîtrise de l'hygiène des surfaces demeure une préoccupation constante dans de nombreux secteurs d'activité. En effet, la contamination microbiologique des surfaces peut être à l'origine de problèmes de santé publique plus ou moins sévères dans les industries agro-alimentaires (toxi-infections alimentaires) ou le milieu médical (infections nosocomiales). L'efficacité des agents désinfectants restant variable d'une application à l'autre (notamment sur des micro-organismes adhérent), il s'avère nécessaire d'améliorer les formulations désinfectantes et/ou les procédures de désinfection qui y sont associées. Cette amélioration passe par la mise en place de méthodes tests permettant d'évaluer rapidement l'activité antimicrobienne de produits commercialisés ou non, dans des conditions proches de la réalité. Ainsi, au cours de ce travail, nous avons défini un protocole pour déterminer l'activité létale des produits désinfectants sur cellules adhérentes, protocole composé de quatre étapes principales : *i*) choix des micro-organismes et standardisation de leurs conditions de conservation et de croissance, *ii*) mise en place d'un protocole d'adhésion reproductible sur supports conditionnés ou non, *iii*) test de désinfection sur cellules adhérentes et *iv*) optimisation de ce protocole dans le caractère *in situ* et le délai d'obtention des résultats par l'utilisation de marqueurs fluorescents, indicateurs de la viabilité cellulaire.

Mots-clé : Conditions de conservation et de croissance, bioadhésion, désinfection, viabilité cellulaire, épifluorescence

Bacterial environment and susceptibility to the disinfectants – setting a rapid technic to determine, *in situ*, the lethal efficiency of antimicrobial agents -

Summary : Controlling the hygiene status of surfaces remains a constant concern in different areas. Indeed, the biofouling of surfaces can be a source of dramatic public health problems in food industries (food toxi-infections) or in hospitals (nosocomial infections). The efficiency of biocides remains variable from one application to the others, (especially on adherent micro-organisms), it is necessary to improve the disinfectant formula and/or the associated procedures of disinfection. This improvement involves new test methods that allow rapid assessment of the antibacterial activity of marketed or not products, in conditions closed to the reality. So, through this work, we defined a protocol to determine lethal activity of biocides on sessile bacteria, protocol made up of four principal steps: *i*) selection of micro-organisms and standardisation of their storage and growth conditions, *ii*) setting a reproducible adhesion protocol of bacteria on soiled or not surfaces, *iii*) disinfection test on sessile micro-organisms and *iv*) optimisation of this protocol for *in situ* observations and reducing the time needed to obtain results by employing fluorescent markers which give indications on cellular viability.

Key-words : Storage and growth conditions, bioadhesion, disinfection, cellular viability, epifluorescence