

CROISSANCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN BIOFILM EN FONCTION DE LA SURFACE ET DE LA TEMPERATURE ET EFFETS DE DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LA SURVIE

P. CHAVANT¹ et M. HEBRAUD^{1,2}

Station de Recherches sur la Viande – Microbiologie¹, Plate forme protéomique², INRA de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle

Les études en laboratoire sur les bactéries sont généralement effectuées à partir de cultures planctoniques, en milieu liquide. Hors, dans les environnements naturels, plus de 90% des microorganismes ont un mode de développement sessile, adhérents à une surface biotique ou abiotique. Ils peuvent alors former des biofilms qui sont des agrégats microbiens entourés d'une matrice d'exopolymères. Sous cette forme, il est connu que les microorganismes sont plus résistants aux agressions extérieures, qu'elles soient environnementales, dues à des traitements de nettoyage désinfection ou par des antibiotiques.

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquitaire qui peut être trouvée dans le sol, les réseaux hydrauliques, sur les végétaux ainsi que dans l'environnement industriel en agro-alimentaire. Cette bactérie peut également être présente dans le tractus intestinal des animaux et de l'homme sous forme de portage asymptomatique. Ce germe est l'agent causal de la listériose, une infection d'origine alimentaire qui peut être très grave pour les populations à risque (personnes âgées, femmes enceintes, nourrissons, immunodéprimés). Bien que la fréquence des cas de listériose ait diminué grâce aux efforts des industriels de la filière alimentaire et la mise en place d'un système de surveillance efficace, le risque sanitaire reste important. Ainsi, au cours de l'année 1999, deux cent soixante dix cas ont été signalés en France (1) avec un taux de mortalité de 23 %. Pour l'industrie agroalimentaire, les conséquences économiques liées à une crise alimentaire de listériose sont dramatiques car outre le manque à gagner direct dû au retrait et à la destruction du produit incriminé, les pertes indirectes liées à la détérioration de l'image de marque du produit peuvent être fatales à l'entreprise.

En culture pure, *L. monocytogenes* est capable de former des biofilms sur des surfaces abiotiques très variées telles que l'acier inoxydable, le verre, ou le Téflon™ (2-6). Dans les ateliers de production et de transformation des produits alimentaires, *L. monocytogenes* peut être isolé au sein de biofilms plurimicrobiens constitués sur les surfaces des équipements. Il représente ainsi une source potentielle de (re)contamination des produits.

Le but de notre travail était d'une part d'évaluer la capacité à former des biofilms en fonction des propriétés de surface de la bactérie et du support d'adhésion et, d'autre part, de comparer la résistance de *L. monocytogenes* à des traitements appliqués à différents stades de croissance en mode planctonique ou sessile.

Les propriétés physico-chimiques de surface jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries. Aussi, ces propriétés ont été caractérisées par deux méthodes : la zétamétrie (mobilité électrophorétique) et la MATS (Microbial Adhesion To Solvents) (7). Elles ont montrées que la souche *L. monocytogenes* LO28 utilisée possédait une charge globale de surface toujours négative avec très peu de variation en fonction des pH (pH 2 à 7), des températures (37°, 20° et 8°C) ou des stades physiologiques testés (phase exponentielle et stationnaire de croissance). Par ailleurs, la souche présentait une tendance hydrophile, due à un caractère basique prononcé, qui s'amplifiait avec l'abaissement de la température. Le caractère hydrophile de la souche permet de penser que les bactéries peuvent adhérer de façon plus importante à des surfaces hydrophiles telles que l'acier inoxydable ou le verre qu'à des surfaces hydrophobes comme le PTFE ou le PVC, et ce, d'autant plus que la température est basse.

Afin de vérifier cette hypothèse, *L. monocytogenes* LO28 a été cultivée à 37°, 20° et 8°C sur deux types de surfaces, l'acier inoxydable et le PTFE (Téflon™). La croissance en biofilms a été suivie au cours du temps par dénombrement des bactéries adhérentes, par microscopie à épifluorescence afin d'évaluer le taux de recouvrement des surfaces et par microscopie à balayage. Des lames d'acier inoxydable ou de PTFE étaient submergées pendant 2 h par une culture bactérienne, puis elles étaient rincées afin d'éliminer les bactéries non adhérentes, et recouvertes par du milieu stérile qui était renouvelé quotidiennement. Les dénombrements et les différentes observations ont révélées : (i) l'absence de matrice car la souche produisait très peu de polymères exo-cellulaires, (ii) un biofilm avec une structure tridimensionnelle importante qui se développait en quelques heures sur les deux types de surface à 37°C et des phénomènes de décrochements d'agrégats cellulaires qui intervenaient sur PTFE après quelques jours, (iii) une colonisation légèrement moins rapide des 2 surfaces à 20°C avec la formation d'un réseau

tridimensionnel au bout de 2 j sur acier et 3-5 j sur PTFE mais pas de décrochements même après 7 j, (iiii) une colonisation très lente de l'acier inoxydable à 8°C par des cellules allongées avec la formation de quelques agrégats après 7 j et une adhésion mais sans colonisation du PTFE à basse température avec même des décrochements de cellules après 1-2 j.

Ces résultats ont permis de démontrer que *L. monocytogenes* LO28 était capable de se développer et de former des biofilms aussi bien sur une surface hydrophile que sur une surface hydrophobe. La colonisation était cependant plus rapide et la stabilité des biofilms meilleure sur l'acier inoxydable, ce qui est en accord avec les propriétés hydrophiles de la souche. Les décrochements observés sur PTFE à 37°C pouvaient être dû à des interactions trop faibles avec le support d'un petit nombre de bactéries à la base des agrégats volumineux. A 20°C, la colonisation plus lente et la présence de flagelles laisse supposer une meilleure adhésion et donc une plus grande stabilité de la structure tridimensionnelle des biofilms. Il était particulièrement intéressant de constater qu'à 8°C, la colonisation de la surface hydrophile était fortement ralentie mais surtout qu'elle était nulle sur la surface hydrophobe, très probablement en raison de l'augmentation du caractère hydrophile de la souche à basse température.

Dans la perspective d'une production massive de biofilms de *L. monocytogenes* à des fins d'études physiologique et moléculaire, les conditions utilisées sur acier inoxydable à 20°C offrent d'excellentes possibilités avec une biomasse de 2×10^8 cfu/cm². D'un point de vue pratique, l'utilisation de surfaces hydrophobes, telle que le PTFE, dans des conditions de basses températures permet de minimiser le développement de cette bactérie dans les ateliers de production et transformation des produits alimentaires.

La deuxième partie de cette étude a consisté à tester la résistance à des traitements de *L. monocytogenes* à différents stades de croissance en mode planctonique ou sessile. Ces traitements étaient appliqués sur des bactéries en phase exponentielle ou stationnaire de croissance en milieu liquide et sur des bactéries sessiles après 6 h, 1 j et 7 j d'adhésion sur l'acier inoxydable. Ces différents traitements consistaient en l'application pendant 30 min de solutions d'acide acétique (pH 5.0, $1,8 \cdot 10^{-4}$ mol/l), de NaOH (pH 12.0, 0,009 mol/l), de Na₂SO₄ (10 %), d'ammonium quaternaire (20 ppm) ou de monolaurine (75 ppm). La survie était évaluée par étalement sur boîte gélosée à l'aide d'un enseigneur spiral.

L. monocytogenes est apparue très résistante à l'acide acétique, au sel ainsi qu'à la monolaurine quel que soient les conditions de croissance étudiées. Par contre, un traitement alcalin, alcalin combiné avec le sel ou l'application de l'ammonium quaternaire affectaient la viabilité des cellules. Pour ces trois traitements, les cellules planctoniques en phase exponentielle de croissance étaient toujours les plus sensibles ($\Delta \log$ de 4 à 8). La résistance des cellules en biofilms lors des chocs alcalin et alcalin/salin diminuait un peu avec l'âge ($\Delta \log$ de 0.7 et 0.68 à 6 h et de 2.6 et 1.6 à 7 j, respectivement). Lors de ces 2 traitements, les cellules planctoniques en phase stationnaire montraient une résistance équivalente à des biofilms âgés.

Par contre, le traitement à l'ammonium quaternaire avait un effet plus marqué sur les cellules planctoniques en phase stationnaire ($\Delta \log$ de 4.8) que sur les cellules sessiles, ces dernières étant d'autant plus résistantes avec l'âge ($\Delta \log$ de 2.3, 1.9 et 0.3 à 6 h, 1 j et 7 j, respectivement).

La comparaison des différents traitements sur des biofilms âgés de 7 j dont le milieu de culture était renouvelé quotidiennement ou non, n'a pas fait apparaître de différences significatives sur les taux de mortalité des cellules. Par contre, la population adhérente traitée était inférieure de 2 logs lorsque le milieu n'était pas renouvelé pendant 7 j.

Ces résultats confirment que le mode de développement et le stade de croissance sont des paramètres importants à considérer pour l'application de traitements de nettoyage désinfection et que certains de ces traitements n'ont que peu d'effet létal sur les cellules de *L. monocytogenes*.

Références bibliographiques :

1. Goulet, V., Jacquet, C., Laurent, E., Rocourt, J., Vaillant, V. and H. Valk. 2001. Bull. Epidémiol. Hebdom., **34**:161-165.
2. Blackman, I. C. and J. F. Frank. 1996. J. Food Protect. **59**:827-831.
3. Chae M.S. and H. Schraft. 2000. Int. J. Food Microbiol. **62**:103-111.
4. Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N. and M. Hébraud. 2002. Appl. Environ. Microbiol., **68**:728-37.
5. Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.D., Sanders G., Banerjee S. and J.M. Farber. 2001. J. Appl. Microbiol., **91**:725-34.
6. Mafu, A. A., D. Roy, J. Goulet, and P. Magny. 1990. J. Food Protect. **53**:742-746.
7. Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. and C.J. Van Oss. 1996. Colloids Surf. B: Biointerfaces, **7**:47-53.