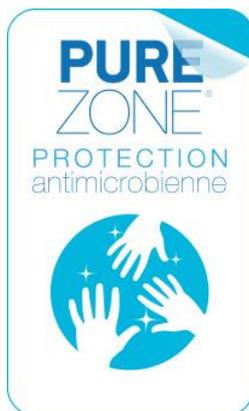




Prévention des crises alimentaires par une hygiène augmentée. Les supports en mode autodéfense





Biofilms: des microorganismes résistant aux procédures d'hygiène



Christine Pissavin

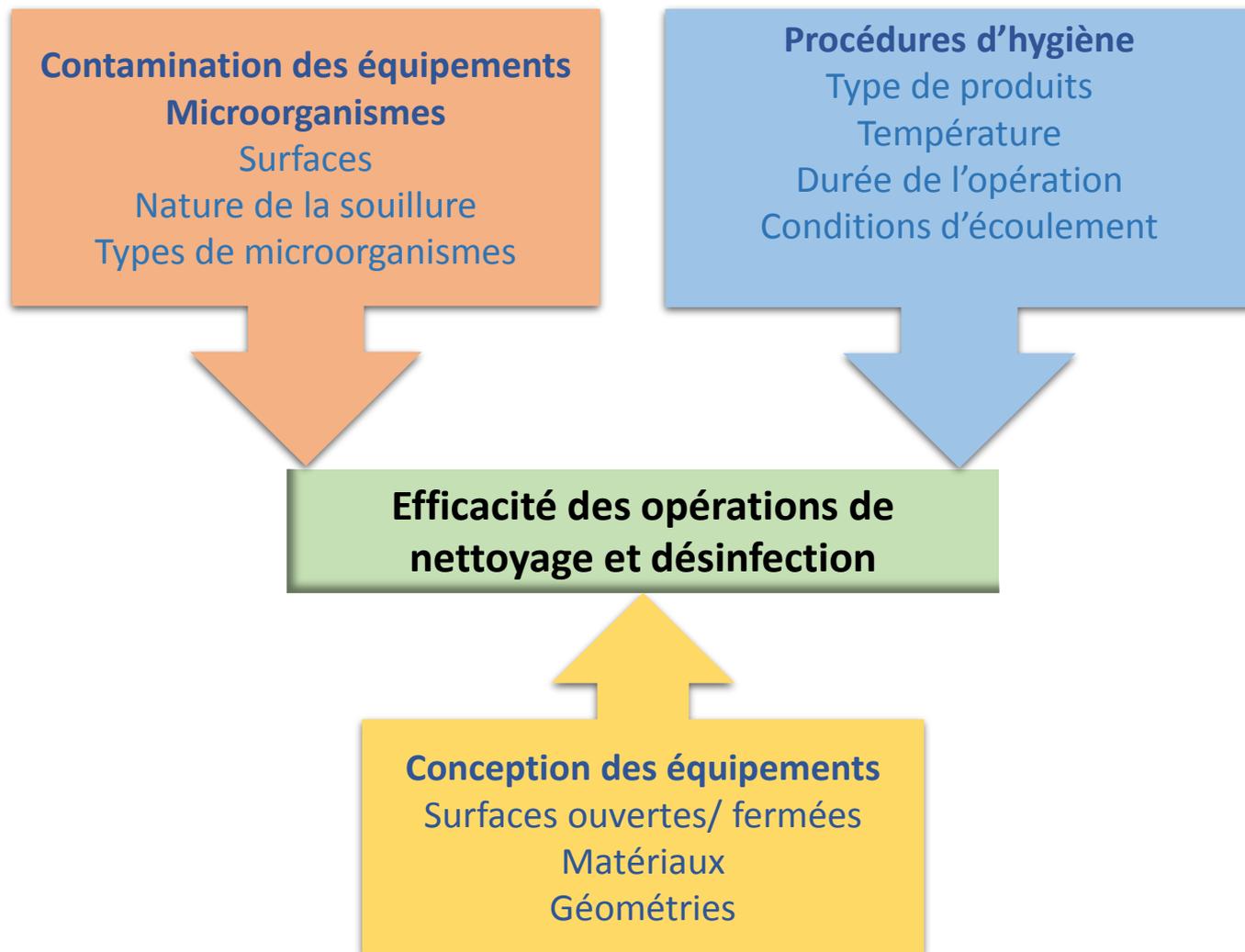
IUT de Saint-Brieuc-Université Rennes 1



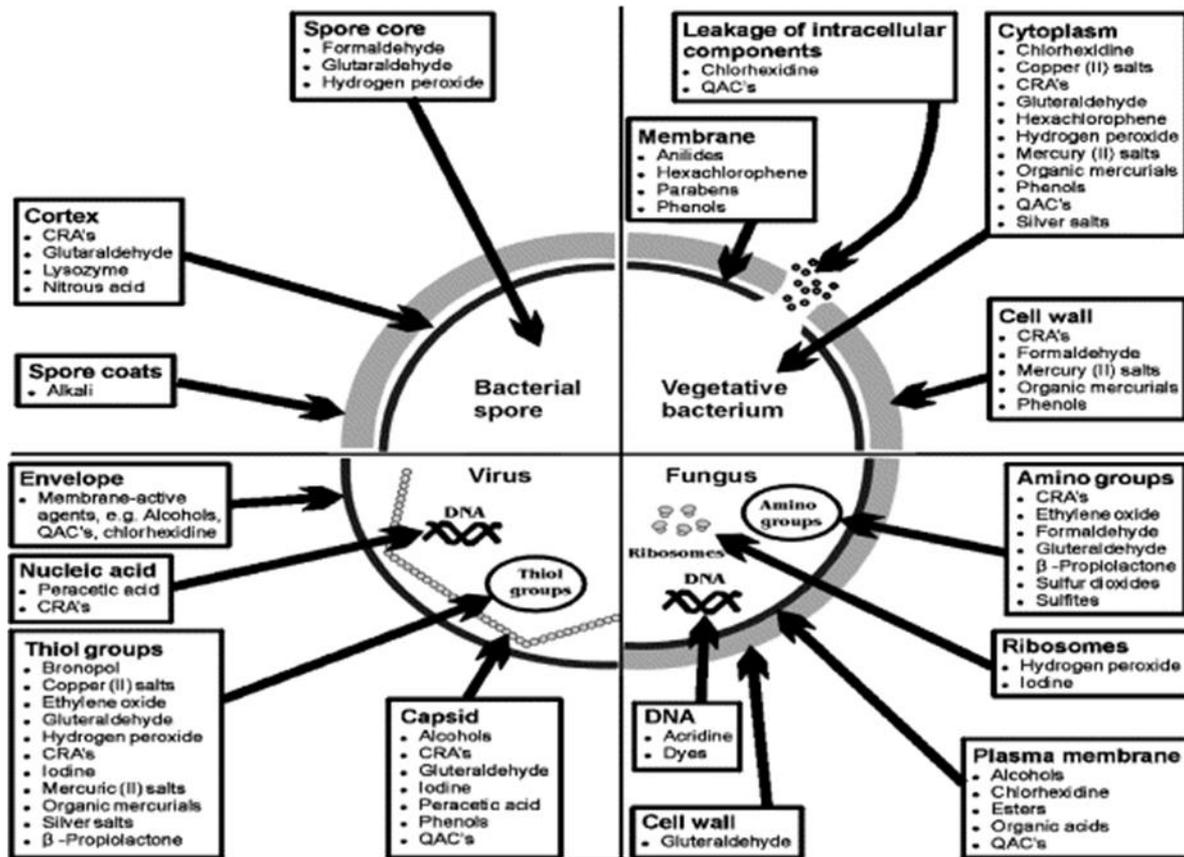
Journée technique - Prévenir les crises alimentaires par une hygiène augmentée - ISPAIA- 2 Avril 2019



Les procédures d'hygiène

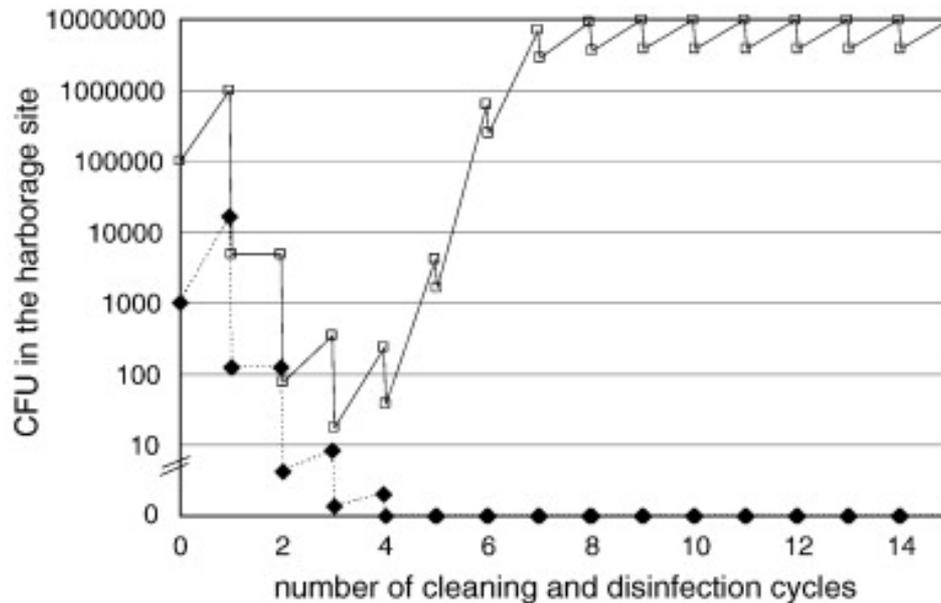


Les cibles des biocides



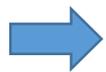
Mécanisme d'inactivation de microorganismes et de virus par les biocides (d'après Russel *et al.*, 1997)
CRA's : Chlorine releasing agents, QAC's : Quaternary ammonium compounds

Evolution de la flore bactérienne



Mesure d'hygiène inefficace

Mesure d'hygiène efficace



Flore résiduelle après nettoyage et désinfection

Les raisons des limites de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection



Biocides

Structure
chimique

Concentration

Temps de contact

Formulation

Environnement

Cellules isolées /
biofilms

Physiologie

Stress multiples /
chaîne de production

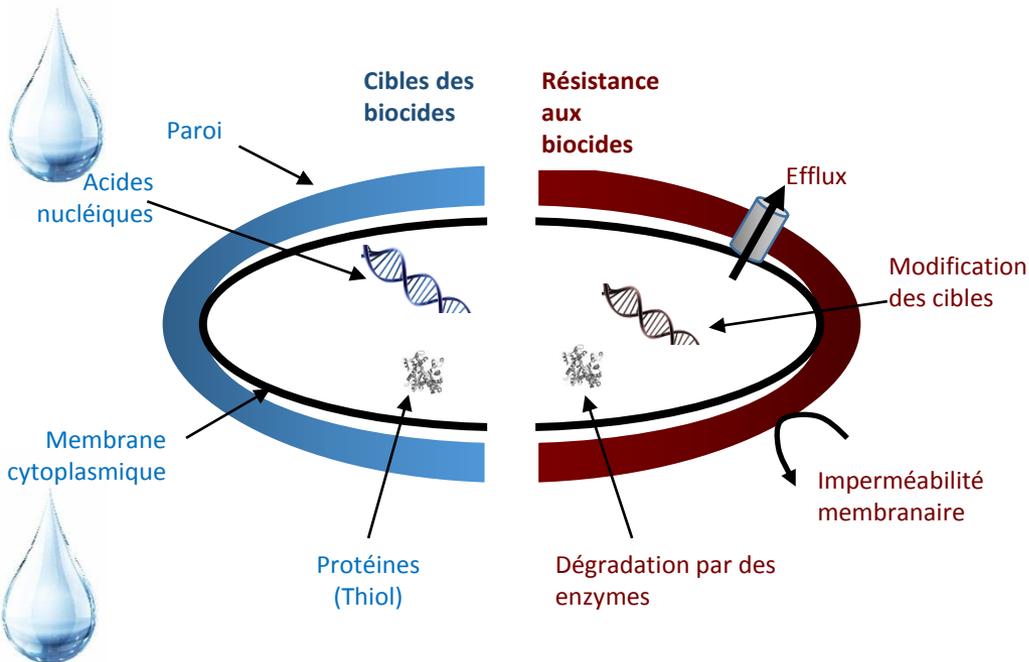
Eau résiduelle

Présence de jus,
exsudats, matières
grasses ...

Température

Microorganismes

Les mécanismes de résistance aux biocides et leurs conséquences



Mécanismes	Nature	Niveau de sensibilité aux autres biocides ¹	Résistance-croisée
Perméabilité membranaire	Intrinsèque / acquise	Non	Oui
Efflux	Intrinsèque / acquise	Réduit	Oui
Dégradation	Acquise / intrinsèque	Réduit	Non
Mutation avec modification de la cible	Acquise	Réduit	Non ²
Changement phénotypique	Après exposition	Réduit	Oui
Induction réponse aux stress	Après exposition	Variable	Oui

¹ aux autres biocides - niveau de sensibilité défini selon la concentration de biocides

² pas aux autres biocides, mais résistance croisée avec des antibiotiques spécifiques

D'après SCENHIR, 2008

➔ Résistance croisée avec les antibiotiques

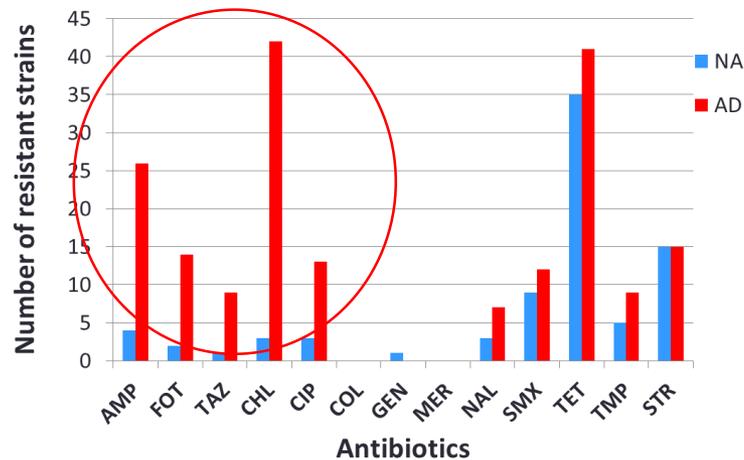
Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds

C. Soumet¹, D. Méheust², C. Pissavin², P. Le Grandois¹, B. Frémaux³, C. Feurer³, A. Le Roux³, M. Denis⁴ and P. Maris¹

Species (N° of strains)	DDAC (%)	BC (%)	Galox	NaOCl (%)	H ₂ O ₂ (%)
	Horizon (%)				
<i>Escherichia coli</i> (54)*	≥ 3 (48) †	≥ 3 (22)	≥ 3 (65)	< 2 (100)	< 2 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i> (31)	≥ 3 (48)	≥ 3 (45)	≥ 3 (45)	< 2 (100)	< 2 (100)
<i>Salmonella enterica</i> (35)	≥ 3 (10)	≥ 1.5 (40)	≥ 3 (6)	< 1.5 (100)	< 1.5 (100)
<i>Campylobacter coli</i> (16)	2 (31)	3 (31)	3 (31)	< 2 (100)	< 2 (100)

DDAC: didecyl dimethyl ammonium chloride; BC: benzalkonium chloride; NaOCl: sodium hypochlorite; H₂O₂: hydrogen peroxide; Galox Horizon: biocide formulation containing DDAC and glutaraldehyde
 *: number of strains tested for a given species; †: percentage of strains with the biocide MIC increase factor indicated

E. coli



Cellules planctoniques vs biofilm

Physiologie des cellules en biofilm différente de celle des cellules planctoniques



Avantage sélectif

- Modification de la morphologie
- Modifications métaboliques
- Résistance à la dessiccation, aux antibactériens



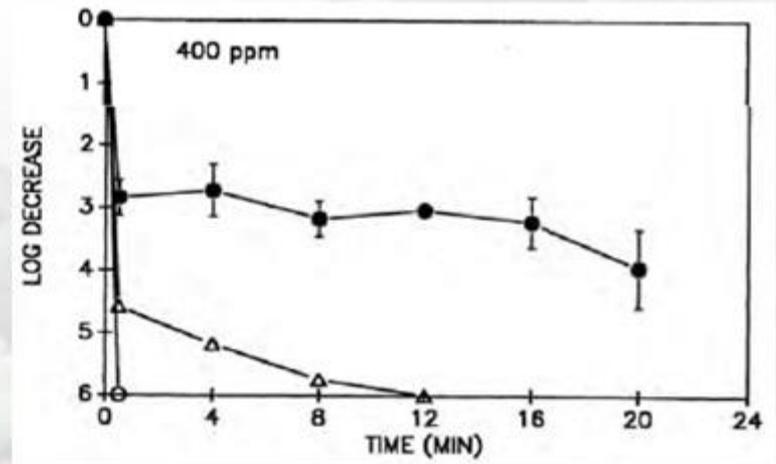
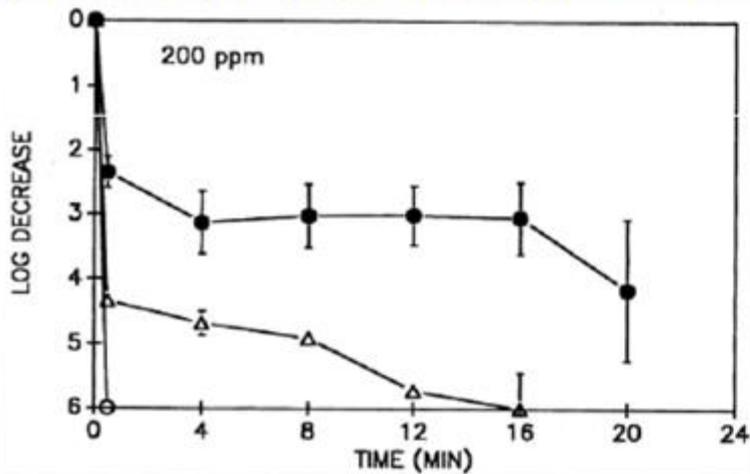
Persistance

Le biofilm: une structure plus résistante aux biocides

Désinfectants	Rapport de concentration efficace entre biofilms et cellules planctoniques
Agent oxydant	5 -600
Ammonium quaternaire	10-1000

Dubois-Brissonet *et al.*, 1995; Ntsama-Essomba *et al.*, 1997; Campanac *et al.*, 2002, Luppens *et al.*, 2002)

Activité du chlorure de benzalkonium sur *Listeria monocytogenes* à l'état planctonique (○), adhérent (△) et en biofilm (●).



Frank and Koffi, 1990

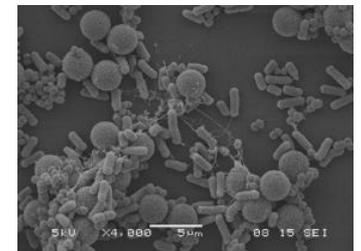
Le biofilm

- Communauté de microorganismes adhérant à une surface, protégés par une matrice de substances polymériques extracellulaires.

(Costerton *et al.*, 1995)



- Ubiquitaires
- Sur de nombreux matériaux (inox, téflon...)
- Favorisé par l'humidité
- Différents selon les bactéries
- Multiespèces => stabilité



Biofilms dans l'environnement

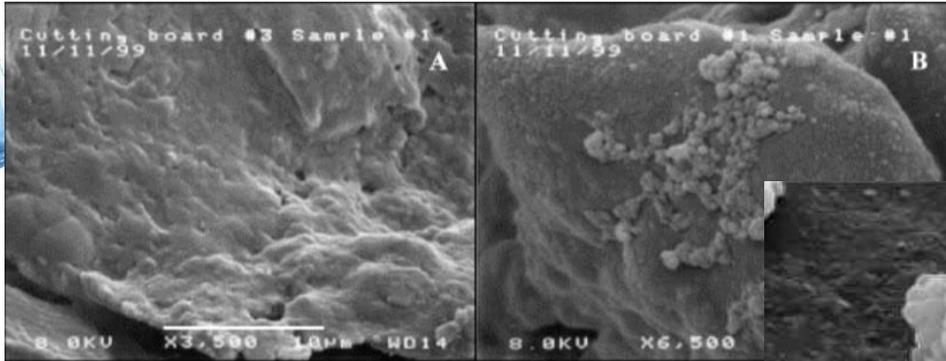
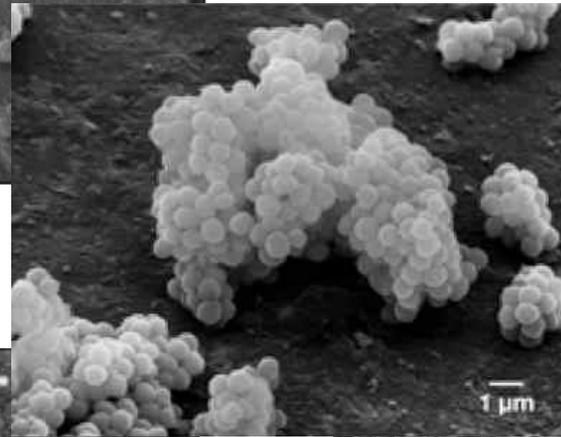
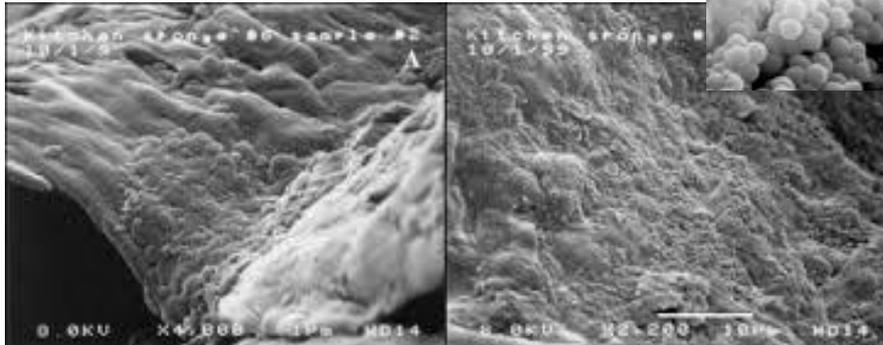


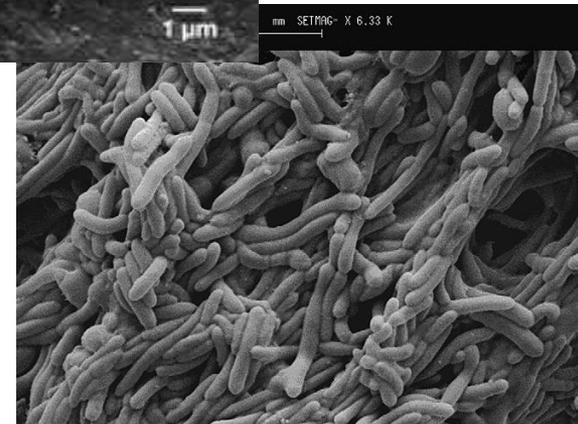
Planche de découpe



Tapis de convoyage
(*Staphylococcus sciuri*) photo G.
Bourdin



Biofilms sur feuille de salade



Bacillus cereus sur inox

Facteurs influençant le développement des biofilms



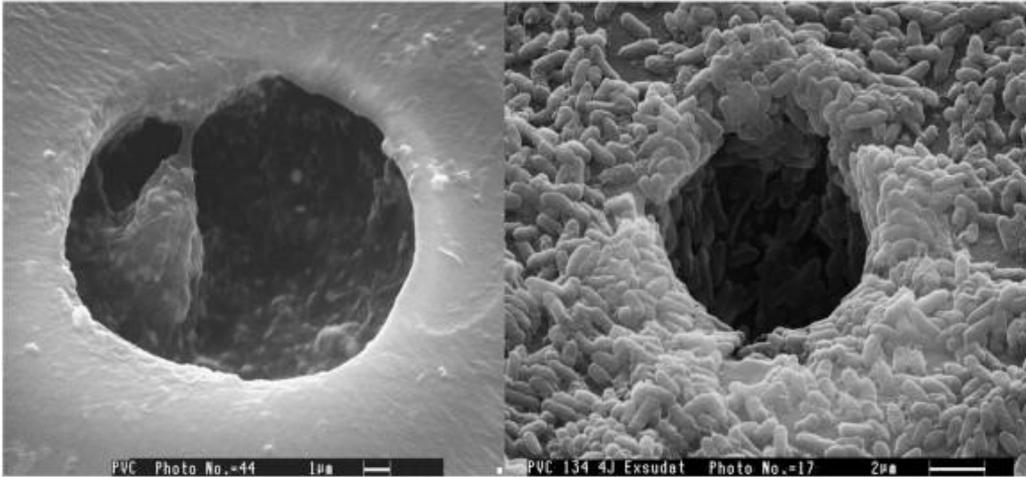
Tout type de surface

Surface	Fluide	Cellules microbiennes
Topographie	Vitesse d'écoulement	Hydrophobicité de surfaces
Tension de surface (charges)	pH	Charges de surfaces
Chimie de surface	Température	EPS
Hydrophobicité	Nutriments disponibles	Molécules Signal (Quorum sensing)
Anfractuosités	Présence de composés antimicrobiens	
Film conditionnant		

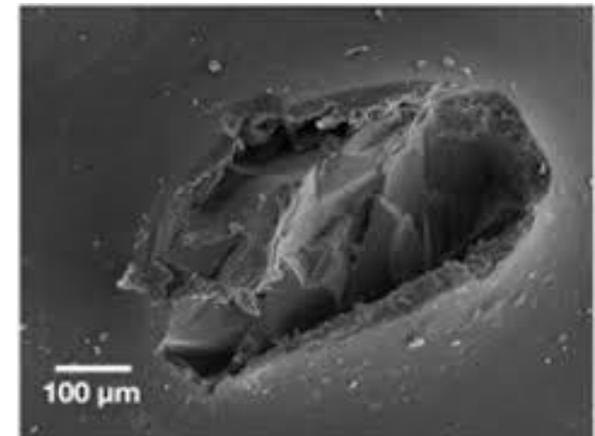


D'après Donlan et *al.*, (2002) Emerg Infect Dis. 8: 881–890.

Facteurs de risque pour le développement des biofilms



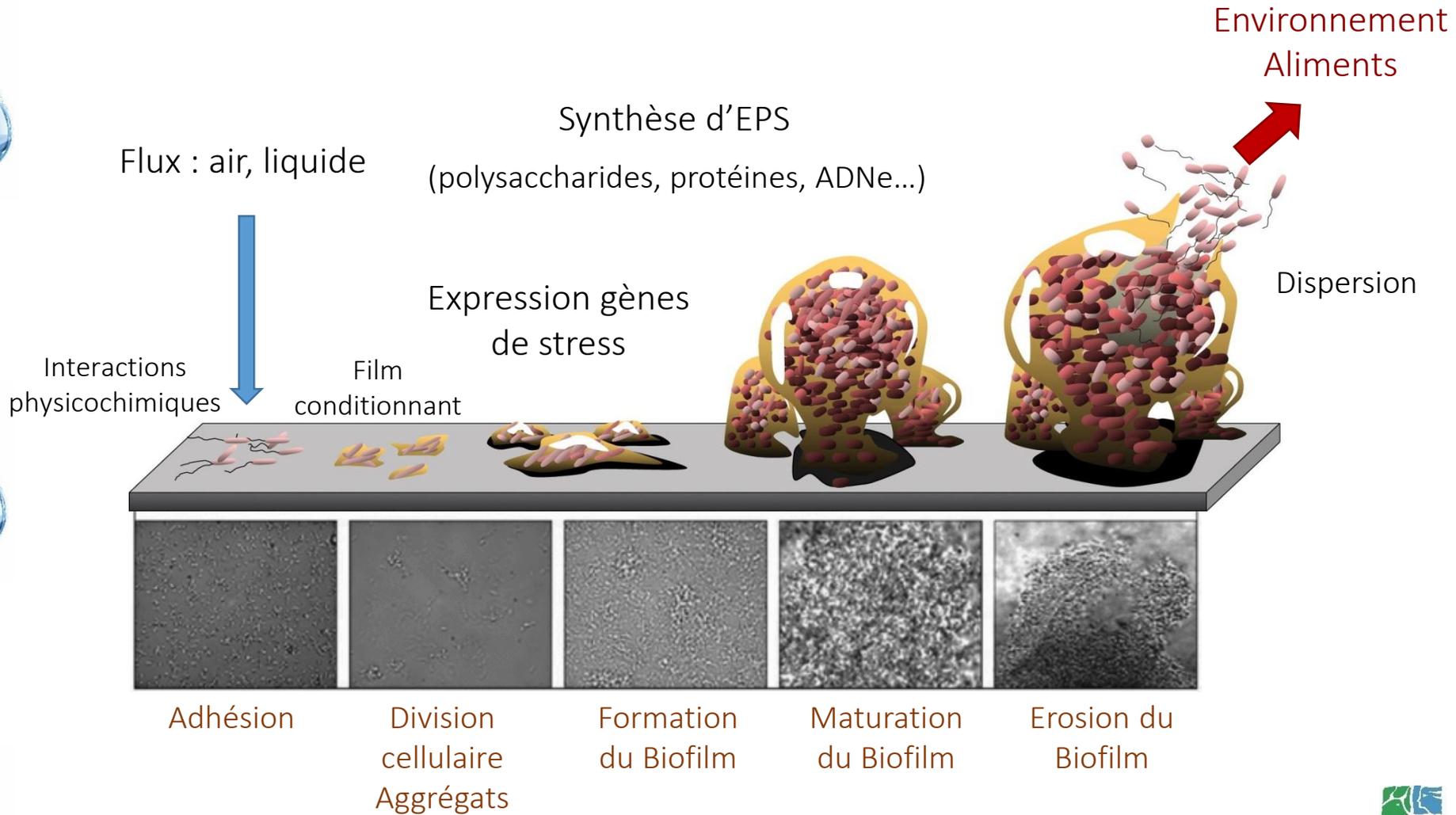
Défaut d'un revêtement de sol PVC/ *Pseudomonas fluorescens*



Défaut d'un sol en résine



Formation d'un biofilm



Le biofilm : un mode de « résistance » multifactoriel



- Architecture du biofilm



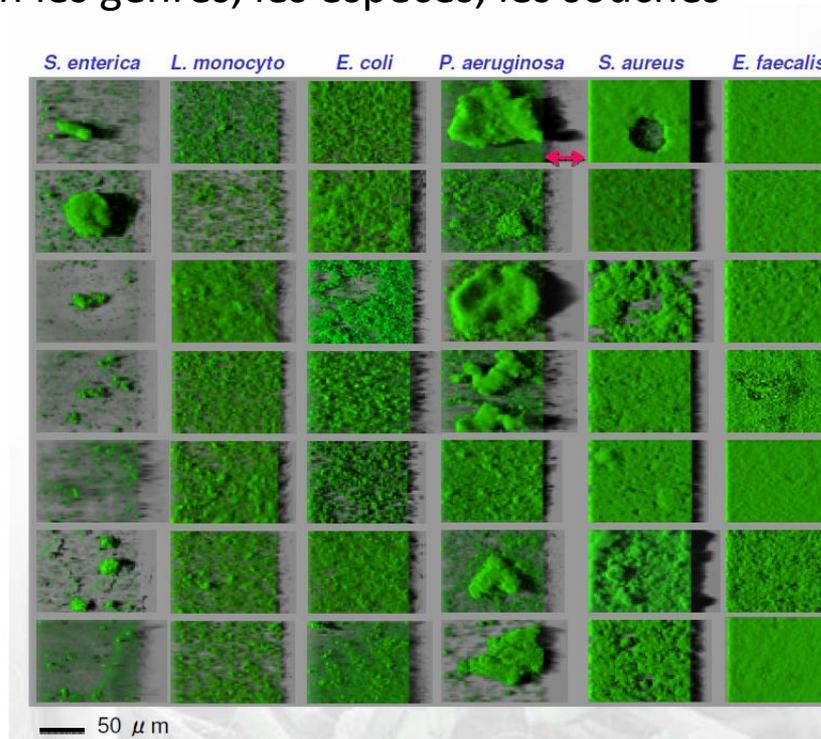
- Mauvaise diffusion du biocide dans le biofilm



- Physiologie des bactéries

Architecture d'un biofilm

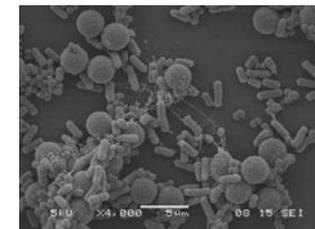
- Variable selon les genres, les espèces, les souches



Briandet R. Colloque Adebitech, 2011

- Variable selon les interactions au sein de biofilms multispèces

➔ Biofilms multispèces plus stables



Résistance au décrochage

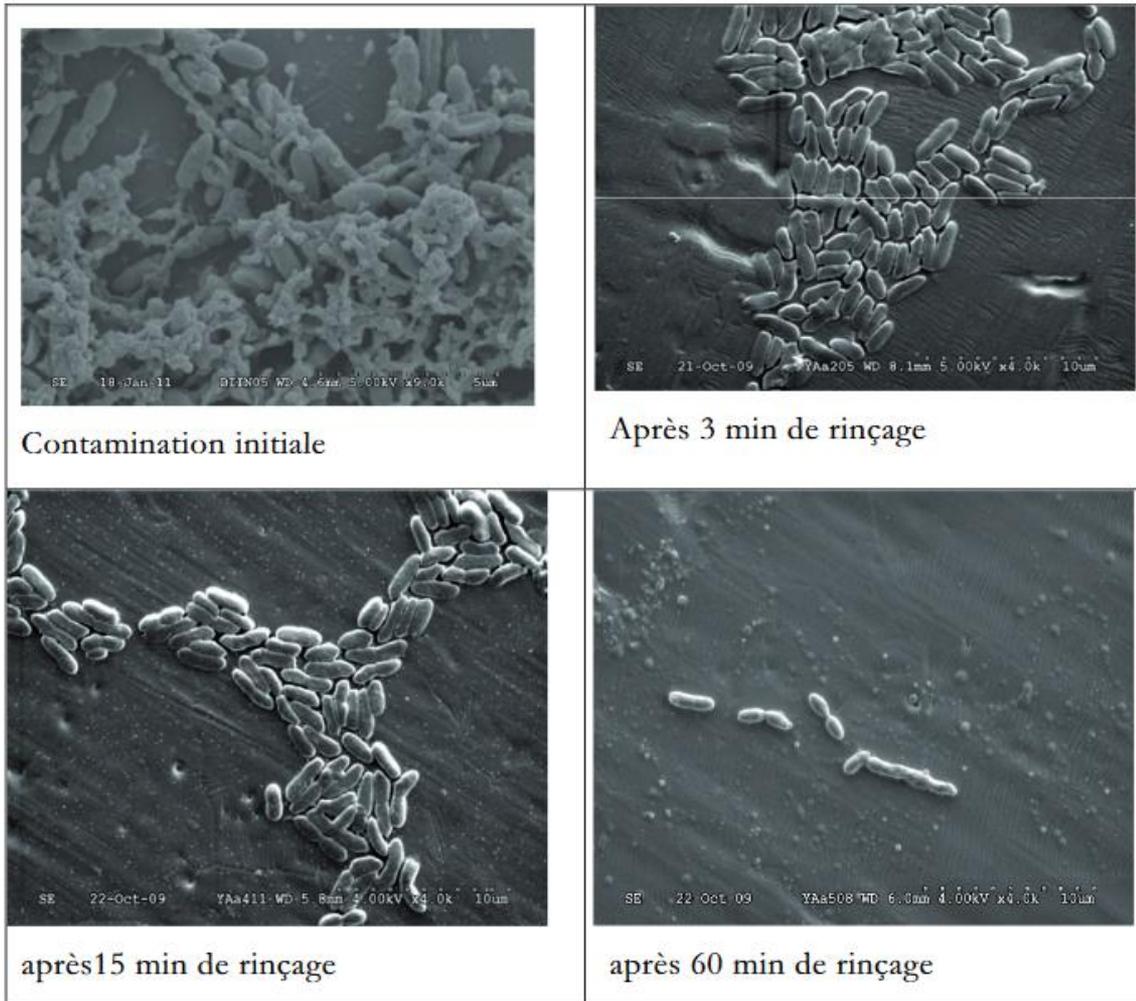


Figure VI. 4 : Observations au MEB des surfaces de coupons en acier inoxydable après rinçage pour les différents temps indiqués à la contrainte pariétale de 0,144 Pa.



Rôle des EPS dans la résistance des biofilms

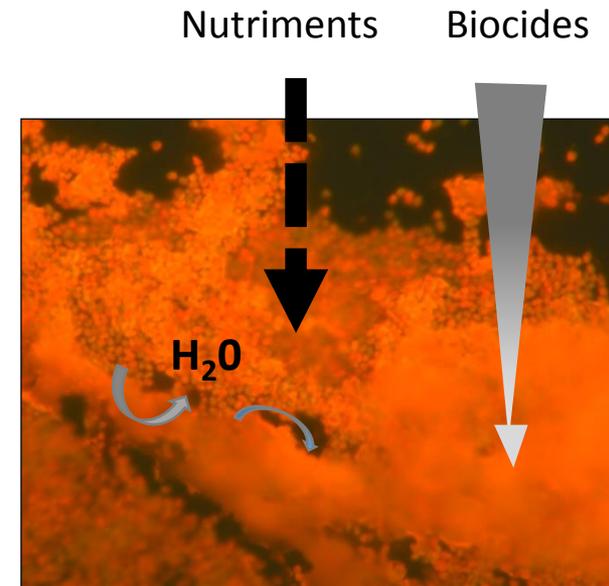
- Barrière physique créée par les Substances Polymériques Extracellulaires (EPS)

- H₂O : 85 à 95%
- Polysaccharides
- Protéines, ADN extracellulaires, a. teichoïques...

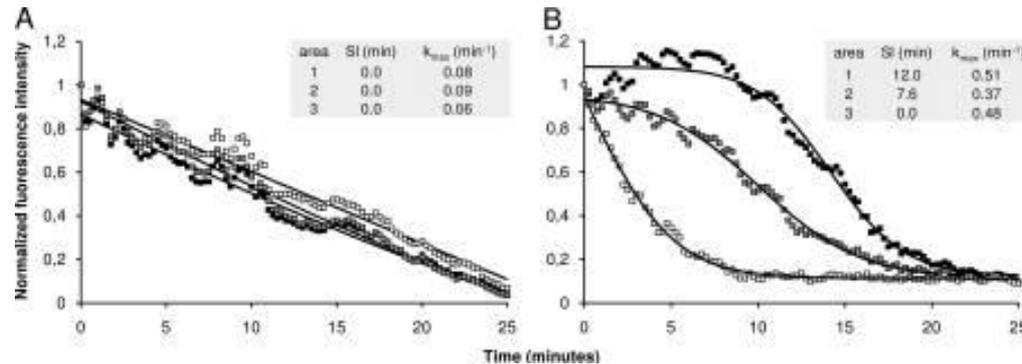
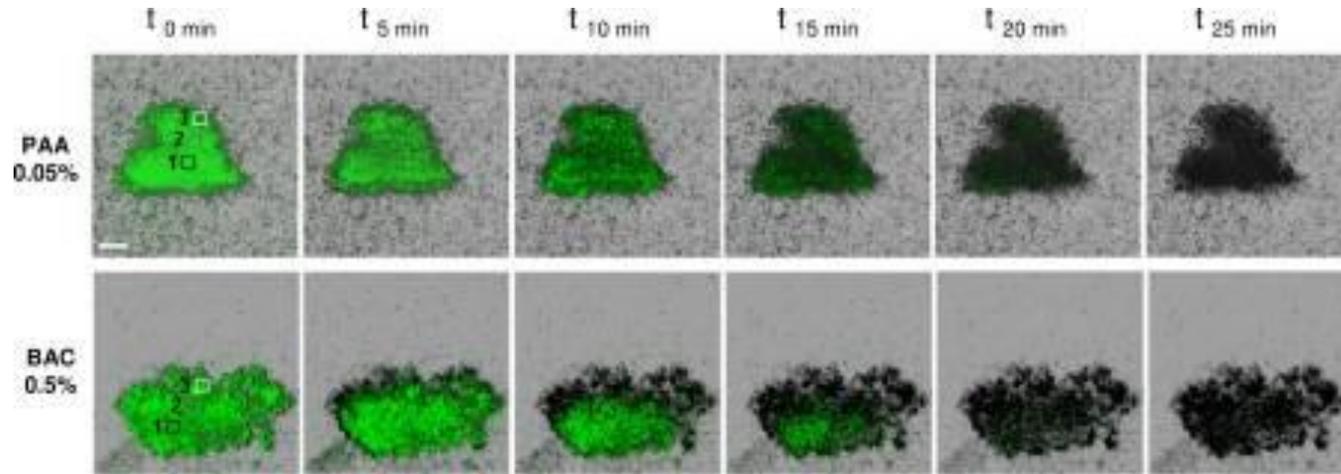
➔ Mauvaise pénétration du biocide : gradient de concentration

➔ Adsorption sur la matrice

➔ Interaction avec les constituants de la matrice



Pénétration de biocides dans un biofilm



➔ Problème de pénétration du chlorure de benzalkonium dans le biofilm

Changements phénotypiques



- Adhésion des cellules => expression de gènes spécifiques
- Hétérogénéité physiologique des cellules



- Echange génétique
- Mutations consécutives au stress oxydatif



Comment lutter?



Flux : air, liquide

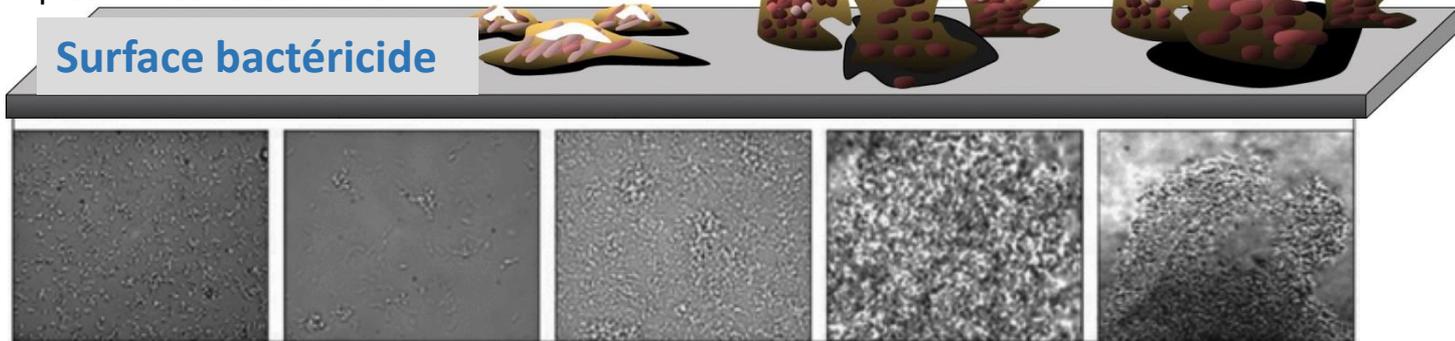
Limiter l'adhésion

Interactions physicochimiques Film conditionnant

Surface bactéricide

Limiter la communication

Destructurer le biofilm



Environnement
Aliments

Dispersion

Adhésion

Division cellulaire
Aggrégats

Formation du Biofilm

Maturation du Biofilm

Erosion du Biofilm

Matériaux antimicrobiens



- Matériaux

- Design, équipement démontable
- Résistants aux produits chimiques, non corrodables.
- Topographie



- Fonctionnalisation \Rightarrow Activité antimicrobienne

- Matériaux avec couches minces (coating) (Page *et al.*, 2012)
 - Argent, CuO, TiO₂, Au...
 - Greffage ammoniums quaternaires
 - PEG
- Matériaux avec inclusion d'antimicrobiens
 - Argent (Mtimet, 2011)

Conclusions



- Résistance des biofilms multifactorielles => persistance
- Nécessité d'évaluer l'efficacité des biocides sur les biofilms

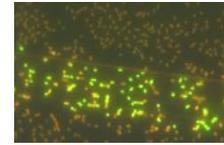
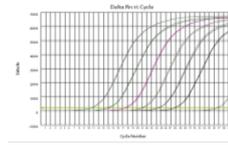
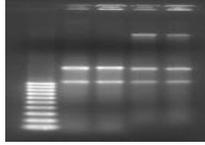
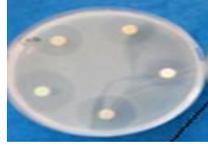
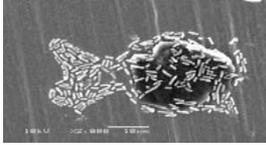


- Améliorer l'efficacité des opérations de N&D passe aussi par une prévention des biofilms

- Matériaux innovants antibactériens en complément des biocides

- Nécessité de considérer les bactéries viables lors des contrôles car stressées (méthodes de détection)





Merci pour votre attention