



**HAL**  
open science

## Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine

Elissa Khamisse

► **To cite this version:**

Elissa Khamisse. Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. Sociologie. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0036 . pastel-00770326

**HAL Id: pastel-00770326**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00770326>**

Submitted on 7 Jan 2013

**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.



## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

**Spécialité : Sciences de la Vie et Santé**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Elissa KHAMISSE**

le 06 Avril 2012

## **Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine**

Directeur de thèse : **Brigitte CARPENTIER**

Co-encadrement de la thèse : **Olivier FIRMESSE**  
**Véronique DEPERROIS**  
**Souad CHRISTIEANS**

### Jury

<b>Mme Brigitte CARPENTIER</b> , Directrice de Recherche, ANSES, Maisons-Alfort	Directrice de thèse
<b>Mme Christine FAILLE</b> , Directrice de Recherche, INRA, Villeneuve d'Ascq	Rapporteur
<b>M. Eric METTLER</b> , Docteur, Centre de recherche SOREDAB	Examinateur
<b>Mme Nadia OULAHAL</b> , Maître de conférence, IUT Lyon 1	Rapporteur
<b>M. Colin TINSLEY</b> , Professeur, AgroParisTech	Examinateur

## **Remerciements**

Voilà trois ans de travail résumés dans ce manuscrit de thèse... Je me dois tout d'abord de remercier vivement l'Association pour le Développement de l'Industrie de la Viande (ADIV) qui via une bourse CIFRE a financé ce travail. Je remercie également l'Etablissement National des Produits de l'Agriculture et de la Mer (FranceAgriMer), qui a retenu ce projet pour le financer ainsi que l'Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (ACTIA) qui a coordonné les activités de l'Unité Mixte Technologique (UMT-TERESA) dont ce projet a fait partie.

Un grand merci à Christine Faille et Nadia Oulahal d'avoir accepté de juger mon travail et d'être rapporteurs de ma thèse. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Je remercie également Eric Mettler et Colin Tinsley de me faire l'honneur de participer au jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Laurent Laloux, directeur du Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA) de Maisons-Alfort de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier également Gérard Poumeyrol, chef de l'unité Maîtrise de l'Hygiène (MAHY) de m'avoir accueillie et offert les bonnes conditions à la réalisation de ce travail.

Je voudrais témoigner toute ma gratitude à Brigitte Carpentier, ma directrice de thèse pour avoir encadrer mes travaux pendant ces trois ans. Sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique et sa passion pour la recherche m'ont été d'un soutien précieux. Grâce à son encadrement consciencieux, j'ai pu progresser et apprendre ce qu'est le métier de chercheur. Merci à elle pour ses conseils pertinents et ses encouragements tout au long de ces trois années.

J'adresse également mes remerciements amicaux à Olivier Firmesse, ingénieur d'étude de l'équipe HEMS qui a co-encadré mes travaux de thèse. Tu m'as formé à la biologie moléculaire et tes connaissances m'ont été très précieuses. Tu m'as beaucoup appris aussi bien sur les différents aspects de ma thèse que sur ceux de la vie en général (héhé ....). Merci pour tout ! (J'espère que je vais quand même te manquer !!).

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à Souad Christieans, responsable du pôle Hygiène et Sécurité des Aliments de l'ADIV. Merci à elle pour ses encouragements et sa bonne humeur communicative. Malgré un emploi de temps chargé et un encadrement distant, elle a su recadrer ce travail quand il le fallait.

Je souhaite également remercier Véronique Deperrois, chef de l'unité Ecophysiologie et Détection Bactérienne (EDB) pour son aide et ses précieux conseils notamment pour la partie DGGE.

Je voudrais témoigner ma gratitude aux membres de mon comité de thèse : Régine Talon, Laurent Guiller et Marie Cornu qui ont contribué à rendre ces échanges constructifs et remis en question continuellement ce travail.

Je remercie également Pierre Beaubois de nous avoir accueillis dans l'industrie. Merci à lui pour sa bonne humeur, sa connaissance du terrain et sa disponibilité pour nous filer un coup de main au moment des prélèvements de surfaces.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes de l'équipe Hygiène et Ecophysiologie Microbienne des Surfaces (HEMS) dont je fais partie et qui ont largement contribué au bon déroulement de cette thèse. Je pense tout particulièrement à Danielle Chassaing qui m'a beaucoup aidée lors de la réalisation de mes manips et qui a accepté de nous accompagner les samedis. Sa générosité, son sourire et sa gentillesse incroyable étaient un vrai rayon de soleil au laboratoire. Un énorme merci à Jocelyne Taché pour son aide et sa grande disponibilité notamment pour la gestion de la paperasse Qualité (tu m'as sauvée la vie !). Je remercie également Anne-Marie Leconte pour nos discussions et son écoute aux moments où ça n'allait pas.

J'adresse également mes profonds remerciements à Thomas Meheut de l'unité EDB pour son aide dans mes manips de DGGE. Un grand merci à Françoise Dilasser pour son dépannage dans les produits et kits de biomol.

J'exprime également toute ma gratitude à Olivier Cerf pour ses conseils pertinents et son aide dans la partie bibliographique de ma thèse.

Mes sincères remerciements vont aussi à toutes les personnes du Pôle Administratif, Financier et Technique (PAFT) dont le service informatique (Serge! J'espère que je n'ai pas été trop casse-pied !!), et le service des ressources humaines (Sadia pour mes anomalies de Gestor et Edwige pour mes ordres de missions). Un grand merci aussi aux personnes du Service d'Appui Technique aux Laboratoires (SATAL) et de la laverie qui ont participé au bon déroulement de mes manips.

Un grand Merci à Carine Zintilini de BioMerieux pour son aide dans l'analyse des résultats du typage moléculaire et les réponses apportées à mes nombreuses questions.

J'adresse aussi mes remerciements à Stephan Borensztajn du Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques de l'Université Pierre et Marie Curie pour l'initiation à la microscopie électronique à balayage.

Un grand merci à l'école doctorale ABIES pour ses bons conseils, ses formations proposées et... ses repas délicieux. Merci à Corinne Fiers pour son soutien et son aide lors de mes inscriptions.

Mes remerciements vont également à ma stagiaire Adeline Fonfreide à qui je souhaite beaucoup de succès dans sa carrière professionnelle.

Un grand merci à mes collègues de l'openspace : Sabine, pour son beau sourire, Cédric pour sa grande gentillesse et Marie pour ses conseils surtout à la fin. Bonne chance pour la suite !

Je ne saurais oublier la clic « pause-café » Leila, Mohammed et Nasser (tu m'as vu grandir pendant ces 3 ans...). Merci de m'avoir sortie la tête de la paille. Nos séances de "papotages"

m'ont tant apporté ! Un spécial merci à Charrrrr ... pour ses précieux conseils, ses encouragements, ses gâteaux tunisiens, et les bons moments passés ensemble au labo. Puisse notre amitié durer éternellement !

De grands mercis à Reffo, Lero, Krys, Henry, Tonton, Rita E., Sisi, Maya et Grace qui ont été (sont et seront, j'espère) de véritables amis et des piliers sans faille. Je n'oublierais jamais nos soirées passées ensemble ... Merci d'être présents pour les bons et moins bons moments, merci de m'avoir toujours écoutée et encouragée. Un merci spécial à ma "fofolle" Ritz à qui je souhaite tout le courage pour sa thèse : tu es pour moi plus qu'une sœur. Merci de m'avoir remis en confiance quand j'étais down.

Lapin ... Merci pour m'avoir soutenue lors des hauts et des bas de cette thèse. Tes conseils précieux m'ont été d'un réconfort immense. Merci de m'avoir remonté le moral quand je craquais. Nos ballades sur Paris et nos longues discussions resteront gravées dans ma mémoire.

Enfin, je souhaite dédier ce mémoire à mes parents et mon frère qui ont toujours cru en moi et qui seront si fier de m'appeler demain « Docteur ». Merci pour tout ce que vous m'avez fait, pour m'avoir permis de réaliser mes rêves à 3000 km loin de vous. Merci pour votre amour sans frontières, votre réconfort en tout instant et la joie de nos coups de fil et nos moments en famille. Qu'ils sachent tous à quel point je les aime !

*« La science est le tronc d'un baobab qu'une personne seule ne peut embrasser » (Proverbe Bénin)*

## Résumé

Ce travail de thèse concerne l'étude de l'écologie microbienne d'un atelier de découpe de viande bovine, dans le but de mieux comprendre la persistance bactérienne, c'est-à-dire, la présence répétée d'un même clone bactérien pendant une longue période malgré l'application bien conduite et régulière du nettoyage et de la désinfection (N-D). Des prélèvements par « chiffonnages » multiples de surfaces d'équipements ont été réalisés lors de trois campagnes de prélèvement espacées les une des autres d'au moins six mois. Les prélèvements ont été réalisés sur un tapis convoyeur en polychlorure de vinyle (PVC) et sur des machines éplucheuses en acier inoxydable avant et après N-D. Nous avons quantifié les cellules totales (les cellules vivantes et les cellules mortes) par PCR quantitative en temps réel (qPCR), les cellules viables par EMA-qPCR, et les UFC (provenant de cellules cultivables) par dénombrement après incubation à 25°C sur gélose tryptone soja. Les résultats montrent qu'avant N-D, les cellules totales (en moyenne 5,6 - exprimé en  $\log_{10}$  cellules/cm<sup>2</sup> - sur PVC et 4,7 sur acier inoxydable) sont plus nombreuses que les cellules viables (4,5 sur PVC et 4,4 sur acier inoxydable) lesquelles sont plus nombreuses que les UFC (3,8 sur PVC et 2,9 sur acier inoxydable). Le N-D entraîne moins d'une réduction décimale (RD) des populations à l'exception des UFC sur acier inoxydable qui subissent 1,5 RD en moyenne. Ce dernier chiffre s'explique par des forces d'adhésion faibles. L'étude de la diversité des bactéries cultivables montre que sur un total de 51 genres identifiés, 13 seulement sont retrouvés lors des trois campagnes de prélèvements. Les isolats de ces 13 genres représentent 75, 72 et 62% des isolats des campagnes 1, 2 et 3 respectivement. Parmi ces isolats, les plus fréquents sont (par ordre décroissant du nombre d'isolats) : *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter* et *Kocuria*. Le génotypage d'isolats de 3 genres majoritaires (*Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*) montre qu'une seule souche, *Staphylococcus equorum*, est sans aucun doute persistante. L'ensemble de ces observations montrent que l'écosystème varie d'une campagne à une autre. Ces modifications de la diversité bactérienne reflèteraient les modifications de flores des viandes traitées dans l'atelier, qui ont des origines multiples. En outre, il apparaît que, contrairement à ce qui est généralement admis, les bactéries à coloration de Gram négative cultivables sont plus facilement inactivées par le N-D que les bactéries à coloration de Gram positive. L'étude de l'écosystème par PCR-DGGE a permis d'identifier sept genres bactériens et montre que les espèces dominantes sont toutes sous forme vivante, autrement dit, aucune des espèces dominantes n'a été détectée uniquement sous forme de cellules mortes. Sur les sept genres identifiés six sont des Gram - dont majoritairement les genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et *Psychrobacter*. Cette dominance montre que le N-D permet une forte perte de cultivabilité des bactéries Gram - mais qu'une grande partie n'est pas détachée. La dominance des bactéries Gram - observée par PCR-DGGE masque les staphylocoques qui ne sont pas détectés alors qu'ils sont majoritaires parmi la flore cultivable. Seul un genre bactérien, *Propionibacterium*, est identifié par PCR-DGGE uniquement mais il n'est trouvé qu'à une seule campagne et uniquement sur l'acier inoxydable avant N-D. En conclusion, l'avancée majeure de ce travail est la mise en évidence qu'une proportion importante de bactéries survit après les opérations très poussées de N-D mais pour une période transitoire.

**Mots-clés :** Nettoyage-Désinfection, PVC, acier inoxydable, viable non-cultivable, forces d'adhésion, persistance, microbiote, diversité.

**Adresse du Laboratoire :** ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex.

## Abstract

The aim of this work is to acquire a better knowledge of the microbial ecology of a beef processing plant to understand bacterial persistence, *e.g* the presence of a clone isolated several times on several visits in the same processing plant despite regular Cleaning and disinfection (C&D) procedures. Successive swabbing were performed on a PVC conveyor belt and skinning machines made of stainless steel before and after C&D during three surveys in minimal 6 month-intervals. Total cells (live and dead cells) were quantified using real-time quantitative PCR (qPCR). Viable cells *e.g* cells with intact membrane, were assessed using Ethidium Monoazide combined with qPCR. Culturable cells (CFU) were determined from plate counts on Tryptone Soy Agar. Before C&D, total cells ( $5.6 \log \text{ cells/cm}^2$  and  $4.7 \log_{10} \text{ cells/cm}^2$  on PVC and stainless steel respectively) were greater than viable cells ( $4.5$  and  $4.4 \log_{10} \text{ cells/cm}^2$ ) and CFUs ( $3.8$  and  $2.9 \log_{10} \text{ CFU/cm}^2$ ). C&D lead to less than  $1 \log_{10}$  reduction in bacterial populations except for CFU counts on stainless steel where a  $1.5 \log$  reduction is observed. This result is highlighted by the weak attachment strengths observed on stainless steel for CFUs. Identification of the culturable microbiota revealed that out of 51 genera identified, 13 were found at all the visits. These genera represented 75, 72 and 62% of the total isolates. The most frequently identified bacteria were *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter* and *Kocuria*. Molecular typing of three dominant genera (*Staphylococcus*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*) showed that only one strain, *Staphylococcus equorum*, was persistent in the premises. Our results show that the microbial ecosystem is different from one survey to another, which reflect the various geographical origins of meat products. Contrary to widespread belief, Gram negative strains were more easily eliminated by C&D than Gram positive strains. Furthermore, the microbial diversity assessed by PCR-DGGE allowed the identification of 7 genera. This molecular approach showed that dominant species are all in a viable state: none of these species was solely detected in a dead state. Of the 7 genera identified, 6 were Gram negative, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Psychrobacter* being predominant. This result highlights that C&D induced the lost of culturability of Gram negative bacteria although a high proportion was not detached from the surface. The predominance of Gram negative microflora, didn't allow the detection of staphylococcal isolates which were numerous in the culturable microflora. One genus, *Propionibacterium*, isolated in one survey on stainless steel before C&D was only identified by PCR-DGGE.

In conclusion, the present study has demonstrated that a large proportion of bacteria can survive drastic cleaning and disinfection for a transient period.

**Keywords:** Cleaning & Disinfection, PVC, stainless steel, viable but non-culturable, attachment strengths, persistence, microflora, diversity.

**Address of the laboratory :** ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex.

# SOMMAIRE

<b>Liste des figures .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des annexes .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des valorisations scientifiques .....</b>	<b>14</b>
<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
<b>II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>20</b>
A. Bactéries des surfaces .....	21
1. Diversité bactérienne dans les écosystèmes de la filière viande bovine .....	21
2. Etats physiologiques des bactéries des surfaces .....	22
3. Evaluation de la viabilité cellulaire.....	23
3.1. Les méthodes utilisant la microscopie ou la cytométrie en flux.....	23
3.2. Les méthodes moléculaires.....	25
4. Les opérations d'hygiène dans les industries agro-alimentaires .....	26
4.1. Le nettoyage .....	26
4.2. La désinfection .....	29
4.3. Les opérations d'hygiène dans les industries .....	31
4.4. Efficacité des procédures d'hygiène.....	32
5. «Résistance» des bactéries aux produits d'hygiène .....	34
B. Méthodes appliquées à l'étude des bactéries des surfaces .....	35
1. Prélèvement des bactéries sur les surfaces.....	35
1.1. Méthodes de prélèvement sur terrain .....	35
1.1.1. Frottis.....	35
a- Ecouvillon .....	35
b- Chiffonnage .....	36
1.1.2. Empreintes par application d'une gélose.....	36
1.2. Méthodes de prélèvement au laboratoire : cas des ultrasons.....	37
2. Quantification bactérienne .....	38
2.1. Par culture.....	38



2.2.	Sans culture : PCR en temps réel .....	38
2.2.1.	Nature exponentielle de la réaction PCR.....	38
2.2.2.	Efficacité d'amplification.....	41
2.2.3.	Les systèmes de détection .....	42
a-	Les agents intercalant : cas du SYBR <sup>®</sup> -Green.....	42
b-	Les sondes fluorescentes .....	44
2.2.4.	Applications et limites.....	45
3.	Identification bactérienne avec culture préalable.....	46
3.1.	Les méthodes phénotypiques.....	46
3.2.	Séquençage de L'ADNr 16S .....	47
4.	Identification d'écosystèmes complexes sans culture préalable .....	49
4.1.	Les inventaires moléculaires .....	49
4.2.	Suivi et caractérisation des communautés bactériennes complexes .....	49
4.2.1.	L'électrophorèse sur gel dénaturant .....	49
4.2.2.	Autres méthodes d'étude des communautés bactériennes complexes.....	53
4.3.	Et la métagénomique ? .....	55
5.	Analyse du polymorphisme de l'ADN.....	56
5.1.	Polymorphisme inter séquences répétées ou rep-PCR .....	56
5.2.	Autres méthodes de typage.....	58
5.2.1.	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	58
5.2.2.	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) .....	58
5.2.3.	Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) .....	58
<b>III-</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>60</b>
A.	Procédure de N-D menée dans l'atelier de découpe -----	61
B.	Prélèvements-----	61
1.	Prélèvements de surface par chiffonnages .....	62
2.	Prélèvement de surface par empreintes gélosées .....	64
3.	Prélèvements d'air .....	65
C.	Détermination des populations microbiennes à partir des prélèvements par chiffonnage -----	66
1.	Traitement des chiffonnettes .....	66
2.	Dénombrement des UFC.....	66
3.	Evaluation des populations totales et viables des surfaces .....	66
3.1.	Incorporation de l'EMA dans les cellules .....	66

3.2.	Extraction de l'ADN .....	67
3.3.	Quantification des cellules totales et viables par PCR en temps réel .....	67
3.4.	Evaluation de la population bactérienne.....	69
3.5.	Analyses statistiques.....	70
D.	Isolement des bactéries et conservation des isolats .....	71
E.	Identification des bactéries par séquençage de l'ADNr 16S .....	71
1.	Extraction de l'ADN par la technique FTA® .....	71
2.	Amplification de l'ADNr 16S des isolats par PCR classique.....	72
2.1.	Lavage de la membrane FTA® .....	72
2.2.	Choix des amorces d'amplification de l'ADNr 16S.....	72
2.3.	Réactions d'amplifications .....	73
2.4.	Migration des amplicons sur gel d'agarose et dosage par fluorimétrie .....	73
3.	Séquençage de l'ADNr 16S .....	74
F.	Identification-caractérisation des souches de <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Acinetobacter</i> .....	74
1.	Typage moléculaire des souches de <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Acinetobacter</i> .....	74
2.	Identification des souches de <i>Staphylococcus</i> à l'espèce par hybridation sur membrane.....	75
G.	Etude de l'écosystème des surfaces inertes par la méthode DGGE .....	75
1.	« Poolage » de l'ADN des différentes chiffonnettes.....	75
2.	Amplification de l'ADNr 16S et de la région V3 .....	76
3.	Préparation du gel, électrophorèse et révélation du gel .....	77
4.	Analyse du gel par Bionumerics .....	78
5.	Séquençage des bandes .....	79
<b>IV-</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
A.	Quantification des bactéries de surfaces.....	81
1.	Avant-propos.....	81
2.	Résultats.....	81
2.1.	Populations des surfaces avant N-D.....	81
2.2.	Efficacité des opérations d'hygiène.....	82
2.3.	Evaluation des forces d'adhésion des cellules bactériennes.....	82
2.4.	Quantification de la charge bactérienne cultivable aéroportée.....	85
2.5.	Empreintes gélosées après N-D.....	85
3.	Discussion.....	87
4.	Conclusion .....	88
B.	Etude de l'écosystème bactérien cultivable des surfaces.....	89

1.	Avant-propos.....	89
2.	Résultats.....	89
2.1.	Evolution de l'écosystème au cours des trois campagnes .....	89
2.2.	Effet du N-D sur le nombre moyen d'isolats / gabarit .....	92
2.3.	Effet du matériau sur la diversité des genres.....	93
2.4.	Diversité bactérienne de la flore aéroportée cultivable .....	93
2.5.	Typage des genres <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> et <i>Acinetobacter</i> par rep-PCR .....	94
3.	Discussion.....	95
4.	Conclusion .....	100
C.	Etude de l'écosystème des surfaces sans culture préalable -----	104
1.	Avant-propos.....	104
2.	Résultats.....	104
3.	Discussion.....	106
4.	Conclusion .....	108
<b>V-</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>109</b>
<b>VI-</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>114</b>
<b>VII-</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>129</b>

## Liste des figures

### Figures de la partie « Etude bibliographique »

**Figure 1 :** *Pseudomonas fluorescens* marqués avec le kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability.

**Figure 2 :** Principe d'une PMA-qPCR : le PMA va pénétrer uniquement à l'intérieur des cellules dont la membrane cytoplasmique est endommagée. Une forte exposition à une source lumineuse permet une liaison covalente à l'ADN des cellules mortes. Seul l'ADN des cellules vivantes sera alors amplifié par PCR en temps réel (qPCR).

**Figure 3 :** Effet du jet sous pression (A) et de l'inclinaison du jet (B) sur l'efficacité de nettoyage (1998).

$$\text{Efficacité} = \frac{\text{quantité souillure avant nettoyage} - \text{quantité souillure après nettoyage}}{\text{quantité souillure avant nettoyage}} \times 100$$

La quantité de souillures mesurée avec la méthode des colorants fluorescents mise au point par l'ADIV est le nombre de pixels fluorescents avant et après nettoyage calculé à partir d'un logiciel d'analyse d'images.

**Figure 4 :** Influence de l'inclinaison du jet sur la quantité d'aérosol formé durant les opérations d'hygiène.

**Figure 5 :** Suivi en temps réel d'une réaction de PCR qui permet de montrer que la cinétique d'amplification met en jeu 3 étapes.

**Figure 6 :** Variation des cycles seuil Ct en fonction de la quantité initiale d'ADN ( $N_0$ ) présente dans le tube PCR. Les démarrages plus ou moins tardifs de la phase exponentielle représentée par les différentes valeurs de Ct sont directement fonction de la quantité initiale  $N_0$ . La courbe rouge représente l'amplification d'un produit 10 fois plus abondant que la courbe noire et 100 fois plus que la courbe bleue.

**Figure 7 :** Droite de quantification réalisée avec des dilutions au 10<sup>ème</sup> en série en série à partir d'un ADN standard •. L'intégration des Ct des échantillons inconnus • dans la droite de standardisation permet de déterminer le  $N_0$  initial.

**Figure 8 :** Agent SYBR<sup>®</sup>-Green se liant à l'ADN double brin. (a) Durant la dénaturation, le SYBR- Green<sup>®</sup> libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

**Figure 9 :** Courbes de fusion ou de dissociation pour 2 échantillons amplifiés dans 2 tubes. Présentation en données brutes de la diminution de la fluorescence en fonction de l'accroissement de la température (A) et présentation par le calcul de la dérivé première des courbes ci-dessus. Les sommets des pics indiquent les valeurs de Tm pour chaque amplifiat (B). (UA) : unité arbitraire de fluorescence. Les flèches montrent les points d'inflexion des courbes de fusion dans la figure (A) qui correspondent au sommet des pics de la dérivée première dans la figure (B).

**Figure 10 :** Hydrolyse de la sonde Taqman<sup>®</sup>. (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

**Figure 11 :** Structure secondaire et variabilité de la molécule d'ARNr 16S chez *E. coli*.

**Figure 12 :** Distribution des régions hyper-variables (notées de V1 à V9) ainsi que des régions conservées (notées A à J) du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli*.

**Figure 13 :** Dénaturation progressive de fragments d'amplification dans un gel de DGGE.

**Figure 14 :** Principe de la SSCP : Une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN affecte la conformation secondaire de l'ADN simple brin et par conséquent la mobilité électrophorétique du fragment d'ADN dans des conditions non dénaturantes. La présence d'une mutation entraîne dans ce cas un décalage de position de la bande.

**Figure 15 :** Principe de la T-RFLP : Les séquences d'ADN amplifiées sont digérées par des enzymes de restriction et les fragments de différentes longueurs sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ou gel d'acrylamide non dénaturant. Une sonde marquée par fluorescence va s'hybrider sur les fragments terminaux des ADN digérés par les enzymes. Les bandes sont finalement révélées par autoradiographie.

**Figure 16 :** Principe du DiversiLab. A : Liaison des amorces aux séquences répétitives ciblées. Le génome est « découpé » en fragments de tailles identiques ou différentes. B : Séparation des fragments amplifiés par électrophorèse / Obtention d'une empreinte génétique unique à chaque souche.

**Figure 17 :** Principe de la PFGE. Une macro-restriction de l'ADN bactérien est effectuée au sein d'une matrice solide (plug d'agarose) afin d'obtenir de grands fragments. Ceux-ci sont séparés sous un champ électrique qui change régulièrement de direction selon un angle défini. Les molécules d'ADN sont contraintes de se réorienter en permanence dans les mailles du gel, ce qui permet la séparation des grands fragments.

## **Figures de la partie « Matériels et méthodes »**

**Figure 18 :** Opération de N-D au canon à mousse d'un tapis convoyeur en PVC.

**Figure 19 :** Machine éplucheuse Townsend<sup>®</sup> en acier inoxydable.

**Figure 20 :** Représentation schématique de la surface d'un tapis convoyeur en PVC. La bande de couture du tapis convoyeur nous a permis de délimiter les zones à analyser. A : Prélèvements de surfaces à la campagne 1. Les zones 2 et 4 ont servi aux chiffonnages successifs avant et après N-D. Les zones 1 et 3 ont servi aux empreintes gélosées avant et après N-D. B : Prélèvements de surfaces aux campagnes 2 et 3. Les zones B et D ont servi aux 15 chiffonnages successifs avant N-D et les zones A et F aux 15 chiffonnages successifs après N-D. Les zones C et E ont servi aux empreintes gélosées avant et après N-D.

**Figure 21 :** Gabarits utilisés pour les prélèvements par chiffonnages (gabarit blanc de droite) et empreintes gélosées (gabarit gris de gauche). Pour la première campagne, les prélèvements par chiffonnage et empreintes ont été réalisés sur les mêmes surfaces avant et après N-D. Pour les campagnes 2 et 3, les prélèvements par chiffonnage et empreintes ont été réalisés sur 4 machines avant N-D et 4 autres machines après N-D.

**Figure 22 :** Boîte contact TSA clipsée sur l'applicateur ATL<sup>®</sup>.

**Figure 23 :** A : Gamme standard des 33 souches représentatives des genres isolés sur PVC et acier inoxydable. La droite de régression calculée à partir de l'ensemble des points coïncide avec la droite de régression de la souche *Pseudomonas* 09EMPF54. B : Droite standard de la souche *Pseudomonas* 09EMPF54 (témoin positif) utilisée pour la quantification des populations bactériennes totales et viables.

**Figure 24 :** Droites de décrochement des cellules totales, viables et UFC après 10 chiffonnages successifs réalisés sur une machine éplucheuse Townsend<sup>®</sup> en acier inoxydable.

**Figure 25 :** A : Carte Whatman FTA<sup>®</sup>. La culture bactérienne est déposée au centre des cercles imprimés sur la carte qui est mise à sécher. B : Un poinçon de la carte est récupéré à l'aide d'un emporte-pièce puis placé dans un tube stérile pour une étape de purification.

**Figure 26 :** Dispositif IngenyphorU utilisé pour la séparation des produits d'amplification :

A : Cassette munie de deux plaques en verre

B : Cuve à électrophorèse contenant 17 litres de tampon de migration TAE à 1,25X

C : Compartiments à gradients

D : Vanne séparant les deux compartiments

E : Peigne utilisé pour la formation des puits dans le gel

F : Embout reliant l'aiguille (non illustrée sur ce schéma) aux compartiments à gradients.

## **Figures de la partie « Résultats et discussion »**

**Figure 27 :** Populations totales (a), viables (b) et UFC (c) avant et après N-D. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types, n= 4 pour le PVC et n=8 pour l'acier inoxydable. Une même lettre associée à deux valeurs signifie que les moyennes de ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ).

**Figure 28 :** Evaluation des forces d'adhésions des cellules totales (qPCR, a), viables (EMA-qPCR, b) et UFC (c) par le pourcentage de cellules détachées par le premier chiffonnage ainsi que la pente k des droites de décrochement multipliée par -1. Plus les valeurs des k sont grandes, moins les forces d'adhésions des bactéries sont importantes. Les barres d'erreur représentent les écarts-type des valeurs de k : n= 4 pour PVC and n=8 pour l'acier inoxydable. Une même lettre associée à deux conditions signifie que les moyennes de ces deux conditions ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ). Les différences significatives observées pour les valeurs moyennes de k sont aussi observées pour les pourcentages moyens du premier chiffonnage à l'exception des cellules viables sur acier inoxydable après N-D où les pourcentages moyens du premier chiffonnage n'étaient pas significativement différents (6 et 7%).

**Figure 29 :** Charge bactérienne cultivable aéroportée qui se dépose sur les surfaces de l'atelier entre deux opérations d'hygiène. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types : n = 2 (A) ; n = 3 (B) ; n= 2 (C) ; n = 2 (D) ; n = 3 (E).

**Figure 30 :** Deux empreintes successives sur un tapis convoyeur en PVC après N-D (zone C, campagne 2). A : première empreinte, B : deuxième empreinte réalisée au même endroit que la première à 10 secondes d'intervalle. Les boîtes contact ont été incubées à 25°C pendant 6 jours.

**Figure 31 :** Six empreintes TSA appliquées sur un tapis convoyeur en PVC après N-D (zone C, campagne 2). On constate la présence de deux types de populations bactériennes : une population formée de grosses colonies visibles après 6 jours d'incubation à 25°C et une autre population formée de petites colonies qui ont poussé après 14 jours d'incubation à 25°C.

**Figure 32 :** Répartition du pourcentage d'isolats Gram + et Gram – en fonction des ordres.

**Figure 33 :** Pourcentage d'isolats obtenus aux campagnes 1, 2 et 3 pour les genres dont le nombre d'isolats est supérieur ou égal à 3 (campagne 1 : 108 isolats ; campagne 2 : 134 isolats ; campagne 3 : 127 isolats).

**Figure 34 :** Pourcentage d'isolats obtenus à chaque campagne pour les genres dont le nombre d'isolats est inférieur à 3 (campagne 1 : 108 isolats ; campagne 2 : 134 isolats ; campagne 3 : 127 isolats).

**Figure 35:** Nombre moyen de genres Gram + (A) et Gram – (B) isolés / gabarit (566 cm<sup>2</sup>) sur PVC et acier inoxydable avant et après N-D aux campagnes 2 et 3. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. n = 2 pour PVC et n = 4 pour l'acier inoxydable.

**Figure 36 :** Répartition du pourcentage d'isolats issus des prélèvements d'air en fonction des ordres.

**Figure 37 :** Répartition du pourcentage d'isolats issus des prélèvements d'air en fonction des genres et éventuellement des familles.

**Figure 38 :** Dendrogramme de similarité des empreintes génétiques de souches de *Staphylococcus* isolées sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D aux campagnes de prélèvement 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3). P = pattern (type). La souche 10EMPF8 n'a pas été identifiée car elle n'a pas poussé sur milieu de culture.

**Figure 39 :** Dendrogramme de similarité des empreintes génétiques de souches d'*Acinetobacter* isolées sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D aux campagnes de prélèvement 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3). P = pattern (type). La souche 09EMPF242 présente deux types de morphologie après isolement sur milieu TSA. Ces deux morphologies ont donné deux empreintes génétiques complètement différentes. L'une des deux morphologies (09EMPF 242b) est similaire à la souche 09EMPF201, elles ont seulement une bande d'écart. L'autre morphologie (09EMPF 242j) a une empreinte génétique différente des autres souches testées.

**Figure 40 :** Dendrogramme de similarité des empreintes génétiques de souches de *Pseudomonas* isolées sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D aux campagnes de prélèvement 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3). P = pattern (type).

**Figure 41 :** Dendrogramme des profils électrophorétiques DGGE de prélèvements de surface de la flore viable (EMA) et de la flore totale réalisés sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D au cours des campagnes de prélèvement 2 et 3 (C2 et C3).

**Figure 42 :** Profils électrophorétiques d'un gel DGGE de prélèvements de surface réalisés sur PVC et acier inoxydable (inox) avant (-) et après (+) N-D au cours des deux campagnes de prélèvement (C2 : campagne 2 ; C3 : campagne 3). Les lettres a à v correspondent aux bandes d'intérêts qui ont été séquencées. Les bandes e, t et u n'ont pas pu être séquencées.

**Figure 43 :** Illustration des problèmes de séquencage des bandes V3 rencontrés dans la DGGE. A : chromatogramme à signaux multiples caractérisant une séquence non interprétable, B : chromatogramme à signal unique caractérisant une séquence interprétable.



## Liste des tableaux

### **Tableaux de la partie « Etude bibliographique »**

**Tableau 1 :** Contribution à la détergence selon une échelle de 0 (contribution nulle) à 5 (contribution très importante).

**Tableau 2 :** Choix du détergent en fonction du type de souillures.

### **Tableaux de la partie « Matériel et méthodes »**

**Tableau 3 :** Souches choisies pour la courbe standard de quantification par qPCR. L'identification des isolats par comparaison des séquences 16S à celles présentes dans la base de donnée RDP10 ne nous a pas permis d'attribuer un nom d'espèce aux différentes souches. Nous avons donc restreint l'identification phylogénétique au genre.

**Tableau 4 :** amorces choisies pour les réactions d'amplification.

**Tableau 5 :** Amorces choisies pour les réactions de séquençage.

**Tableau 6 :** Amorces utilisées pour la PCR 16S.

**Tableau 7 :** Amorces utilisées pour la PCR V3.

### **Tableau de la partie « Résultats et discussion »**

**Tableau 8 :** Pourcentages médians des cellules viables parmi les totales évaluées par EMA-qPCR et des UFC parmi les viables. Une même lettre associée à deux valeurs signifie que les médianes de ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes.

## Liste des abréviations

### Unités de mesures

°C : degré Celsius

cm, µm, nm : centimètre, micromètre, nanomètre

g, mg, µg, ng : gramme, milligramme, microgramme, nanogramme

h : heure

Kb : Kilobases

KHz : KiloHertz

L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre

Mb : Mégabases

min : minute

mM, µM : millimolaire, micromolaire

pb : paire de base

s : seconde

V : volt

W : Watt

### Sigles

ADIV : Association pour le Développement de l'Institut de la Viande

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomique

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

AGPL : Acides Gras PhosphoLipidiques

ANSES : Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AP-PCR : Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction

APS : Ammonium Persulfate

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BET : Bromure d'Ethidium

C : Cytosine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Ct : Threshold cycle

CTC : 5-cyano-2,3-ditolyltétrazolium

DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Gel Expansion

dNTP : désoxyNucléoside TriPhosphate

DO : Densité Optique

DVC : Direct Viable Count

E : Efficacité

EDB : Ecophysiology et Détection Bactérienne

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EMA : Ethidium MonoAzide

ERIC : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence

F : Forward

FDA : Fluoresceïne DiAcétate  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer  
FTA : Flinders Technology Associates  
G : Guanine  
HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point  
HEMS : Hygiène et Ecophysiologie Microbienne des Surfaces  
IAA : Industrie AgroAlimentaire  
IP : Iodure de Propidium  
LSA : Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort  
MAHY : MAîtrise de l'Hygiène  
MGB : Minor Groove Binder  
N.E.P : Nettoyage En Place  
N-D : Nettoyage-Désinfection  
PAFT : Pôle Administratif, Financier et Technique  
PBS : Phosphate Buffer Solution  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis  
PMA : Propidium MonoAzide  
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique  
PVC : PolyVinyl Chloride  
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction  
R : Reverse  
RAPD : Random Amplified Polymorphic  
RD : Réduction Décimale  
RDP : Ribosomal Database Project  
REP : Repetitive Extragenic Palindromic sequence  
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism  
RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction  
SATAL : Service d'Appui Technique aux Laboratoires  
SCN : Staphylococcus à Coagulase Négative  
SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism  
TAE : Tris-Acétate-EDTA  
TBE : Tris-Borate -EDTA  
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthane-1,2-diamine  
TIAC : Toxi-Infections Alimentaires Collectives  
T<sub>m</sub> : Température de fusion ou de demi-dénaturation (melting temperature)  
T-RFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism  
TSA : Tryptone Soy Agar  
TSB : Tryptone Soy Broth  
TTGE : Temporal Temperature Gel Electrophoresis  
U: Unité  
UFC : Unité Formant une Colonie  
UPGMA : Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages  
UV : UltraViolet  
VNC : Viable Non Cultivable

## Liste des annexes

**Annexe 1** : Détergent alcalin chloré utilisé dans l'industrie.

**Annexe 2** : Désinfectant utilisé dans l'industrie.

**Annexe 3** : Détergent-détartrant acide appliqué une fois / semaine dans l'industrie.

**Annexe 4** : Composition du neutralisant polyvalent de désinfection ATL<sup>®</sup>.

**Annexe 5** : Protocole d'extraction d'ADN à l'aide du «MagNa Pure LC DNA Isolation Kit III».

**Annexe 6** : Composition du bouillon de congélation.

**Annexe 7** : Fluorimètre Qubit.

**Annexe 8** : Protocole d'extraction de l'ADN d'un gel polyacrylamide selon le kit «Qiaex II Polyacrylamide Gel Extraction».

**Annexe 9** : Publications.

## Liste des valorisations scientifiques

### Publications

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing and Brigitte Carpentier. Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef processing plant. Article soumis à *International Journal of Food Microbiology*.

Brigitte Carpentier, **Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans and Danielle Chassaing. 2011. Bacterial persistence and transient survival on open surfaces. *Journal of Hygienic engineering and design 1*, 54-56.

### Communications orales et affiches dans des congrès nationaux et internationaux

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Répartition et composition des microcolonies constituant le microbiote persistant des surfaces d'un atelier de la filière viande. Communication orale, *3èmes Journées des doctorants de l'AFSSA*, 21-22 Janvier 2010, Maisons-Alfort, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Répartition et composition des microcolonies constituant le microbiote persistant des surfaces d'un atelier de la filière viande. Communication orale, *Restitution des résultats d'études techniques porcines, FranceAgrimer*, 09 Février 2010, Paris, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Quantification de la microflore bactérienne sur des équipements de la filière viande bovine avant et après nettoyage-désinfection. Affiche, *Journées de l'ED ABIES* (Ecole Doctorale Agriculture Biologie Environnement Santé), 1-2 Avril 2010, Paris, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Quantification de la microflore bactérienne sur des équipements de la filière viande bovine avant et après nettoyage-désinfection. Affiche, *Congrès de la Société Française de Microbiologie*, 2-4 Juin 2010, Marseille, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Quantification of the bacterial load of food contact surfaces from a meat processing plant before and after cleaning and disinfection. Affiche, *Symposium Food Micro 2010*, 30 Août-3 Septembre 2010, Copenhague, Danemark.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Impact du nettoyage-désinfection sur la diversité bactérienne d'équipements en atelier de découpe de viande bovine. Affiche, *PNRA-Interspore, Colloque INRA-ANSES «Maîtrise des biofilms en agroalimentaire»*, 16 Novembre 2010, Boulogne-sur-Mer, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Microflore bactérienne de surface d'équipements de la filière viande bovine avant et après nettoyage-désinfection. Communication orale, *Réseau mixte de technologie, RMT CHLEAN*, 23 Novembre 2010, Paris, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Microflore bactérienne de surface d'équipements de la filière viande bovine avant et après nettoyage-désinfection. Communication orale, *Journées des doctorants et post-doctorants de l'ANSES*, 27-28 Janvier 2011, Maisons-Alfort, France.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Analysis of the microbial community of a meat processing plant before and after cleaning and disinfection. Affiche, *SfAM Summer Meeting*, 04-07 Juillet 2011, Dublin, Irlande.

**Elissa Khamisse**, Olivier Firmesse, Souad Christieans, Danielle Chassaing et Brigitte Carpentier. Diversité et persistance bactérienne dans un atelier de découpe de viande bovine. Affiche, *Colloque Biofilm Adebitech*, 13 octobre 2011, Romainville, France.

Elissa Khamisse, Olivier Firmesse, **Souad Christieans**, Danielle Chassaing et **Brigitte Carpentier**. Etude du microbiote susceptible de persister dans un atelier de la filière viande bovine avant et après nettoyage-désinfection. Communication orale, *Commission R&D du SNIV-SNCP*, 25 Novembre 2011, Paris, France.

# **I- INTRODUCTION**

L'hygiène des surfaces inertes est une préoccupation constante dans l'industrie agroalimentaire (IAA). La contamination microbiologique des surfaces peut être apportée par la matière première, l'air, l'eau ou le personnel. L'adhésion des micro-organismes d'altération ou pathogènes sur les surfaces induit des effets néfastes à la fois en termes de qualité et de santé publique. Les micro-organismes d'altération peuvent se retrouver dans les produits et provoquer la dégradation de leurs qualités organoleptiques ce qui représente un coût et par conséquent, une perte financière pour l'industrie. Par ailleurs, des bactéries pathogènes peuvent être à l'origine de certaines toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) parfois mortelles (Bièche *et al.*, 2012; Bielaszewska *et al.*, 2011). Depuis quelques décennies, d'énormes progrès ont été réalisés en matière de sécurité hygiénique des aliments. La majorité des sites de fabrication alimentaire sont en effet équipés de locaux conformes et des systèmes d'assurance Qualité sont mis en place en s'appuyant notamment sur les principes du HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

Pour réduire la population microbienne des surfaces à un niveau tel que le risque de contamination des produits alimentaires soit acceptable, des procédures de nettoyage-désinfection (N-D) sont mises en œuvre dans les ateliers agro-alimentaires. Afin de vérifier la bonne application des opérations de N-D, des contrôles réguliers sont réalisés pour connaître et estimer la population microbienne résiduelle présente sur les surfaces. Cette procédure est d'ailleurs un outil important de la gestion de la qualité et s'inscrit dans une démarche de maîtrise des points critiques du système HACCP. Malgré la mise en place de procédures agressives, le N-D ne permet pas l'élimination totale de la flore microbienne des surfaces ouvertes. Certaines bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* peuvent persister dans les locaux et équipements industriels (Giovannacci *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 1995). Lors des contrôles microbiologiques des surfaces, seule la fraction cultivable est dénombrée par les hygiénistes. Or au sein d'une population, se trouvent en proportions variables, des bactéries mortes, des bactéries cultivables, et entre ces deux physiologies des bactéries viables non cultivables (VNC). Des travaux ont montré que ces bactéries VNC pouvaient être présentes en quantité très importante sur les surfaces d'ateliers agro-alimentaires (Alliot, 1999; Mettler *et al.*, 1997; Peneau *et al.*, 2007). Par ailleurs, le maintien de la virulence de bactéries pathogènes en état VNC a été démontré dans plusieurs études (Baleux *et al.*, 1998; Colwell *et al.*, 1996). L'aptitude des matériaux au nettoyage (« nettoyabilité ») et à la désinfection (« désinfectabilité ») constitue un sujet d'intérêt pour beaucoup d'industriels. Krysinki *et al.*, (1992) montrent sur des biofilms de *Listeria monocytogenes* que le matériau de tapis convoyeur en polyester/polyuréthane a une contamination microbienne après désinfection plus importante que celui en polyester, l'acier inoxydable étant le plus facilement désinfectable (il s'agit de matériaux neufs). De plus, le développement récent des techniques moléculaires basées sur l'analyse directe de l'acide désoxyribonucléique (ADN) sans



culture préalable des micro-organismes a permis une meilleure étude quantitative et qualitative des écosystèmes bactériens. La Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) a été largement utilisée pour la détection et la quantification de bactéries pathogènes dans des produits alimentaires. Cependant, peu d'études ont appliqué cette technique pour déterminer l'efficacité du N-D en évaluant la flore retrouvée sur les surfaces après les opérations d'hygiène. Quel est donc l'impact du N-D et du matériau sur l'état physiologique des cellules bactériennes ? Quelle est la proportion des cellules vivantes retrouvées après les opérations d'hygiène ?

L'originalité de ce projet repose sur des études appliquées sur terrain afin de mieux connaître la réalité industrielle. Nous avons ainsi choisi de travailler sur un tapis convoyeur en Polychlorure de vinyle (PVC) et sur des machines éplucheuses Townsend® en acier inoxydable, dans un atelier de découpe de viande bovine. Peu de données sont disponibles concernant l'écologie microbienne en termes de populations bactériennes « vivantes » et « mortes » retrouvées sur les surfaces. Pour cela, nous allons quantifier ces populations bactériennes avant et après les opérations de N-D. D'autre part, l'application de conditions stressantes telles les opérations de N-D peut engendrer une baisse de la diversité microbienne. Le développement de méthodes moléculaires telles le séquençage et la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet d'identifier les communautés bactériennes en s'affranchissant des problèmes liés à la microbiologie conventionnelle. Y'aurait-il des genres qui seraient la cible préférentielle des opérations d'hygiène? La persistance est-elle un phénomène répandu parmi la flore dominante des ateliers ? Pour répondre à ces questions, nous avons étudié qualitativement le microbiote des surfaces inertes de l'atelier de découpe en utilisant des méthodes culture-dépendantes et des méthodes moléculaires afin d'avoir une approche plus exhaustive des bactéries présentes sur les surfaces.

Cette thèse s'articule en 3 parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique concernant d'une part la diversité et l'état physiologique des bactéries des surfaces ainsi que les procédures de nettoyage-désinfection menées dans les IAA et d'autre part, les différentes méthodologies de prélèvement, de quantification et d'identification des bactéries de surfaces.
- L'ensemble des parties expérimentales concernant les différents protocoles utilisés dans ce projet sont présentés dans la seconde partie (matériels et méthodes)
- La troisième partie est consacrée aux résultats et s'articule en trois chapitres :
  - ✓ Un premier chapitre porte sur l'évaluation de la charge bactérienne des surfaces du tapis convoyeur en PVC et des machines éplucheuses en acier inoxydable : nous avons quantifié les cellules totales qui représentent les cellules vivantes et les cellules mortes, les cellules viables *i.e* les cellules

dont la membrane/paroi est intègre, et les cellules cultivables capables de former des colonies sur milieu Tryptone Soy Agar (TSA). Nous avons aussi abordé les forces d'adhésion relatives de ces populations bactériennes sur les surfaces de ces deux matériaux avant et après N-D ;

- ✓ Un second chapitre concerne l'étude de l'écosystème bactérien cultivable des surfaces inertes de ces deux équipements ;
- ✓ Enfin, un troisième chapitre sur l'étude de l'écosystème bactérien non cultivable par une méthode moléculaire qui est la DGGE.

Finalement, une synthèse critique des résultats obtenus et les perspectives proposées pour compléter ce travail seront données dans la conclusion générale.

## **II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## A. Bactéries des surfaces

### 1. Diversité bactérienne dans les écosystèmes de la filière viande bovine

Lors des processus d'abattage et d'éviscération des bovins, des bactéries pathogènes ou non-pathogènes provenant principalement des fèces, du contenu stomacal ou du cuir des animaux, peuvent se retrouver sur les carcasses des viandes (Christieans *et al.*, 2006; Warriner *et al.*, 2002). La charge bactérienne présente sur les surfaces d'équipements provient essentiellement du contact des matières premières avec la surface mais aussi d'autres sources telles que le personnel, l'eau utilisée lors des opérations de nettoyage et de désinfection (N-D) de l'industrie mais aussi l'atmosphère et ses particules en suspension (Ellerbroek, 1997).

Il est connu que les bactéries à l'origine des altérations de la viande appartiennent majoritairement au groupe Gram négatif (Garcia-Lopez *et al.*, 1998). On cite à titre d'exemple les genres *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Moraxella* et *Pseudomonas*. Ce dernier est le genre dominant des bactéries isolées dans tous les produits carnés conservés au froid en conditions aérobies (Dainty *et al.*, 1992). *Pseudomonas* est connu pour occuper de nombreuses niches écologiques aérobies. Sa capacité à hydrolyser certains peptides issus de la viande en cas d'épuisement du glucose expliquerait son avantage écologique par rapport à d'autres espèces (Molin *et al.*, 1986). L'espèce *P. fragi* est celle qui domine largement la flore des viandes après quelques jours de conservation (Molin *et al.*, 1982). Cette espèce est incapable de synthétiser les sidérophores qui sont les transporteurs de fer indispensables au métabolisme respiratoire. Cette carence est compensée par l'utilisation de ce métal présent en grande quantité dans le muscle (Champomier-Vergès *et al.*, 1996). L'économie d'énergie réalisée sous forme d'Adénosine triphosphate (ATP) non consommé pour synthétiser les sidérophores est sans doute un des éléments qui expliquerait pourquoi *P. fragi* est l'espèce dominante dans la viande.

La viande bovine est aussi dominée par des bactéries Gram positif telles les genres *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Brochothrix* et *Staphylococcus* (Holzapfel, 1998). Leur présence sur les surfaces inertes s'explique par leur forte tolérance aux conditions environnementales des ateliers (températures de réfrigération, dessiccation, faible pH). Une des explications quant à la présence de la bactérie d'altération *Brochothrix thermosphacta* dans les produits carnés est la mise en évidence de peptidases uniquement produites par cette bactérie au contact d'exsudat de viande mais aussi d'une glycérol estérase active dans la viande (Gardner (1982) cité par Labadie (2004)). Russo *et al.* (2006) montrent une réduction de la croissance de *B. thermosphacta* dans la viande

fraîche en présence de bactéries lactiques à 5°C. Les études menées sur la microflore bactérienne des ateliers de viande bovine après N-D ont porté principalement sur les populations cultivables identifiées par des méthodes biochimiques traditionnelles. Selon Mettler *et al.* (1998), les principaux genres bactériens isolés de matériaux neufs introduits dans un atelier de transformation de viande bovine sont *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* et *Kluyvera*. Marouani-Gadri *et al.* (2009) montrent la prévalence du genre *Staphylococcus* sur des surfaces inertes d'un atelier de viande bovine après nettoyage-désinfection. Schlegelova *et al.* (2010) isolent 8 espèces différentes de *Staphylococcus* sur des surfaces d'équipements d'un abattoir bovin après les opérations d'hygiène. Ces mêmes auteurs montrent la dominance de *S. saprophyticus* qui correspond à 26% du nombre total d'isolats.

## 2. Etats physiologiques des bactéries des surfaces

L'état physiologique des micro-organismes est fortement lié aux facteurs physico-chimiques de l'environnement qui peuvent induire des perturbations et créer des lésions membranaires et cellulaires. Ainsi, nous pouvons observer au sein des communautés bactériennes en proportions variables, des bactéries mortes, des bactéries viables cultivables et entre ces deux états physiologiques, des bactéries dites viables non cultivables (VNC). L'état VNC chez les bactéries a été mis en évidence pour la première fois par l'équipe de Rita Colwell en 1981 (Byrd *et al.*, 1991) au cours de travaux visant à évaluer la qualité des eaux côtières de l'état de Maryland. Ceux-ci avaient remarqué des disproportions importantes entre les dénombrements bactériens réalisés par culture sur milieu solide et les dénombrements effectués par observation microscopique. Actuellement il est admis qu'une cellule ne pouvant être dénombrée sur milieu gélosé classique mais possédant une activité physiologique ou métabolique témoin de sa viabilité est considérée viable non cultivable (Oliver, 2005).

Dans les industries agro-alimentaires, les micro-organismes sont soumis à de multiples agressions (choc chimique, privation nutritionnelle, stress hydrique, pH, basses températures). Ces différents facteurs sont susceptibles d'induire l'entrée en état VNC des cellules. Brightwell *et al.* (2006) ont pu identifier, à partir de prélèvements de surfaces sur un tapis convoyeur en Intralox<sup>®</sup>, des *Sphingomonas* non détectés par des méthodes culture-dépendantes. Peneau *et al.* (2007) observent lors d'une persistance expérimentale d'un *P. fluorescens* à 10°C, sur des coupons en céramique soumis à des encrassements répétés et des opérations d'hygiène quotidiennes douces (pas d'action mécanique, dose diminuée de moitié par rapport à celle préconisée dans les industries), qu'il existe de fortes différences entre le nombre d'UFC et le nombre de cellules montrant une activité respiratoire par la réduction du 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium (CTC). Les travaux d'Alliot

(1999) réalisés dans un atelier fromager ont montré que les UFC représentaient de 0,005% à 0,04% du nombre total de bactéries évalué par comptage dans une cellule de Thoma. De plus, de nombreux pathogènes tels que *Salmonella enterica* ou *Listeria monocytogenes* sont susceptibles de développer un état VNC. Marouani-Gadri *et al.* (2010) montrent l'existence d'une proportion de VNC, variable au cours de l'expérience, sur des biofilms d'*E. coli* O157:H7 soumis quotidiennement à des opérations de nettoyage-désinfection douces dans des conditions environnementales proches de celles présentes dans les ateliers de viande.

### **3. Evaluation de la viabilité cellulaire**

La plupart des méthodologies de dénombrement des populations viables sont basées sur l'utilisation de fluorochromes caractérisant différentes cibles physiologiques telles la capacité des cellules à s'allonger, l'activité respiratoire, l'intégrité membranaire des cellules et l'activité estérase. Il est à noter aussi que dans des études visant à comparer différentes méthodologies, le résultat n'est pas le même selon la méthode utilisée pour des populations bactériennes soumises à un stress (pH, température, action d'un désinfectant) (Roszak *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1994).

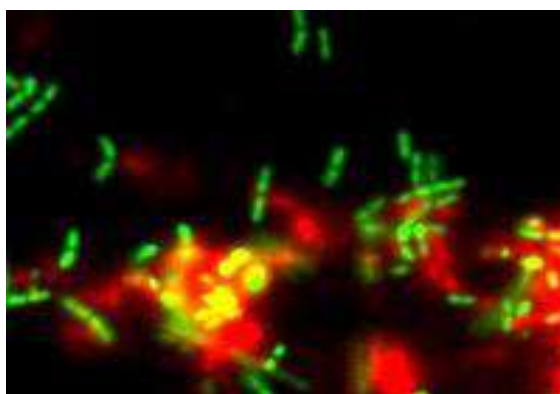
#### **3.1. Les méthodes utilisant la microscopie ou la cytométrie en flux**

La méthode Direct Viable Count (DVC), développée par Kogure *et al.* (1978), cible les bactéries capables de s'allonger. Cette technique consiste à incuber des cellules bactériennes en présence d'extrait de levure qui permet aux bactéries de se développer et d'un antibiotique (exemple l'acide nalidixique pour les bactéries Gram négatif) empêchant la division bactérienne. Les cellules bactériennes ne se divisent pas mais acquièrent une forme allongée détectable par microscopie ou cytométrie en flux. La méthode DVC a été utilisée pour mettre en évidence des flores VNC dans les eaux potables (Byrd *et al.*, 1991) et dans des biofilms (Trachoo *et al.*, 2002).

Le dénombrement des populations viables peut être également réalisé grâce à la mise en évidence d'une activité respiratoire. Les colorants d'oxydoréduction, qui ciblent les bactéries dont la chaîne respiratoire est active, ont la propriété de changer de couleur en fonction de leur état d'oxydation. Le CTC est un colorant d'oxydoréduction qui produit un formazan rouge fluorescent quand il est réduit. Ce colorant cible l'activité respiratoire des bactéries actives et permet de visualiser les cellules par épifluorescence. Des doubles marquages CTC-4',6'-diamidino-2-phénylindole, DAPI ont été utilisés pour dénombrer à la fois la population totale et la population viable (Boulos *et al.*, 1999).

Une autre méthode mettant en évidence l'intégrité membranaire des cellules viables est le kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ce kit comprend

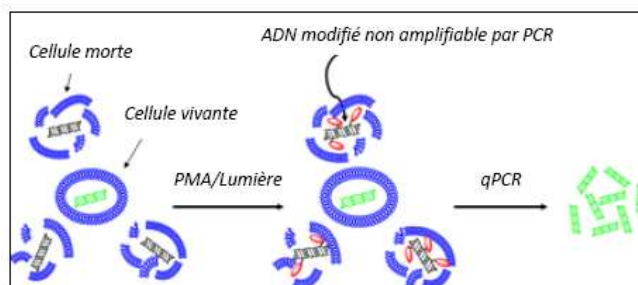
2 marqueurs d'acides nucléiques, le Syto-9 et l'iodure de propidium (IP). Ces deux marqueurs diffèrent dans leur capacité à pénétrer dans les bactéries. Quand il est utilisé seul, le Syto-9, de faible masse moléculaire, peut pénétrer dans toutes les bactéries (mortes et vivantes) et émet une fluorescence verte (spectre d'excitation/émission respectivement de 480/500 nm). En revanche, l'IP ne peut pénétrer que dans les bactéries dont la membrane est suffisamment endommagée, émet une fluorescence rouge (spectre d'excitation/émission respectivement de 490/635 nm) et réduit ainsi la fluorescence émise par le Syto-9 quand les deux marqueurs sont présents (Boulos *et al.*, 1999). En microscopie à épifluorescence, les bactéries viables dont la membrane est intacte apparaissent en vert alors que les bactéries mortes, ayant perdu leur intégrité membranaire, apparaissent en rouge (Figure 1). Boulos *et al.* (1999) comparent cette méthode à celle du marquage au CTC pour la mise en évidence de cellules viables dans des eaux de distribution. Ils concluent qu'en absence de stress, les évaluations des populations viables sont comparables. Par contre après un stress (chloration, changement de température), la population CTC+ est plus faible que celle mise en évidence par le kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>. Selon ces auteurs, les résidus de chlore retrouvés dans les eaux de distribution pourraient influencer l'accumulation des cristaux de formazan et par conséquent diminuer la réduction du CTC. Une autre méthode pour évaluer la viabilité cellulaire consiste à cibler une activité enzymatique estérase non-spécifique au niveau membranaire grâce aux dérivés de la fluoresceïne diacétate (FDA). Les bactéries mortes ne sont pas marquées car les composés ne s'accumulent pas du fait de la dégradation de la membrane (Ritz *et al.*, 2001). Cependant, l'utilisation des dérivés de FDA pour le marquage de communautés microbiennes complexes est peu répandue du fait de la moindre sensibilité des bactéries Gram négatif (Alliot, 1999).



**Figure 1** : *Pseudomonas fluorescens* marqués avec le kit Live/dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability (Source : [http://www.bucher.ch/en/products/fluxion/bioflux\\_applications/microbiology.html](http://www.bucher.ch/en/products/fluxion/bioflux_applications/microbiology.html)).

### 3.2. Les méthodes moléculaires

Parmi les méthodes moléculaires utilisées pour mettre en évidence l'intégrité membranaire des cellules, on cite le monoazoture d'éthidium (EMA) (Rudi *et al.*, 2005) et le monoazoture de Propidium (PMA) (Nocker *et al.*, 2006). L'EMA et le PMA sont des intercalants de l'ADN qui, incorporés à des cellules préalablement à une PCR en temps réel, permettent de quantifier les cellules viables. L'EMA et le PMA vont pénétrer uniquement à l'intérieur des cellules dont la membrane cytoplasmique est endommagée. Une forte exposition à une source lumineuse permet une liaison covalente à l'ADN des cellules mortes. Seul l'ADN appartenant à la population de cellules vivantes sera alors amplifié par PCR en temps réel (Figure 2). Martinon *et al.* (2011) utilisent le PMA couplé à la PCR en temps réel pour quantifier des pathogènes viables (*E. coli*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*) sur des surfaces d'équipements à partir d'une droite standard de quantification. Une étude menée par Lee *et al.* (2009) sur la flore bactérienne du cabillaud a montré que l'EMA permettait une meilleure évaluation de la viabilité cellulaire comparé au PMA. Agustí *et al.* (2010) utilisent l'EMA-PCR pour évaluer la viabilité d'*Helicobacter pylori* dans des échantillons environnementaux. Ces auteurs observent une diminution des cellules viables avec un passage d'une forme bacille à une forme cocoïde dans des conditions de croissance défavorables. Chen *et al.* (2010) étudient la viabilité de *Legionella pneumophila* par EMA-PCR dans les réseaux de distribution d'eau chaude. Ils en concluent que cette méthode s'avère particulièrement intéressante pour un suivi rapide de la contamination des eaux environnementales, mais aussi des eaux chaudes sanitaires et des systèmes de climatisation des tours aéro-réfrigérantes. Outre l'intégrité membranaire, la détection du processus de transcription dans les cellules peut-être effectuée par une reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). La demi-vie d'un acide ribonucléique messager (ARNm) étant très courte, ils sont considérés comme étant de bons marqueurs de viabilité et ont été utilisés dans de nombreuses études (Bleve *et al.*, 2003; Sheridan *et al.*, 1998; Yaron *et al.*, 2002).



**Figure 2** : Principe d'une PMA-qPCR : le PMA va pénétrer uniquement à l'intérieur des cellules dont la membrane cytoplasmique est endommagée. Une forte exposition à une source lumineuse permet une liaison covalente à l'ADN des cellules mortes. Seul l'ADN des cellules vivantes sera alors amplifié par PCR en temps réel (qPCR) (Nocker *et al.*, 2006).



## 4. Les opérations d'hygiène dans les industries agro-alimentaires

### 4.1. Le nettoyage

En industrie agro-alimentaire, le nettoyage a pour objectif de détacher d'une surface les souillures visibles ou invisibles, formées de molécules organiques, minérales et de particules (notamment de micro-organismes) pouvant s'y trouver. Les surfaces ouvertes (sols des ateliers, tapis convoyeurs...) sont accessibles aux interventions humaines, notamment par l'application d'une action mécanique telle que le brossage, le raclage ou de jets (basse, moyenne ou haute pression). Les surfaces fermées, quant à elles, ne sont pas accessibles et doivent subir un Nettoyage En Place (N.E.P). Il s'agit d'un système automatique de nettoyage des installations : les tuyaux, les vannes, les pompes et cuves sont nettoyés par la circulation d'eau, de détergents et éventuellement de désinfectants. L'action mécanique est dans ce cas due aux forces de cisaillement engendrées par les liquides en mouvement (Benezech *et al.*, 1999). Le détergent idéal devrait présenter les propriétés suivantes (Tableau 1) (Jaudon, 2000; Moreau, 1993) :

- ✓ propriété de mouillage des surfaces et des souillures : les tensioactifs entrent en contact avec les souillures et les décolent
- ✓ propriété dissolvante : dispersion des particules dans l'eau en les maintenant en suspension
- ✓ propriété de solubilité : dilution et solubilisation des souillures
- ✓ propriété émulsifiante : élimination de souillures grasses insolubles par la création d'une émulsion avec l'eau de la solution de nettoyage
- ✓ propriété de rinçage et de drainage,
- ✓ propriété de non corrosion,
- ✓ propriété de sécurité à la manipulation.

**Tableau 1** : Contribution à la détergence selon une échelle de 0 (contribution nulle) à 5 (contribution très importante) (Mourcel *et al.*, 1998)

Produits	Propriétés mouillantes et pénétrantes	Dissolution de la matière organique	Propriétés dispersantes et émulsionnantes	Rinçabilité
Soude caustique	1	5	1	1
Métasilicate de sodium	3	3	4	3
Carbonate de sodium	1	2	1	1
Phosphate tri-sodique	2	2	4	3
Poly-phosphates	1	1	3	3

Aucun détergent ne réunit toutes ces propriétés. Le choix d'un détergent efficace paraît donc difficile. Pour s'assurer d'un nettoyage optimal, ce choix doit tenir compte des souillures rencontrées dans les industries (Tableau 2).

**Tableau 2** : Choix du détergent en fonction du type de souillures (Arajo, 2002)

Type de souillures	Détergent
Souillures organiques fraîches	Alcalin moyen, alcalin chloré
Souillures organiques sèches	Alcalin fort
Souillure minérales	Acide

Parmi les différents produits employés dans le nettoyage on cite :

- Les produits alcalins et alcalins chlorés :

Ces produits sont très actifs sur les souillures organiques notamment par les mécanismes de saponification des graisses et la solubilisation des protéines. Les molécules actives les plus employées sont la soude caustique, la potasse caustique, les alcanolamines, les carbonates alcalins, les silicates alcalins, les phosphates alcalins et les poly-phosphates (Vincent, 1999). Cependant, ces molécules n'ont pas toutes les mêmes propriétés (Tableau 1). Les détergents alcalins peuvent présenter des effets indésirables notamment une mauvaise rinçabilité et une corrosion des surfaces (excepté les silicates qui sont même de bons protecteurs des surfaces). Par ailleurs, l'alcalinité favorise la formation de tartre, source de corrosion des matériaux, d'où la nécessité de l'ajout d'antitartre.

- Les produits acides :

Ils servent à éliminer le tartre formé au cours du temps ou suite à des rinçages avec de l'eau dure et à passiver certains matériaux comme l'acier inoxydable en régénérant une couche d'oxyde de chrome. Les molécules actives les plus utilisées sont l'acide phosphorique, l'acide nitrique, l'acide lactique, l'acide sulfamique et l'acide citrique. Les acides minéraux sont fortement corrosifs. Les acides organiques (acide citrique) sont à préférer car moins corrosifs et ont un pouvoir anti-tartre plus important.

- Les produits neutres - Les tensio-actifs ou agents de surfaces :

Composés organiques à action physique, ils améliorent l'action des produits alcalins et acides grâce à leurs propriétés mouillantes, émulsifiantes, dispersantes, moussantes et leur pouvoir de pénétration dans les fissures (Vincent, 1999). Il existe quatre types de tensio-actifs :

- les tensio-actifs anioniques : ce sont de bons mouillants, émulsionnants et dispersants. En outre, ils moussent beaucoup, ce qui peut être intéressant pour l'application sous forme de mousse.
- les tensio-actifs cationiques : leur aptitude détergente est moyenne, par contre, en raison de leur activité bactéricide, ils sont plutôt employés dans les formules désinfectantes.
- les tensio-actifs non-ioniques : comme les premiers, ce sont de bons détergents. Peu moussants, l'application préférentielle est la pulvérisation.
- les tensio-actifs amphotères : Ils sont à la fois détergents (pôle anionique) et bactéricides (pôle cationique). Ces agents peuvent par ailleurs prévenir les dépôts minéraux.

- Agents anti-précipitants :

Ce sont des anti-tartres. Ils ont des performances variables, aussi le choix d'un agent anti-tartre plutôt qu'un autre doit être en adéquation avec les caractéristiques du détergent et avec ses conditions d'emploi. Il existe deux catégories d'agents anti-précipitant :

- les séquestrants (exemple : l'acide éthylène diamine tétraacétique, EDTA) : ils agissent en se fixant aux ions alcalino-terreux responsables de la dureté de l'eau et aux métaux. Cette fixation empêche la précipitation des sels de calcium et de magnésium et leurs dépôts sous forme de tartre. Les séquestrants sont très solubles dans les formulations liquides de détergents mais leur concentration doit y être élevée car, à faible dose, ils ne sont pas de très bons anti-précipitants.
- les dispersants (exemple : polyacryliques) : ils agissent par dispersion des sels de calcium et de magnésium. Ainsi, même si parfois des cristaux insolubles ont pu se former, ils ne peuvent plus s'incruster à la surface. Les dispersants ont l'avantage d'être efficaces à faible dose, leur association avec des produits fortement alcalins et/ou caustiques est intéressante. L'inconvénient est qu'ils sont onéreux.
- les inhibiteurs de corrosion (exemple : les silicates) : Ils forment un film protecteur à la surface du matériau, différant à plus ou moins long terme l'usure de ce dernier.

- Les enzymes :

Les contraintes environnementales liées aux rejets de la filière agro-alimentaire deviennent de plus en plus sévères, forçant les industriels à remettre en question leurs méthodes de nettoyage. Les enzymes sont des protéines naturelles produites par toutes les cellules vivantes. Elles agissent en tant que biocatalyseurs et peuvent permettre des réactions très spécifiques dans des conditions douces (pH voisin de la neutralité, température comprise entre 0 et 40°C, pression voisine de la pression atmosphérique). En agroalimentaire, les protéases et les lipases sont les plus utilisées. Les premières agissent seulement sur les souillures protéiques (œufs, sang) alors que les secondes dégradent les huiles et les graisses (Vincent, 1999). Une étude comparative d'un détergent enzymatique et d'un alcalin chloré sur des supports colonisés par une suspension d'*E. coli* ( $10^8$  UFC/mL) a montré qu'aucun germe ne subsistait sur la plaque après traitement par le détergent enzymatique alors que des cellules persistaient sur la plaque traitée avec l'alcalin chloré. En effet, les composés responsables de la formation du biofilm notamment les glycoprotéines sont facilement hydrolysées par les enzymes (Haroux, 1999). Une étude menée par Lequette *et al.* (2010) a abordé l'efficacité de détachement de biofilms par des enzymes protéolytiques et des polysaccharidases. Il en ressort que les sérines protéases favorisent un meilleur détachement des biofilms de *Bacillus* que les polysaccharidases alors que l'inverse est observé pour des biofilms de *P. fluorescens*. Ces auteurs soulignent l'efficacité du nettoyage enzymatique combiné à des agents surfactants, chélateurs et dispersants comme alternative au nettoyage chimique.

En conclusion, le nettoyage par voie enzymatique est une réponse utile pour la réalisation des opérations d'hygiène en remplacement des détergents alcalins ou alcalins chlorés. Bien que les détergents enzymatiques aient du mal à s'imposer en milieu industriel, cependant, cette technologie permet d'obtenir une hygiène à la fois plus respectueuse pour l'environnement, les systèmes d'épuration biologique, et plus douce pour le matériel, les locaux et l'homme.

## 4.2. La désinfection

La directive communautaire n° 98/8/CE met en place un régime d'autorisation de mise sur le marché des produits biocides, famille à laquelle appartiennent les désinfectants, sur le territoire européen. Seuls les produits dont l'efficacité est prouvée et qui ne présentent pas de risques inacceptables pour l'homme, pour les animaux, et pour l'environnement pourront être vendus à l'avenir. Les mesures visent notamment à prévenir les effets cancérigènes et toxiques à long terme. Dans un premier temps, ce sont les substances actives qui sont concernées. On entend par substance active toute substance, micro-organismes, virus ou champignon, exerçant une action

générale ou spécifique sur ou contre les organismes nuisibles. La procédure d'évaluation des substances actives se fait au niveau communautaire et conduit à l'inscription ou non de ces substances actives sur des annexes de la Directive 98/8/CE dites "listes positives". Dans un second temps, seuls les produits biocides contenant des substances actives inscrites sur ces « listes positives » pourront obtenir une autorisation de mise sur le marché au niveau national.

La désinfection a pour objectif de détruire ou d'inactiver tous germes encore présents sur une surface inerte à la suite d'une étape de nettoyage. L'intérêt de l'étape de nettoyage est d'augmenter l'efficacité des produits désinfectants qui peuvent être partiellement neutralisés par la matière organique. Les critères d'un désinfectant idéal sont les suivants (Jaudon, 2000) :

- large spectre d'activité,
- utilisable à faible concentration,
- action durable,
- sans danger pour l'utilisateur,
- ne laisse aucun résidu.

Les principaux produits de désinfection utilisables en industries agro-alimentaires sont :

- Les halogènes
  - les composés chlorés: le plus connu est l'hypochlorite de sodium (eau de javel), mais il en existe d'autres (chloramines, acides chlorocyanuriques, ...). Les générateurs d'acide hypochloreux sont de très bons bactéricides et virucides. Ces composés sont efficaces sur les spores mais leur activité fongicide est peu marquée (Criquelion *et al.*, 1999). Par contre, ils sont très instables à la chaleur et à la lumière et leur efficacité diminue en présence de matières organiques. Ils sont corrosifs et les émanations gazeuses sont dangereuses pour les muqueuses respiratoires de l'opérateur.
  - les produits iodés : Ils sont très actifs à faible dose et exhibent un large spectre d'activité (bactéricide, virucide, fongicide et sporicide) et une faible toxicité. Leur emploi est préconisé en milieu acide (pH 3-5) en combinaison avec de l'eau froide (température < 40°C). Les produits iodés ont une utilisation limitée dans les industries. Ils sont instables à la chaleur, se rincent difficilement et laissent des traces de coloration jaunâtre sur les surfaces.
- Les oxydes et peroxydes :

Ce sont des molécules oxydantes dont la plus fréquente en désinfection est l'acide peracétique qui possède un large spectre d'action à faible concentration. Il agit sur les micro-organismes en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire. La vapeur de l'acide peracétique est

caractérisée par sa faible stabilité avec une demi-vie d'environ 20 minutes, donc peu de risque de bioaccumulation. Ce composé est de plus en plus utilisé en entreprises car il est compatible avec beaucoup de matériaux (acier inoxydable, Polychlorure de vinyle PVC, polyéthylène) et a l'avantage d'être peu toxique.

- Les ammoniums quaternaires :

Stables et non-corrosifs, ce sont des molécules amphiphiles qui agissent comme détergents cationiques. Ils sont largement utilisés pour la désinfection des surfaces ouvertes, notamment lorsque ces dernières ne sont pas adaptés aux désinfectants oxydants. Leur aptitude à mousser les rend intéressants pour leur application sur les surfaces. Les ammoniums quaternaires présentent cependant plusieurs désavantages : ils sont bactéricides mais leur activité virucide et sporicide est faible voire nulle. Pour compenser ce manque, leur association synergique avec des aldéhydes et/ou des phénols est souvent pratiquée. Les souillures protéiques ainsi que la dureté de l'eau réduisent fortement l'efficacité de ces composés.

- Les aldéhydes (formaldéhydes et glutaraldéhydes) :

Ils provoquent une dénaturation des acides nucléiques et des protéines des micro-organismes. Leur activité diminue en présence d'une solution alcaline. Le formaldéhyde n'est actuellement plus utilisé dans les industries car il est suspecté cancérigène. Le glutaraldéhyde présente un spectre d'activité large. En industries, il est utilisé en association avec des ammoniums quaternaires.

### **4.3. Les opérations d'hygiène dans les industries**

Le nettoyage et la désinfection des locaux sont réalisés quotidiennement, à la fin de la journée de travail. Ils peuvent être effectués par un personnel de l'industrie ou sous-traités à une société extérieure. Les principales étapes du nettoyage-désinfection sont :

- Le pré-nettoyage : cette étape consiste à éliminer les gros résidus le plus souvent par un raclage ou par un prélavage à l'eau sous moyenne pression. Cette phase de pré-nettoyage est importante car elle permet d'éliminer les souillures faiblement accrochées aux surfaces et de concentrer l'action ultérieure du détergent de la phase de nettoyage sur les souillures résiduelles difficiles à enlever.
- Le nettoyage : consiste à appliquer un détergent basique ou enzymatique afin d'éliminer les souillures organiques présentes sur les surfaces qui n'ont pas pu être éliminées lors du

pré-nettoyage. Un détergent acide n'est appliqué que lorsqu'il s'agit d'éliminer les souillures minérales.

- Un rinçage intermédiaire : il consiste en un entraînement par l'eau des liquides résultants du nettoyage ce qui permet d'éliminer les souillures résiduelles qui ont été décollées du support par le détergent. La propreté est visuelle.
- La désinfection : l'application du produit désinfectant s'effectue le plus souvent par pulvérisation sur les surfaces ouvertes. Les produits sont laissés en contact en fonction des indications du fabricant (20 à 30 minutes en général).
- Un rinçage final : il s'effectue à l'eau potable. L'arrêté du 27 octobre 1975 précise qu'un rinçage final est obligatoire après l'utilisation d'un produit désinfectant sur les surfaces en contact avec les aliments.
- Le séchage : tout doit être mis en œuvre pour favoriser le séchage des surfaces. L'élimination de l'eau en excès est réalisée par écoulement grâce aux pentes des équipements et des sols. Le séchage des surfaces peut aussi être effectué grâce à un déshumidificateur destiné à réduire le taux d'humidité de l'air.

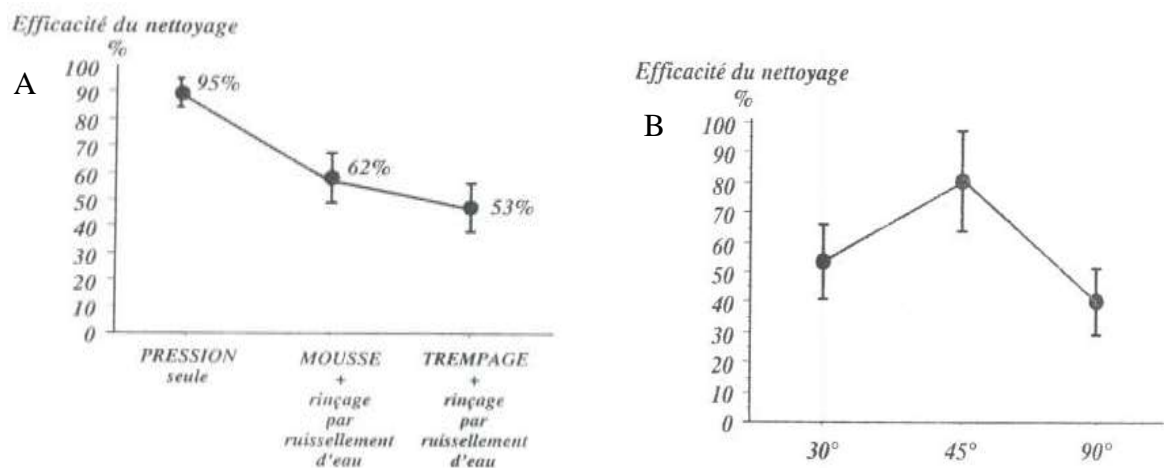
Le nettoyage complet en 6 étapes présente l'inconvénient d'être long et coûteux. Pour des opérations d'hygiène plus rapides, il est possible de combiner les phases de nettoyage / désinfection. Cette opération permet un gain de temps considérable en matière de temps, d'énergie et de main-d'œuvre. Ce procédé est cependant moins efficace pour de nombreux désinfectants qui voient leur efficacité diminuer en présence de matières organiques, et n'est applicable que dans le cas où le degré de souillure se trouve à un niveau relativement bas (réfrigérateurs de produits emballés par exemple). Ce procédé est aussi appliqué en fromagerie où on cherche à maintenir une flore technologique sur les surfaces mais aussi en restauration collective où la nature du produit alimentaire mis en œuvre a une durée de vie commerciale courte.

#### **4.4. Efficacité des procédures d'hygiène**

L'efficacité du nettoyage dépend de quatre facteurs principaux :

- La température de l'eau de nettoyage : le nettoyage à l'eau chaude est plus efficace. En effet, l'eau à température élevée accélère les réactions chimiques qui se produisent entre les produits de nettoyage et les souillures et favorise donc le décrochement de ces derniers. Par contre, une température trop élevée présente de nombreux inconvénients, en particulier la coagulation des souillures protéiques difficiles à enlever, ainsi que la formation de buées et de brouillard.

- L'action mécanique : elle peut être obtenue par brossage, grattage ou par jet d'eau sous pression. Dans l'industrie de viande, le nettoyage à la pression permet d'obtenir une action mécanique intéressante pour enlever les souillures (Figure 3A). Par contre, il produit une quantité d'aérosol importante. Une étude menée par Frencia (1998) sur des prélèvements d'air effectués dans un « frigo » d'abattoir a montré que la contamination de l'air est multipliée par 10 à 100 lorsqu'il y a formation d'aérosol pendant le nettoyage. La quantité d'aérosol formé est maximale lorsque l'angle entre le jet et le support est de 45°C (Figure 4) : C'est cette inclinaison qui procure le maximum d'efficacité pour détacher les souillures (Figure 3B).
- Le temps d'action de la solution détergente : Il est particulièrement important dans le cas du nettoyage à la mousse qui permet un temps de contact plus long sur les surfaces non horizontales. Le temps d'action est précisé sur la fiche technique de chaque produit. Généralement, il est de l'ordre de 20 à 30 minutes.
- Le choix des détergents : Il repose sur la compréhension du mécanisme de détergence qui met en œuvre des actions physico-chimiques diverses (Cf. § 4.1 p 226).

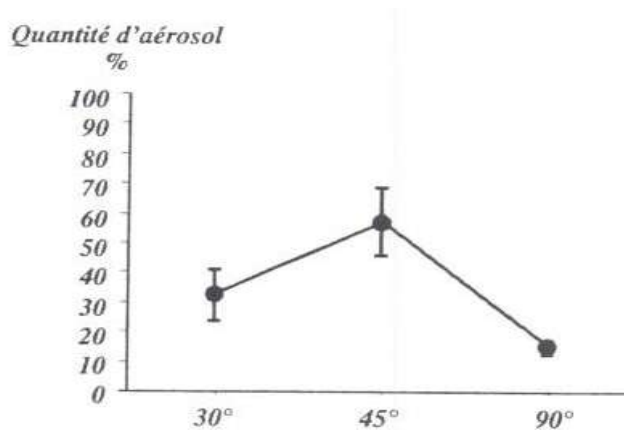


**Figure 3** : Effet du jet sous pression (A) et de l'inclinaison du jet (B) sur l'efficacité de nettoyage (Frenchia, 1998).

$$\text{Efficacité} = \frac{\text{quantité souillure avant nettoyage} - \text{quantité souillure après nettoyage}}{\text{quantité souillure avant nettoyage}} \times 100$$

La quantité de souillures mesurée avec la méthode des colorants fluorescents mise au point par l'ADIV est le nombre de pixels fluorescents avant et après nettoyage calculé à partir d'un logiciel d'analyse d'images.





**Figure 4 :** Influence de l'inclinaison du jet sur la quantité d'aérosol formé durant les opérations d'hygiène (Frenchia, 1998).

## 5. «Résistance» des bactéries aux produits d'hygiène

La « résistance » est un terme fréquemment employé dont la définition fait l'objet de nombreuses discussions, en fonction des domaines d'études impliqués. Selon Cerf *et al.* (2010), une souche bactérienne est « résistante » à un désinfectant, si la relation temps-concentration nécessaire pour obtenir un certain nombre de réductions décimales est plus importante que celle évaluée dans une population de référence par la même méthode. Ces mêmes auteurs emploient le terme « tolérance » pour désigner la capacité d'un micro-organisme à croître à des concentrations normalement inhibitrices du désinfectant. L'étude des micro-organismes adhérents sur les surfaces a mis en évidence qu'une proportion de ces cellules présentaient une meilleure résistance aux agents antimicrobiens que les cellules en suspension (Carpentier, 2009). Bourion et Cerf (1996) ont montré que la résistance aux désinfectants différait de façon importante selon la nature de la surface, la concentration du désinfectant, la structure et l'âge du biofilm. Par ailleurs, des souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont devenues « tolérantes » aux ammoniums quaternaires après expositions répétées à des concentrations croissantes du produit (Jones *et al.*, 1989; Langsrud *et al.*, 1997).

Une étude menée par Jacquet *et al.* (1994) montre que *Listeria monocytogenes* n'était guère plus résistante que d'autres espèces bactériennes à des concentrations bactéricides de désinfectant. Par ailleurs, des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) élevées ont été observées sur des souches de *Listeria monocytogenes* de sérotype 1/2 d'origine alimentaire (4 souches) et environnementale (3 souches) (Mereghetti *et al.*, 2000). Cependant, il n'est guère évoqué si cette «tolérance» est acquise après exposition des souches aux concentrations préconisées par le fabricant. Selon Lelieveld *et al.* (2003), la « tolérance » peut être liée à une mauvaise utilisation en

pratique du désinfectant, c'est-à-dire un non respect par l'utilisateur des conditions d'utilisation (concentration, température, pH, temps de contact...). Ceci a été observé chez des souches de Salmonelles qui sont devenues tolérantes au chlore utilisé à des concentrations inappropriées pour la désinfection de légumineuses (Mokgatla *et al.*, 2002; Zhuang *et al.*, 1995).

## **B. Méthodes appliquées à l'étude des bactéries des surfaces**

### **1. Prélèvement des bactéries sur les surfaces**

Les prélèvements de surface sont indispensables pour permettre aux industriels de contrôler la contamination des équipements et des locaux afin de valider les opérations d'hygiène appliquées pour l'élimination des bactéries. De nombreuses méthodes d'évaluation de la contamination microbienne sont décrites et sont comparées comme par exemple l'écouvillonnage/chiffonnage, les empreintes par gélose ainsi que les ultrasons.

#### **1.1. Méthodes de prélèvement sur terrain**

##### **1.1.1. Frottis**

###### **a- Ecouvillon**

Le frottis est réalisé au moyen d'un écouvillon en coton ou en alginate stérilisé préalablement humidifié avec du neutralisant, de l'eau physiologique, de l'eau peptonnée ou une solution de Ringer 1/4. Pour l'énumération des micro-organismes détachés, un milieu gélosé peut être ensemencé directement par l'écouvillon mais les résultats obtenus par cette technique ne sont pas toujours fiables (Moore *et al.*, 2002). Une autre méthode consiste à placer l'écouvillon dans un volume approprié de diluant qui est agité, ce qui va permettre de désagréger au moins partiellement les microcolonies si elles sont présentes (Gilbert, 1970) mais aussi de faire des dilutions si nécessaire. Une étude menée par Moore *et al.* (2001) a montré que sur des surfaces humides, l'écouvillon en coton permettait une meilleure récupération des bactéries comparé à l'écouvillon en alginate. En effet, le coton est principalement composé de cellulose, capable d'absorber une plus grande quantité de liquide résiduel sur les surfaces.

## **b- Chiffonnage**

Pour des surfaces supérieures à 100 cm<sup>2</sup>, l'emploi d'une chiffonnette ou d'une éponge contenue dans un sachet stérile et scellé est préconisé. Du neutralisant peut être ajouté dans la chiffonnette pour éviter un effet inhibiteur du désinfectant qui peut éventuellement être encore présent sur les surfaces. Après échantillonnage de la surface à analyser, du diluant est ajouté au sachet qui est traité dans un homogénéisateur péristaltique. Des boîtes de milieux de culture sont ensuite ensemencées avec la suspension mère et ses dilutions puis incubées pendant la durée et à la température appropriées.

Une étude comparative menée par Deberghes *et al.* (1995) a montré que 79% des dénombrements obtenus à partir des prélèvements à l'éponge étaient supérieurs à ceux obtenus à partir de prélèvements à l'écouvillon. En effet, l'éponge ou la chiffonnette, en raison de leur bonne préhension et leur grande capacité d'absorption, sont efficaces pour l'échantillonnage des grandes surfaces, l'écouvillon restant irremplaçable pour les prélèvements effectués dans des recoins ou à l'intérieur d'appareils. Cette technique est difficile à standardiser car on ne contrôle ni la force appliquée pour le frottement ni l'angle entre la surface contaminée et l'écouvillon (Gonzales, 1995).

### **1.1.2. Empreintes par application d'une gélose**

Les empreintes des surfaces sont effectuées par application d'une gélose sur la surface. Une gélose nutritive est coulée dans une boîte de type RODAC<sup>®</sup> ou ATL<sup>®</sup>. Le volume coulé doit être légèrement supérieur à celui de la boîte de façon à obtenir un ménisque bombé permettant le contact de la gélose avec la surface à analyser. Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients :

- Le nombre réel de micro-organismes est sous-estimé
- Le nombre de colonies obtenues sur la boîte doit être inférieur à 200
- Les empreintes par gélose ne peuvent pas s'appliquer sur des surfaces non planes.

D'après la norme NF ISO 18593, les empreintes gélosées nécessitent un temps de contact de 10 secondes avec la surface à analyser et une pression telle que celle exercée par une masse de 500 g (Anonyme, 2004). Gonzales (1995) a montré une meilleure récupération des micro-organismes avec un temps de contact d'une minute. Actuellement, des applicateurs pour boîte contact de type ATL<sup>®</sup> conformes à la norme NF ISO 14698-1 (Anonyme, 1999) en vigueur sur les prélèvements de surface en agroalimentaire permettent de standardiser les prélèvements microbiologiques. Le principe consiste à clipser une boîte contact sur l'applicateur et à appliquer le milieu gélosé sur la

surface à contrôler. Une pression est exercée sur le dessus de l'applicateur provoquant le clignotement d'un LED lumineux pendant 10 secondes. A son extinction, l'applicateur est retiré et le couvercle remis immédiatement sur la boîte. Les géloses sont ensuite incubées à la température optimale des bactéries recherchées puis les colonies dénombrées.

Les empreintes de surfaces peuvent aussi s'effectuer par application d'une lame gélosée ou de Pétrifilms<sup>®</sup>. Les lames gélosées consistent en un support rectangulaire dont les deux faces sont recouvertes d'une gélose nutritive choisie en fonction du type de micro-organisme à dénombrer. Les Pétrifilms<sup>®</sup> sont constitués de deux membranes entre lesquelles se trouve un film rigide quadrillé qui sert de support à un milieu gélifié approprié. Le film supérieur des Pétrifilms<sup>®</sup> est appliqué sur les surfaces contaminées en évitant tout contact du film inférieur avec cette même surface. Les Pétrifilms<sup>®</sup> sont ensuite incubés et les micro-organismes se développent entre les deux films.

## **1.2. Méthodes de prélèvement au laboratoire : cas des ultrasons**

Les ultrasons sont des ondes mécaniques de pression ayant une fréquence supérieure à la plage de fréquences audibles par l'homme. Quand elles se propagent dans un milieu liquide à travers une alternance de compression-dépression, des microbulles se forment : c'est ce qu'on appelle la cavitation (Boistier-Marquis *et al.*, 1999). Le traitement par les ultrasons consiste à immerger des échantillons de surfaces contaminées dans des flacons remplis de solution (comme par exemple de l'eau peptonnée). Ces flacons sont mis dans des bains de sonication qui fonctionnent à une haute fréquence (18-55KHz) (Jeng *et al.*, 1990). Une étude menée par Oulahal *et al.* (2000) sur des coupons en acier inoxydable a montré que le détachement d'un biofilm traité par une sonotrode à 40 KHz (200W) pendant 10 secondes était quatre fois plus important que le détachement obtenu par écouvillonnage. De plus, il a été montré un effet bénéfique des ultrasons couplés à des composés enzymatiques et des agents chélateurs sur le détachement de biofilms d'*E. coli* et de *S. aureus* (Oulahal *et al.*, 2006). Masurovsky *et al.* (1960) ont testé les ultrasons sur divers matériaux utilisés au contact du lait, souillés avec des suspensions de *Staphylococcus aureus*. Leur conclusion est que l'efficacité des ultrasons dépend de la concentration en germes, de l'état des surfaces et de la durée d'action des ultrasons. Puleo *et al.* (1967) ont testé l'efficacité des ultrasons sur des surfaces d'acier et de verre naturellement et/ou artificiellement contaminées par des spores de *Bacillus subtilis*. Leurs résultats montrent que l'exposition de ces échantillons à l'énergie des ultrasons dans de bonnes conditions (surfaces contaminées trempées dans un fluide de rinçage froid et placées au fond du bain à ultrason, face contaminée vers la source d'énergie) est une bonne méthode pour détacher les bactéries des surfaces ou des écouvillons par comparaison à une

agitation mécanique. Asséré *et al.* (2008) montrent un effet létal des ultrasons sur des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* et de *Leuconostoc mesenteroides* à 28 KHz (150W) pendant 10 minutes. En revanche, un traitement de 4 minutes avec le même équipement apparaît comme le meilleur traitement pour détacher les bactéries sans les tuer.

## **2. Quantification bactérienne**

### **2.1. Par culture**

En 1881, Koch fut le premier à décrire l'utilisation de pommes de terre bouillies comme milieu de culture solide. A cette époque, c'était la gélatine (protéine issue des os et du cartilage) qui était utilisée pour gélifier les milieux de culture. Cependant, beaucoup de bactéries étaient capables de dégrader la gélatine par leurs enzymes protéolytiques ce qui rendait la lecture des milieux impossible. C'est alors que les recherches se sont tournées vers des agents gélifiants biologiques comme l'agar qui n'est pas dégradé par les bactéries. Actuellement, il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes à identifier. A titre d'exemple, le milieu Chapman est un milieu sélectif utilisé surtout en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles tels *Staphylococcus* et *Micrococcus* (Cotte *et al.*, 2006). La gélose au cétrimide permet l'isolement des *Pseudomonas* (Brown *et al.*, 1965) et favorise aussi la production de pigments par *P. aeruginosa*. La gélose Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. La gélose Tryptone Soya Agar TSA, est un milieu non sélectif permettant la culture des bactéries peu exigeantes.

### **2.2. Sans culture : PCR en temps réel**

#### **2.2.1. Nature exponentielle de la réaction PCR**

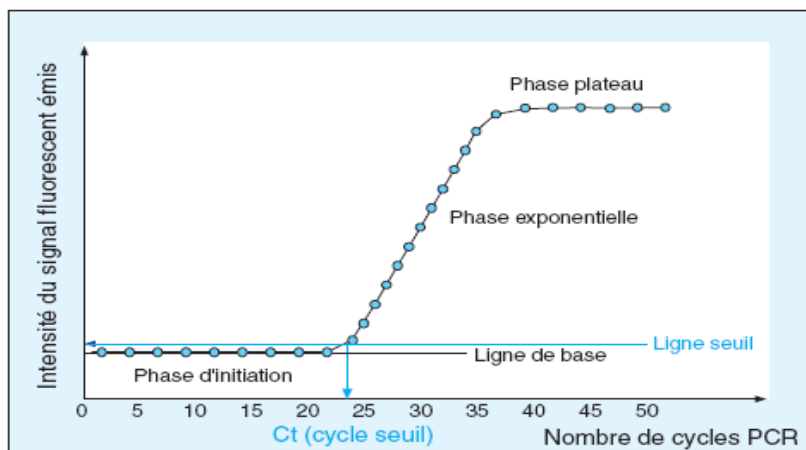
La PCR est par définition une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits formés servent de matrice au cycle suivant. A chaque cycle, la quantité d'ADN double. De façon théorique, en partant de deux brins d'ADN initiaux on obtient 4 segments d'ADN à la fin du premier cycle, 8 à la fin du second cycle, et ainsi jusqu'à  $2^n$  après  $n$  cycles. La quantité de produits de PCR à chaque cycle suit la relation mathématique :

$$N=N_0 \times (2)^n \quad [1]$$

où N est le nombre de molécules amplifiées en fin de réaction,  $N_0$  le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification.

La cinétique d'une réaction de PCR se décompose en 3 phases (Figure 5) :

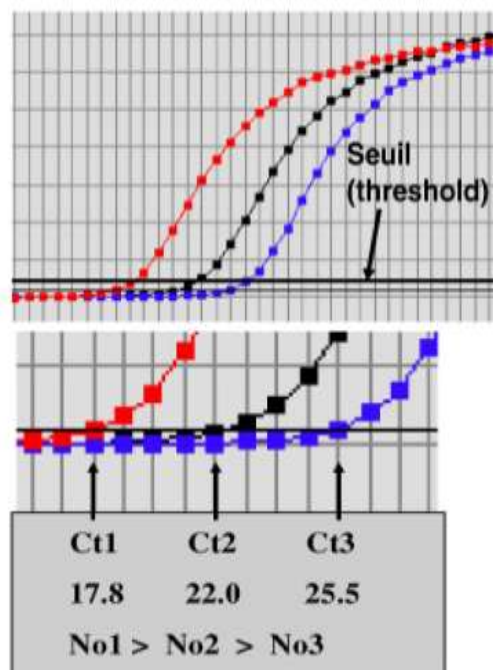
- La phase d'initiation
- La phase exponentielle de synthèse, observable quand une quantité suffisante de produits de PCR a été accumulée pendant la phase d'initiation
- La phase plateau, lorsque les constituants de la PCR (en particulier la *Taq* polymérase) deviennent limitants



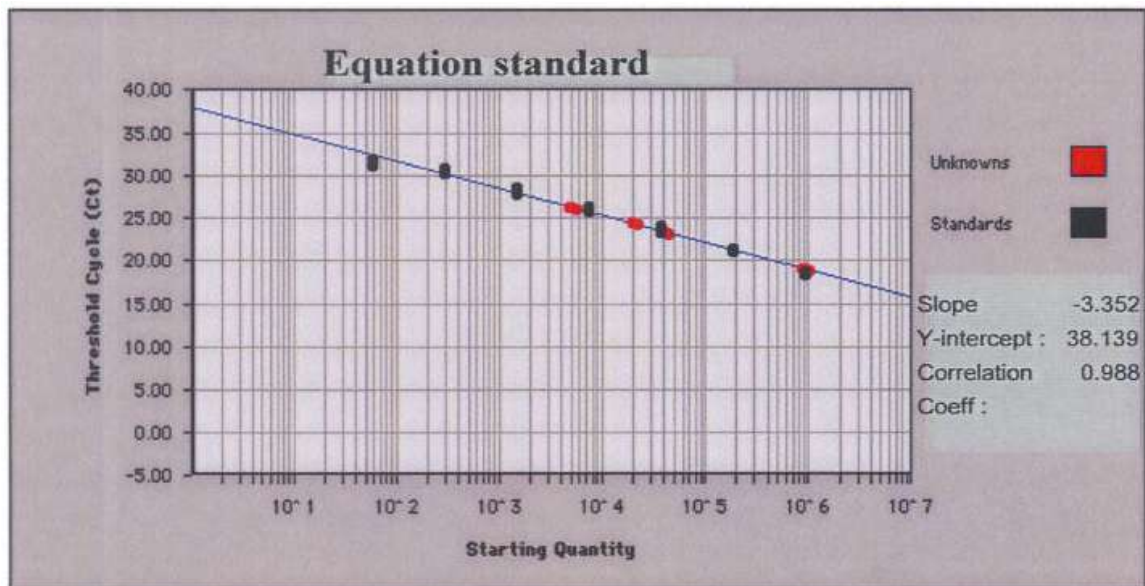
**Figure 5 :** Suivi en temps réel d'une réaction de PCR qui permet de montrer que la cinétique d'amplification met en jeu 3 étapes (Tse *et al.*, 2003).

Le principe de la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule reporter fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée à un moment donné au cours de chaque cycle PCR. L'intensité de la fluorescence émise par la molécule reporter augmente à chaque cycle PCR. Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe caractérisant les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en un point de la phase exponentielle (Figure 6). C'est uniquement au cours de cette phase qu'il sera possible d'extrapoler la quantité de matrice cible initialement présente avant amplification. La figure 6 montre différentes cinétiques d'amplification pour des PCR en temps réel réalisées à partir de 3 quantités différentes. Ce qui est utilisé pour caractériser chaque PCR ce n'est ni l'allure de la phase exponentielle ni la hauteur de la phase plateau, mais la longueur de la phase d'initiation. Cette façon de caractériser chaque PCR

a conduit à calculer exactement le nombre de cycles correspondants à une phase exponentielle détectable. Ce point de départ de la phase exponentielle est appelé cycle seuil ou  $C_t$  (threshold cycle) qui correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour obtenir un signal fluorescent significativement plus élevé que le bruit de fond. Nous remarquons dans la figure 6 que les  $C_t$  pour chacune des trois PCR sont différents. D'une façon générale, nous pouvons dire que les  $C_t$  sont plus grands quand les quantités d'ADN sont plus petites : la valeur du  $C_t$  se trouve être inversement proportionnelle au logarithme du nombre ( $N_0$ ) de molécules d'acides nucléiques initialement présentes. La détermination des  $C_t$  d'une série d'amplification d'ADN de quantités connues ( $N_0$ ) permet de tracer la courbe  $C_t = f(\text{Log } N_0)$  (Heid *et al.*, 1996) (Figure 6).



**Figure 6 :** Variation des cycles seuil ( $C_t$ ) en fonction de la quantité initiale d'ADN ( $N_0$ ) présente dans le tube PCR. Les démarrages plus ou moins tardifs de la phase exponentielle représentée par les différentes valeurs de  $C_t$  sont directement fonction de la quantité initiale  $N_0$ . La courbe rouge représente l'amplification d'un produit 10 fois plus abondant que la courbe noire et 100 fois plus que la courbe bleue.



**Figure 7** : Droite de quantification réalisée avec des dilutions au 10<sup>ème</sup> en série à partir d'un ADN standard  
 • L'intégration des Ct des échantillons inconnus • dans la droite de standardisation permet de déterminer le N<sub>0</sub> initial.

### 2.2.2. Efficacité d'amplification

Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur qui est l'efficacité d'amplification (E) définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. L'efficacité d'amplification est comprise entre 0 (aucune amplification ne s'est produite) et 1 (après chaque cycle PCR, chaque molécule d'ADN cible a généré deux amplicons). L'introduction de ce facteur essentiel qu'est l'efficacité d'amplification (E) conduit à l'équation suivante :

$$N = N_0 \times (1 + E)^n \quad [2]$$

Convertie sous forme logarithmique, cette équation a pour expression :

$$\text{Log } N = \text{Log } N_0 + n \cdot \log (1 + E) \quad [3]$$

A partir de l'équation [3] et en tenant compte des paramètres de la droite qui met en relation les Ct avec les quantités initiales (N<sub>0</sub>), il est alors possible de calculer  $E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$ .

De nombreux facteurs expérimentaux peuvent affecter l'efficacité d'amplification tels le choix des amorces, les concentrations en désoxynucléosides triphosphates (dNTPs), en MgCl<sub>2</sub> et en ADN polymérase, la température, la structure secondaire, le contenu en bases Guanine/Cytosine (G/C) de la séquence cible et la longueur du fragment à amplifier (Tse *et al.*, 2003).

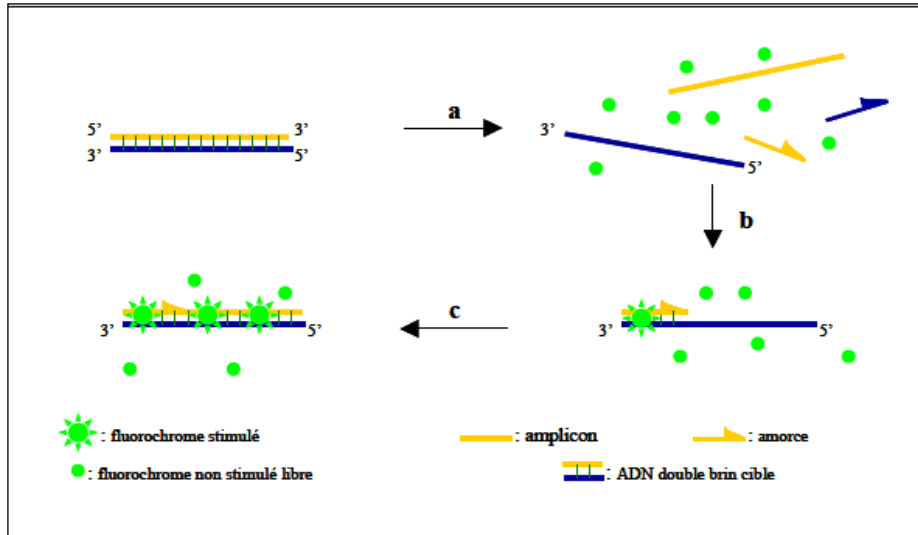


### 2.2.3. Les systèmes de détection

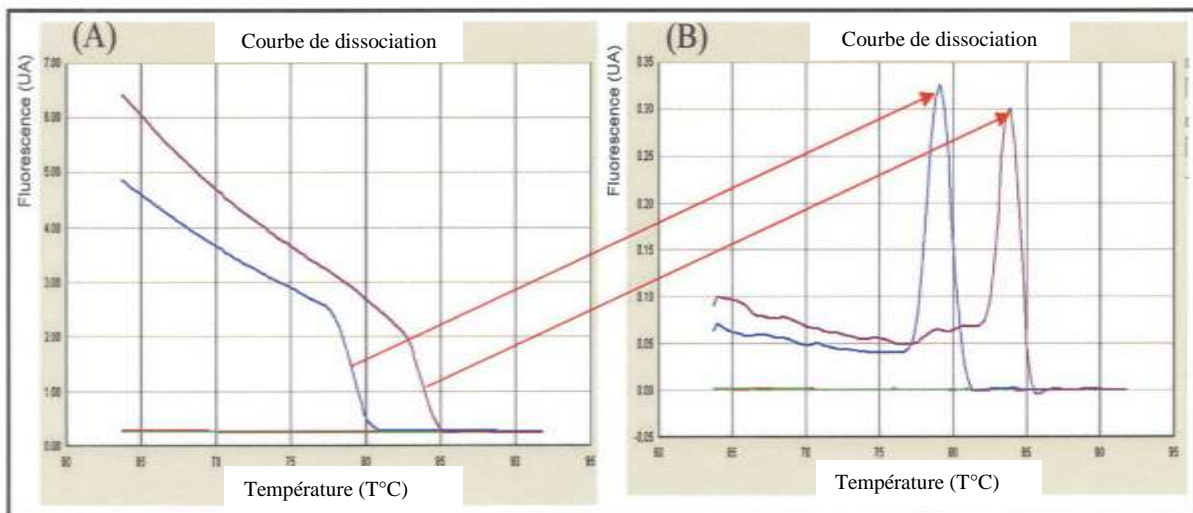
Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR<sup>®</sup>-Green) et les sondes fluorescentes qui vont s'hybrider de manière spécifique sur le fragment cible amplifié.

#### a- Les agents intercalant : cas du SYBR<sup>®</sup>-Green

Le SYBR<sup>®</sup>-Green est un agent intercalant qui se lie à l'ADN bicaténaire néosynthétisé. (Schneeberger *et al.*, 1995). A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBR<sup>®</sup>-Green s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets (Figure 8). La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR. Le système est facile à utiliser, de faible coût, mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces. L'inconvénient est que le SYBR<sup>®</sup>-Green marque toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. Des études ont montré que le SYBR<sup>®</sup>-Green se liait préférentiellement aux amplicons riches en nucléotides G et C (Giglio *et al.*, 2003) et que sa dégradation engendrait des produits capables d'inhiber la PCR (Karsai *et al.*, 2002). Néanmoins, la spécificité d'une réaction PCR utilisant le système SYBR<sup>®</sup>-Green peut être testée par l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR. Le principe consiste à vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié : les amplicons sont soumis à une température croissante de 55°C à 95°C. Cette élévation de température va provoquer la dénaturation progressive des ADN doubles brins libérant le SYBR<sup>®</sup>-Green piégé. Le point d'inflexion de la courbe de fluorescence représente la température de fusion (T<sub>m</sub>) spécifique du fragment. L'analyse des courbes de dissociation (un seul pic sur la courbe B) permet de valider les conditions de la PCR et le choix des amorces (Figure 9).



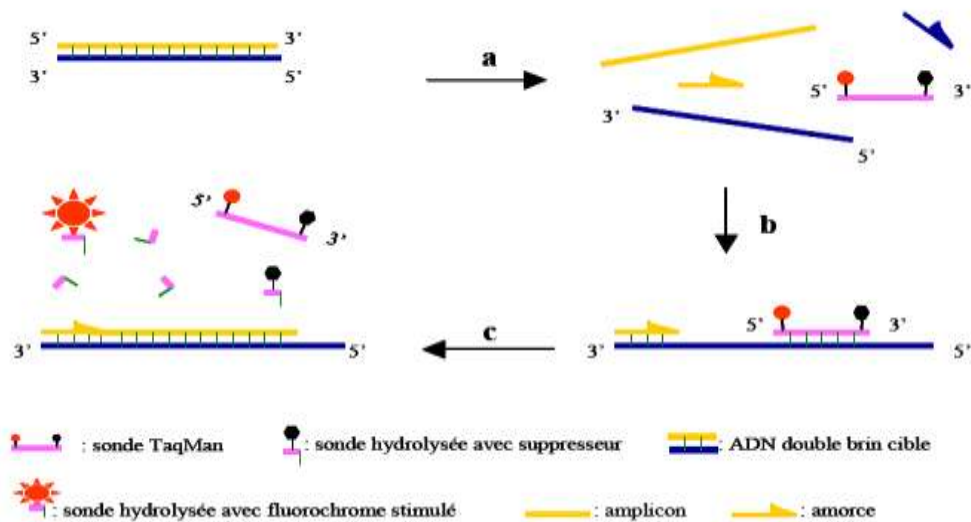
**Figure 8 :** Agent SYBR<sup>®</sup>-Green se liant à l'ADN double brin. (a) Durant la dénaturation, le SYBR<sup>®</sup>-Green libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Poitras *et al.*, 2002).



**Figure 9 :** Courbes de fusion ou de dissociation pour 2 échantillons amplifiés dans 2 tubes. Présentation en données brutes de la diminution de la fluorescence en fonction de l'accroissement de la température (A) et présentation par le calcul de la dérivé première des courbes (B) ci-dessus. Les sommets des pics indiquent les valeurs de la température de demi-dénaturation ( $T_m$ ) pour chaque amplifiat (B). (UA) : unité arbitraire de fluorescence. Les flèches montrent les points d'inflexion des courbes de fusion dans la figure (A) qui correspondent au sommet des pics de la dérivée première dans la figure (B).

## **b- Les sondes fluorescentes**

Une sonde fluorescente est un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase, spécifique du fragment cible amplifié et portant un ou deux groupements fluorophores. Les sondes fluorescentes les plus employées sont les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan<sup>®</sup>. Ce système de détection utilise le processus de transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Clegg, 1995; Glazer *et al.*, 1997). Un fluorophore émetteur de fluorescence (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorophore suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Au cours de la polymérisation, l'hydrolyse de cette sonde fluorescente par l'activité 5'-3' exonucléasique de la *Taq* polymérase va libérer le reporter de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission d'une fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (Figure 10). Etant donné que la sonde ne pourra être clivée que lorsqu'hybridée à son brin complémentaire, La température d'extension des amorces doit être compatible avec la température d'hybridation de la sonde ce qui impose une conception rigoureuse des amorces. Le développement d'un nouveau type de sondes TaqMan<sup>®</sup>-MGB (Kutyavin *et al.*, 2000), a permis de pallier certaines limites du système TaqMan<sup>®</sup>. L'introduction à l'extrémité 3' d'une molécule ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN ou noyau MGB (Minor Groove Binder) augmente le T<sub>m</sub> de la sonde et stabilise plus fortement son interaction avec la matrice ADN, ce qui permet de synthétiser des sondes de plus petite taille (13 à 20 nucléotides). Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue avec la séquence cible d'ADN ce qui réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces.



**Figure 10 :** Hydrolyse de la sonde Taqman<sup>®</sup> (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence (Poitras *et al.*, 2002).

#### 2.2.4. Applications et limites

La PCR en temps réel, par sa capacité à produire des résultats rapides et spécifiques, trouve de plus en plus d'applications dans différents domaines notamment dans l'agroalimentaire. Cette technique s'est avérée efficace pour la détection rapide des salmonelles dans les carcasses de viande (McGuinness *et al.*, 2009) mais aussi pour la quantification de bactériophages spécifiques d'*E.coli* O157 : H7 dans des eaux usées (Imamovic *et al.*, 2010) et la quantification d'une lignée de maïs génétiquement modifiée dans des produits transformés (Kaur *et al.*, 2010). Des tests de détection ont aussi été mis au point pour les salmonelles avec une sensibilité de 2 UFC par réaction de PCR en temps réel (Chen *et al.*, 2000) et de 1 UFC/mL après 6 h d'enrichissement pour *E.coli* O157:H7 à partir d'échantillons de lait cru et de jus de pomme (Fortin *et al.*, 2001). Oppliger *et al.* (2008) appliquent la PCR en temps réel dans des élevages de volaille pour évaluer la contamination aéroportée responsable d'infections pulmonaires chez les ouvriers. Les applications de la PCR en microbiologie alimentaire présentent cependant des limites importantes à considérer. Le risque de résultats faussement positifs par contamination mais aussi de résultats faussement négatifs liés à la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon biologique considéré impose l'utilisation d'un contrôle interne positif qui sera analysé en parallèle pour chaque échantillon (Tse *et al.*, 2003).

Finalement, on voit bien que la PCR en temps réel s'avère intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle étant donné que le processus complet est automatisé du début à la fin. Des applications importantes ont également été développées et couvrent les domaines de microbiologie clinique, d'oncologie et l'étude de l'expression des gènes.

### **3. Identification bactérienne avec culture préalable**

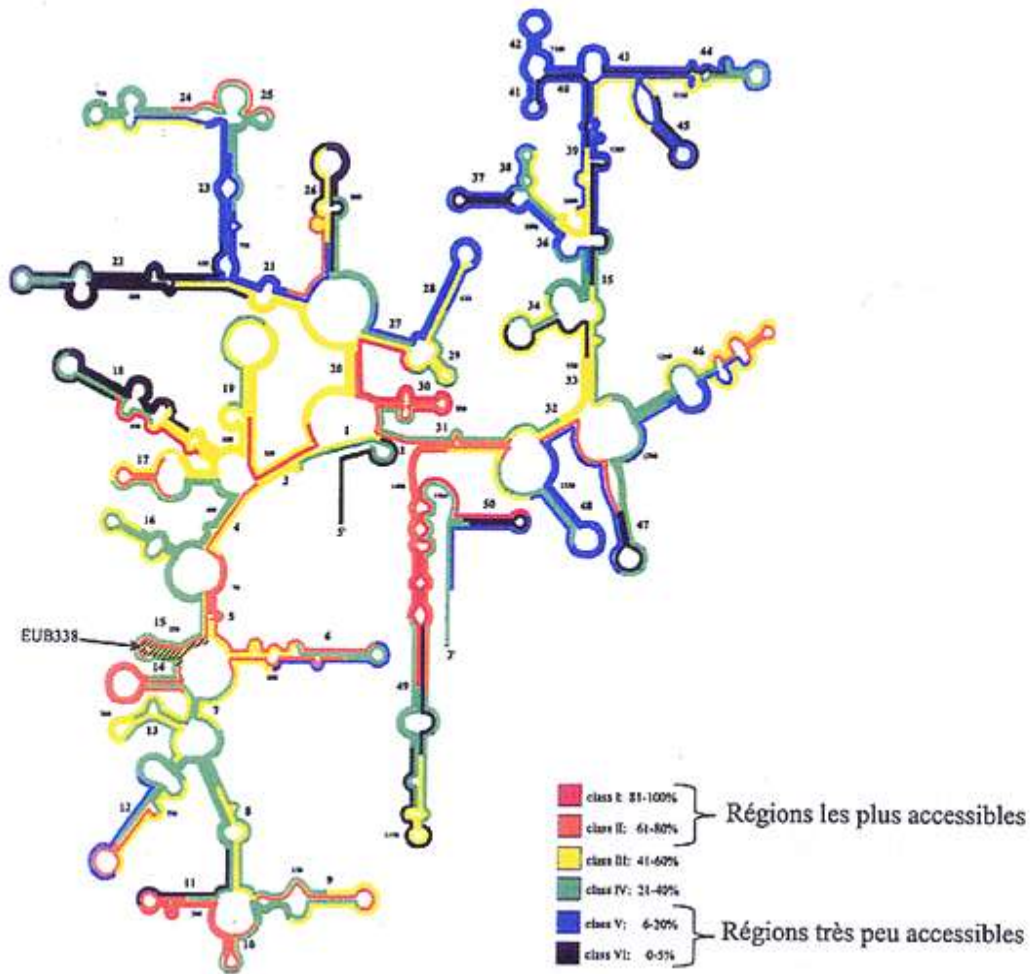
#### **3.1. Les méthodes phénotypiques**

Avant l'apparition des premiers outils biochimiques et moléculaires, la classification des germes s'est longtemps basée sur de simples éléments morphologiques comme la taille, la forme ou encore le regroupement des cellules bactériennes. Sur boîte de Petri, on observe ainsi le diamètre, le contour, la hauteur et la couleur des colonies. L'ensemble des critères morphologiques offre alors un outil d'identification relativement pertinent et suffisant dans de nombreuses applications ce qui permet souvent de restreindre l'identification à quelques espèces particulièrement en diagnostic clinique des pathogènes. En 1884, une nouvelle dimension à l'identification par microscopie est apportée par le bactériologiste Hans Christian Gram. Ce dernier met au point le protocole de la coloration Gram qui va permettre de classer les bactéries en fonction des propriétés de leur paroi. Outre les critères morphologiques de base des différentes familles de micro-organismes, des critères biochimiques (métabolisme fermentatif ou oxydatif, utilisation des hydrates de carbone, présence ou non d'une enzyme particulière) sont utilisés pour discriminer genres et espèces. Le développement de systèmes d'identification biochimiques (exemple API, BioMérieux, Craponne, France) liés à une banque de données disponible sur Internet a permis d'optimiser les tests d'identification. Cependant, beaucoup de bactéries isolées de matières premières (viande, lait) ou d'aliments transformés, restent mal identifiées par les galeries d'identification parce qu'elles sont fastidieuses (bactéries à croissance lente), rares ou nouvellement décrites et donc absentes des thésaurus des galeries (Wilhelm *et al.*, 2005). D'autres techniques phénotypiques peuvent être utilisées pour distinguer les espèces de certaines familles. Il s'agit notamment de l'analyse des acides gras phospholipidiques (AGPL) des parois bactériennes. Kozdrój *et al.* (2001) ont étudié la composition de la communauté bactérienne d'un échantillon de sol ainsi que les conditions environnementales qui y règnent (température, diversité des sources de carbone, salinité) par une analyse de la distribution des types d'acides gras présents.

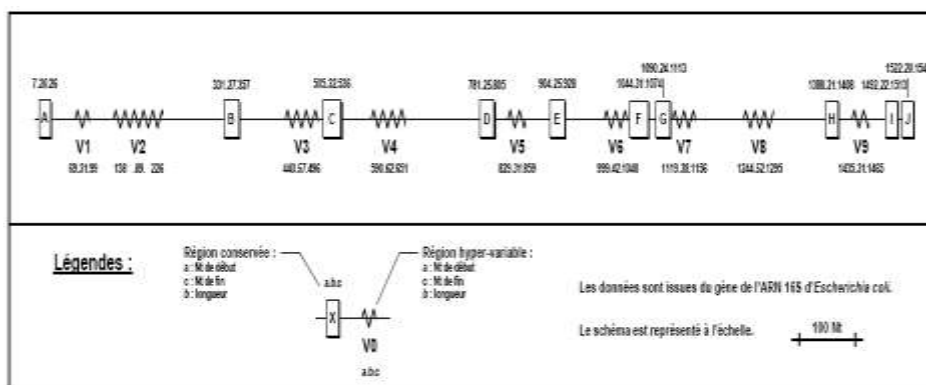
### 3.2. Séquençage de L'ADNr 16S

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis une révision complète de la phylogénie des organismes vivants. Les nouvelles classifications phylogénétiques des bactéries sont donc basées sur des critères de proximité génétique et non plus sur des critères phénotypiques. L'ADN ribosomique 16S (ADNr 16S), qui code l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S, Figure 11) reste la molécule la mieux renseignée dans les bases de données de séquences nucléotidiques et la plus employée dans la phylogénie bactérienne (Amann *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2007). D'une longueur de 1500 paires de bases (pb), elle est ubiquiste chez toutes les bactéries et il ne semble pas exister de transferts latéraux de gènes d'ADNr 16S entre micro-organismes. Elle possède une structure en mosaïque, composée de 9 régions hypervariables et de 10 régions conservées (Figure 12). De ces régions conservées peuvent être extraits des amorces ou sondes dites « universelles ». Les régions hypervariables offrent des possibilités d'amorçages spécifiques d'un taxon donné. La base de données Ribosomal Database Project 10 (RDP 10, <http://rdp/cme.msu.edu>) qui contient plus d'un million de séquences alignées d'ADNr 16S a été réalisée à partir de séquences de souches bactériennes isolées ou de clones de l'ADNr 16S. Des souches bactériennes appartiendront au même genre si leurs séquences d'ADNr 16S possèdent un degré de similitude supérieur à 97% et à la même espèce si le degré de similitude est de 99% (Drancourt *et al.*, 2000).

Bien que l'ADNr 16S reste la molécule la mieux renseignée dans les bases de données de séquences nucléotidiques et la plus employée pour l'identification bactérienne, cependant plusieurs auteurs ont cherché à remplacer cette molécule par d'autres séquences. Certains auteurs ont préféré ainsi utiliser des gènes codant pour des protéines et non des ARNs ribosomiques. Leur argument est que les ARNs ribosomiques, qui par définition ne sont pas traduits, souffrent d'un important taux d'insertion et délétion qui rend l'alignement des séquences difficile. Ainsi, Jawad *et al.* (1998) proposent le gène *recA*, Watanabe *et al.* (2001) le gène *gyrB*, Giammarino *et al.* (2005) le gène *SodA* et Mollet *et al.* (1997) le gène *rpoB*. Ce dernier est utilisé pour discriminer certaines espèces dans des genres bien précis tels *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004), *Leptospira* (Scola *et al.*, 2006) ou *Staphylococcus* (Drancourt *et al.*, 2002). De même, l'étude de la famille des *Enterobacteriaceae* peut être facilitée comme le rapporte Mollet *et al.* en 1997. Par ailleurs, l'ADN cible pour les champignons est l'ADNr 18S (Wilhelm *et al.*, 2005). Des régions non codantes peuvent aussi être utilisées dans les approches phylogénétiques. C'est ce que démontrent Forsman *et al.* (1997) avec l'espace intergénique existant entre les gènes des ARNr 16S et 23S. García-Martínez *et al.* (2001) proposent leur propre base de données sur ces séquences.



**Figure 11** : Structure secondaire et variabilité de la molécule d'ARNr 16S chez *E. coli* (Van de Peer *et al.*, 1996).



**Figure 12** : Distribution des régions hyper-variables (notées V1 à V9) ainsi que des régions conservées (notées A à J) du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli*.

## **4. Identification d'écosystèmes complexes sans culture préalable**

### **4.1. Les inventaires moléculaires**

La connaissance et la caractérisation des séquences d'ARNr 16S a permis le développement des approches phylogénétiques pour l'identification des communautés microbiennes complexes. La caractérisation phylogénétique d'un écosystème bactérien selon le principe de l'inventaire moléculaire repose sur l'analyse de l'ADN génomique de tous les organismes présents (Doré *et al.*, 2001). Le principe consiste dans un premier temps à amplifier par PCR les gènes codant pour l'ARNr 16S. Cette étape génère un grand nombre de copies de chacun des gènes codant l'ARNr 16S appartenant aux différentes bactéries dominantes du microbiote. La construction d'une banque des ADN amplifiés dans *E.coli* constitue l'étape suivante. Les clones recombinants sont ensuite séquencés puis analysés *in silico* par une approche phylogénétique (Amann *et al.*, 1995). Cette méthode a été utilisée pour la caractérisation et l'identification de communautés bactériennes dans des environnements d'eaux et de sols (Grosskopf *et al.*, 1998; Pinhassi *et al.*, 1997). La technique des inventaires moléculaires a permis l'amélioration des connaissances sur la diversité bactérienne du microbiote fécal humain : des bactéries Gram + riches en nucléotides G et C, n'ayant jamais été cultivées auparavant, ont été mises en évidence grâce à la découverte de nouvelles séquences d'ADNr 16S. D'autre part, une double approche liant méthodologie traditionnelle de culture et méthodologie de séquençage de l'ADNr 16S a permis de mettre en évidence des souches non détectables par culture et vraisemblablement dans un état VNC. Ainsi, Brightwell *et al.* (2006) ont pu identifier à partir de prélèvements de surfaces sur un tapis convoyeur en Intralox® des *Sphingomonas* non détectés par des méthodes culture-dépendantes. D'ailleurs, certaines espèces de *Sphingomonas* peuvent se comporter comme des bactéries pathogènes opportunistes (Ryan *et al.*, 2010).

### **4.2. Suivi et caractérisation des communautés bactériennes complexes**

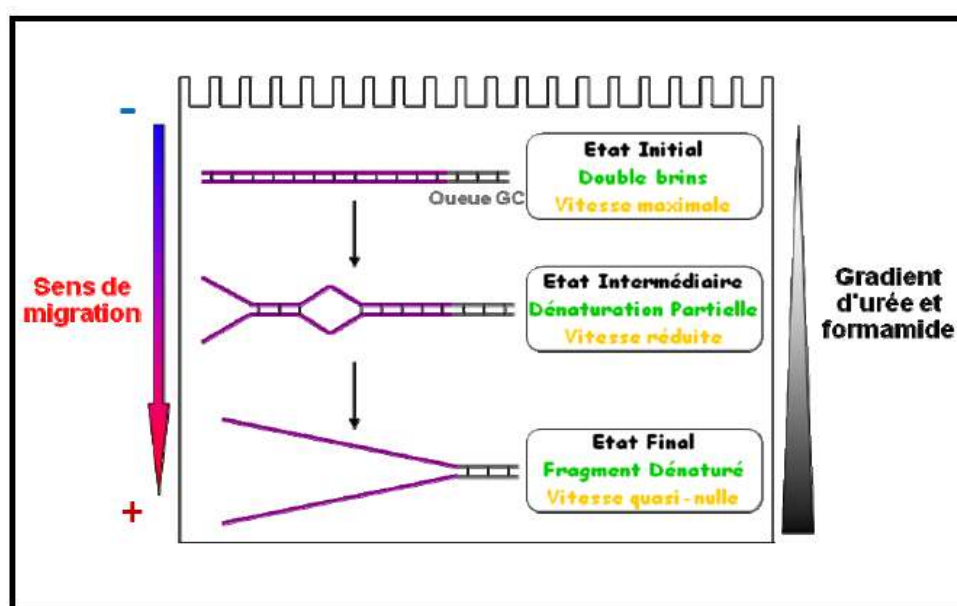
#### **4.2.1. L'électrophorèse sur gel dénaturant**

Le principe de la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a été décrit pour la première fois par Fisher et Lerman (1983). A l'aide d'une amplification par PCR de régions variables du gène codant l'ARNr 16S, il est possible de séparer par électrophorèse des molécules de tailles identiques mais de séquences nucléotidiques différentes. La séparation des fragments d'ADN est obtenue grâce à un gradient d'urée-formamide présent dans le gel d'acrylamide. La



dénaturation des fragments au fur et à mesure de leur progression dans le gel entraîne une nouvelle conformation ouverte des molécules qui ralentit leur migration. Le résultat obtenu est un profil électrophorétique pour lequel chaque bande correspond en première approximation à une espèce dominante de l'écosystème de départ (Figure 13).

Pour favoriser la résolution, une séquence riche en guanine (G) et cytosine (C), appelée queue GC (Sheffield *et al.*, 1989) d'environ 40 nucléotides est ajoutée à l'extrémité 5' des amorces. Compte tenu de la composition de cette séquence GC, sa température de demi-dénaturation ( $T_m$ ) très élevée, prévient la dissociation complète des produits d'amplification et permet d'augmenter la séparation des différentes bandes observées sur le gel.



**Figure 13** : Dénaturation progressive de fragments d'amplification dans un gel de DGGE.

L'électrophorèse sur gel dénaturant a été appliquée pour la première fois en 1993 sur une communauté bactérienne naturelle par amplification de la région variable V3 de l'ADN codant pour l'ARN 16S (Muyzer *et al.*, 1993). Depuis, cette technique a conduit à de nombreuses études portant sur la diversité des communautés microbiennes dans les milieux telluriques (Avrahami *et al.*, 2002) océaniques (Bano *et al.*, 2002) et lacustres (Crump *et al.*, 2004) dans le tractus gastro-intestinal (Heilig *et al.*, 2002) ainsi que dans les bioréacteurs pour le traitement des déchets (Gray *et al.*, 2002). Durant les dernières décennies, cette technique a été introduite dans les filières agro-alimentaires notamment pour l'identification et le suivi des micro-organismes issus des produits fermentés (saucissons, fromages, spiritueux) ou conservés sous atmosphère vide ou sous atmosphère modifiée (Jiang *et al.*, 2011; Lafarge *et al.*, 2004; Pennacchia *et al.*, 2011).

La TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis) a été utilisée pour la première fois par Day *et al.* (1995). C'est une technique dont le principe est le même que pour la DGGE, si ce n'est

que le gradient utilisé dans le gel lors de l'électrophorèse est un gradient de température. Ainsi, au fur et à mesure de la migration du fragment d'ADN double brin dans le gel d'acrylamide, la température du tampon se voit augmenter progressivement : le fragment d'ADN se dénature lentement en une structure partiellement ouverte avant de s'immobiliser dans le gel. Ainsi, Ogier *et al.* (2004) ont utilisé la TTGE pour obtenir une image globale des écosystèmes microbiens présents dans du lait et différents fromages. Grâce à l'établissement d'une base de données constituée des profils TTGE de souches de référence, cette technique leur a permis de confirmer la prépondérance des bactéries à bas pourcentage en GC dans le cœur des fromages et celle des bactéries à haut pourcentage en GC à la surface. La TTGE reste sous-employée par rapport à la DGGE car selon certains auteurs, elle n'est pas suffisamment discriminante et présente une qualité des bandes largement inférieure à celles obtenues par DGGE.

- **Interprétation des profils DGGE**

L'identification des bandes par comparaison avec des profils de bactéries connues reste une approche délicate. Pour cela, divers auteurs ont recours au séquençage des bandes qui reste la seule méthode fiable d'identification (Jiang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2004). Selon Muyzer (1999), la DGGE est un outil qui permet d'évaluer globalement la composition d'une communauté de micro-organismes ou bien d'étudier la dynamique d'une microflore complexe au cours d'un procédé alimentaire (transformation fromagère, fermentation alcoolique) (Duthoit *et al.*, 2003; Randazzo *et al.*, 2002). Elle permet une appréciation de la diversité des espèces représentées et non une quantification exacte de l'abondance des espèces détectées.

L'analyse du gel DGGE est réalisée au moyen d'un logiciel capable de détecter les bandes, leur positionnement, ainsi que l'intensité relative de chacune. A titre d'exemple, on cite le logiciel Bionumerics (Boon *et al.*, 2002) développé par Applied Maths.

- **Limites de la DGGE**

- Extraction de l'ADN : une des premières limites de cette technique est l'étape d'extraction de l'ADN. Il est en effet difficile d'appliquer une méthode universelle et reproductible dans la mesure où, selon les espèces, la résistance à la lyse cellulaire est variable. Un des arguments avancés est la différence de rigidité des parois cellulaires (Casamayor *et al.*, 2000; Van Hannen *et al.*, 1999). Les spores sont plus difficilement lysées que les cellules végétatives et les bactéries Gram positif sont plus résistantes que les Gram négatif.
- Amplification de l'ADN par PCR : la PCR présente aussi quelques limites, liées notamment au fait qu'elle amplifie préférentiellement les flores dominantes. En effet, Zoetendal *et al.* (1998) estiment que l'approche PCR-DGGE ne permet l'observation que

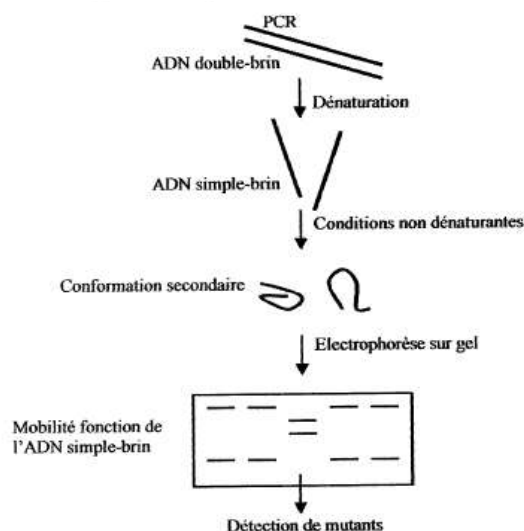
des espèces dominantes dont la proportion d'ADN extrait est supérieure à 1% de l'ADN de la population totale. D'autre part, la variation de la teneur en GC dans le mélange de fragments à amplifier, l'utilisation d'amorces dégénérées, le nombre de cycles PCR, ainsi que la durée et la température des phases de dénaturation et d'hybridation sont néanmoins reconnus comme étant des facteurs influents sur ce phénomène.

- Copies multiples du gène : les gènes codant pour l'ARN 16S sont regroupés en opérons *rrn*. Ces opérons sont présents en plusieurs copies dans le génome et ces copies peuvent être légèrement hétérogènes. Sur un gel, cette hétérogénéité peut conduire à la représentation d'un même individu par plusieurs bandes (Takahashi *et al.*, 2004).
- Co-migration : Cocolin *et al.* (2001) observent que des fragments d'ADN de séquences différentes occupent parfois la même position sur le gel, empêchant ainsi de différencier certaines espèces. Selon Ogier *et al.* (2002), il n'est pas possible de différencier des espèces appartenant au groupe de *Lactobacillus casei*. En effet, l'analyse des bandes par clonage et séquençage a montré que certains clones étaient phylogénétiquement différents. Pour Sekiguchi *et al.* (2001) il s'agit d'un problème de résolution des bandes. Pour pallier à ce problème, Gafan *et al.* (2005) ont mis au point une méthode qui consiste à faire passer les bandes co-migrantes sur un gel DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion) en augmentant les conditions de dénaturation.
- Molécules chimériques et hétéroduplexes : Des molécules chimériques par hybridation de deux brins appartenant à deux espèces différentes peuvent se former au cours d'une amplification par PCR (Speksnijder *et al.*, 2001). Cette probabilité augmente avec la complexité de la communauté étudiée. Les hétéroduplexes se forment par l'association de deux brins d'ADN non complémentaires. Cependant, ce phénomène ne constitue pas un problème majeur pour l'analyse des profils DGGE (Casamayor *et al.*, 2000). En effet, la formation des hétéroduplexes au cours de la PCR peut être limitée par la réduction du nombre de cycles car leur fréquence de formation augmente dans les derniers cycles de la PCR. La réduction de la température d'hybridation et l'augmentation de la concentration en amorces sont également des facteurs limitant la formation des hétéroduplexes (Muyzer *et al.*, 1998).

#### 4.2.2. Autres méthodes d'étude des communautés bactériennes complexes

##### ✓ La SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

Le principe de SSCP repose sur le fait qu'une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN affecte le repliement de l'ADN simple brin (après dénaturation forcée de l'ADN double brin) et par conséquent la mobilité électrophorétique du fragment d'ADN dans des conditions non dénaturantes (Figure 14). Les récents progrès de l'électrophorèse capillaire ont permis d'améliorer la sensibilité, la vitesse d'analyse et la reproductibilité de la méthode SSCP. L'incidence de quelques variables (composition du gel, pH, le tampon de migration, la taille et la séquence des ADN) ont été étudiées avec soin (Kukita *et al.*, 1997). Ainsi, il semblerait que le pourcentage de bases GC des fragments d'ADN aie un impact sur la détection des mutations. En effet, les mutations sur des fragments à fort pourcentage de bases GC seraient mieux détectées que celles sur les fragments à faible GC, en raison probablement de la meilleure stabilité des conformères riches en GC. La SSCP a été utilisée pour étudier divers écosystèmes microbiens, tels que ceux présents dans les fromages au lait cru. Ainsi, Delbes *et al.* (2005) rapportent l'utilisation de cette technique à l'étude de la diversité et de la dynamique de la population staphylococcique isolée du fromage de Salers. L'utilisation de la PCR-SSCP ciblant le gène de l'ADNr 16S leur a permis de définir des profils caractéristiques de chacune des espèces retrouvées habituellement dans les produits laitiers. Les auteurs en ont conclu que l'espèce *Staphylococcus equorum* dominait la flore des laits utilisés pour la fabrication des fromages de Salers.

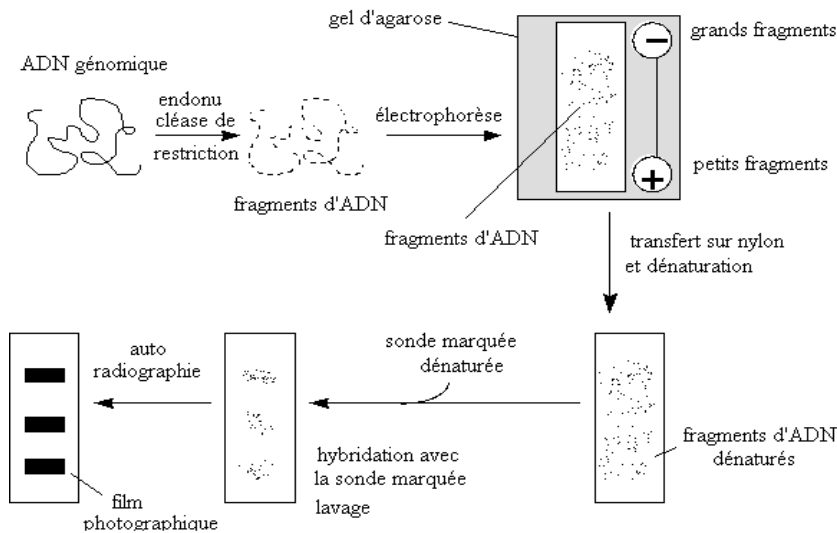


**Figure 14 :** Principe de la SSCP : Une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN affecte la conformation secondaire de l'ADN simple brin et par conséquent la mobilité électrophorétique du fragment d'ADN dans des conditions non dénaturantes. La présence d'une mutation entraîne dans ce cas un décalage de position de la bande (Fan *et al.*, 1993).

### ✓ La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Cette technique connue aussi sous le nom d'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) permet d'analyser le polymorphisme de l'ADN grâce aux différences de longueur des fragments de restriction. Les séquences d'ADNr 16S amplifiées sont digérées par des enzymes de restriction et les fragments de différentes longueurs résultants sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ou gel d'acrylamide non dénaturant (Nocker *et al.*, 2007). L'analyse des profils de restriction obtenus par digestion des produits d'amplification de l'ADN ribosomique 16S a été utilisée pour identifier des souches de staphylocoques isolées de fromages à croûte lavée (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004). La construction d'une librairie de clones permet l'application de cette technique à des communautés bactériennes complexes (Weidner *et al.*, 1996). Cependant, réaliser une étude phylogénétique en utilisant la RFLP reste relativement hasardeux compte tenu de la faible information séquentielle fournie par cette technique (Nocker *et al.*, 2007). La T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) dérive de la RFLP mais une amorce de PCR est marquée par fluorescence, permettant la détection par électrophorèse sur capillaire, uniquement des fragments terminaux des ADN digérés par les enzymes, ce qui facilite le profil de digestion (Figure 15). Cette technique a été utilisée pour étudier la composition bactérienne d'ensilages, de produits de pêches et de viande hachée sous atmosphère modifiée (McEniry *et al.*, 2008; Nieminen *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2010). L'étude de la flore lactique de viande conservée sous atmosphère montre qu'il n'est pas évident de distinguer des espèces appartenant à un même genre (Nieminen *et al.*, 2010). Cependant, cette méthode présente certains avantages comme sa rapidité et sa bonne reproductibilité.

Une étude comparative de la DGGE, la T-RFLP et de la SSCP sur un échantillon de sol a montré que les trois méthodes aboutissaient à des résultats similaires en termes de caractérisation de la flore bactérienne de l'échantillon (Smalla *et al.*, 2007). Un même constat est fait pour l'étude de la biodiversité de sols d'herbages (Nunan *et al.*, 2005) et des fonds benthiques de la mer Egée (Moeseneder *et al.*, 1999). Cependant, ces auteurs relèvent les limites de la DGGE par rapport à la T-RFLP quant à la résolution du gel et la reproductibilité des résultats.



**Figure 15 :** Principe de la T-RFLP : Les séquences d'ADN amplifiées sont digérées par des enzymes de restriction et les fragments de différentes longueurs sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ou gel d'acrylamide non dénaturant. Une sonde marquée par fluorescence va s'hybrider sur les fragments terminaux des ADN digérés par les enzymes. Les bandes sont finalement révélées par autoradiographie (Source : [http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot\\_05001/polymorphisme/rflp.html](http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/polymorphisme/rflp.html)).

### 4.3. Et la métagénomique ?

Le terme *métagénomique*, ou encore *génomique environnementale* ou *génomique des communautés*, indique l'étude des *métagénomes*, qui lui-même réfère à l'ensemble des séquences d'ADN extraites de communautés multi-espèces prélevées dans l'environnement. Ainsi, le défi de la métagénomique consiste à relier les informations génomiques issues des clones à l'organisme ou à l'écosystème duquel l'ADN a été extrait (Handelsman, 2004; Rodríguez Valera, 2004). La complexité du problème d'assemblage simultané de fragments d'ADN provenant de communautés hétérogènes semble dépendre du nombre d'espèces contenues dans l'échantillon. Ces problèmes nécessitent des approches algorithmiques fines, des fragments d'ADN plus longs, ainsi que des taux de couverture plus importants (Chen *et al.*, 2005). Les premières analyses de métagénomes, réalisées par PCR, ont consisté à explorer la diversité des séquences d'ARN ribosomique qui ont mis en évidence une diversité microbienne bien plus compliquée que pouvaient le faire penser les méthodes par culture. En 2002, une étude de la mer des Sargasses a mis en évidence environ 2000 espèces microbiennes différentes (Venter *et al.*, 2004). D'autres études ont montré la présence de plus de 1000 espèces virales dans les fèces humains, et probablement un million de virus différents par kilogramme de sédiments marins. Tous ces projets nécessitent la construction de bibliothèques métagénomiques et de base de données dédiées. Ainsi, le «Genome Online Database » (Bernal *et al.*, 2001; Liolios *et al.*, 2006) liste 56 projets

métagénomiques différents tels que la station océanographique de « Hawaiï Ocean Times Series » ou l'air de la ville de New York. La « Diversa Corporation » projette de recouvrir presque 100% de l'ADN des micro-organismes résidant dans le sol, l'air, l'eau, les plantes et les animaux à travers le monde (Short, 1997). Un autre projet concerne la cartographie de  $10^{12}$  micro-organismes formant la microflore du corps humain (Relman *et al.*, 2001). En conclusion, la comparaison des fragments de génomes de micro-organismes non cultivables pourrait mener à la construction d'une cartographie de la diversification et de la spécification des organismes microbiens dans leur environnement. Les larges bibliothèques métagénomiques, témoin de la variété spatiale et temporelle des communautés, ont permis de fournir des résultats significatifs sur le style de vie de populations microbiennes (Schloss *et al.*, 2005), mais l'organisation à large échelle de ces communautés et leurs interactions restent largement méconnues.

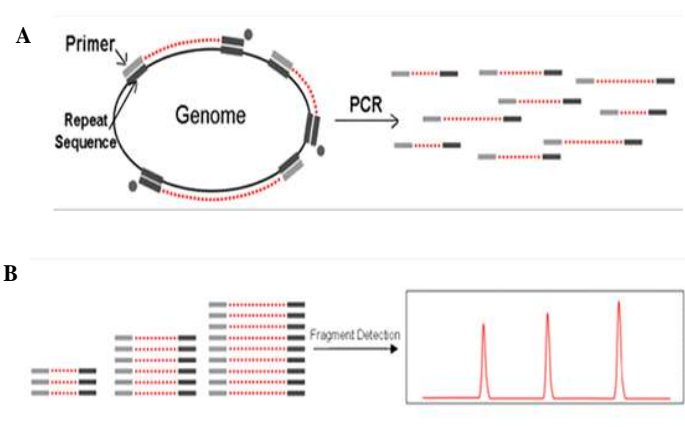
## **5. Analyse du polymorphisme de l'ADN**

### **5.1. Polymorphisme inter séquences répétées ou rep-PCR**

La rep-PCR est basée sur la présence de séquences répétées dispersées dans le génome de la plupart des bactéries. Un certain nombre de séquences répétées, non codantes et conservées, se sont révélées pratiques et efficaces pour le typage des bactéries. Les plus utilisées sont les séquences ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence) et les séquences REP (Repetitive Extragenic Palindromic sequence) (Martin *et al.*, 1992). Des amorces désignées dans les séquences conservées situées à l'extrémité de ces éléments répétés permettent l'amplification par PCR des régions situées entre ces mêmes séquences. La séparation des fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse sur gel produit une empreinte génomique de la souche (Dijkshoorn *et al.*, 2001). L'approche ERIC-PCR et rep-PCR permettent de rendre compte de la variabilité de l'ensemble du génome bactérien (Versalovic *et al.*, 1991). Cette technique a permis aussi une analyse plus fine de la diversité génotypique de *Pseudomonas fluorescens* que la technique PCR-RFLP, au sein de la mycorrhizosphère du jujubier (Frey *et al.*, 1997). Steve Yan *et al.* (2004) accordent à la rep-PCR un très bon pouvoir de discrimination mais une difficulté au niveau de la mise en œuvre technique.

Depuis quelques années, le génotypage avancé a permis la mise sur le marché d'un nouvel outil basé sur le principe de la rep-PCR : il s'agit du système DiversiLab développé par BioMerieux (Eckert *et al.*, 2011; Healy *et al.*, 2005). Le principe consiste à amplifier les échantillons par rep-PCR à l'aide de Kits DiversiLab pour empreintes génétiques appropriées. Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse dans un système microfluidique LabChip<sup>®</sup>. A l'intérieur du

LabChip<sup>®</sup>, les fragments d'ADN se fixent à un colorant intercalant et passent devant un laser, générant ainsi un graphe de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps. Ce graphe traduit un patron de l'empreinte génétique de l'échantillon (Figure 16). Healy *et al.* (2005) utilisent cette technique pour typer 16 isolats de *Neisseria meningitidis* impliqués dans une infection bactérienne dans un milieu scolaire. Ces auteurs affirment les avantages de cet outil qui permet d'obtenir des résultats constants, homogènes et reproductibles, ce dernier étant un critère essentiel pour la traçabilité d'une infection microbienne dans le cadre de programmes de surveillance épidémiologique. Une étude menée par Shutt *et al.* (2005) sur 89 souches de *Staphylococcus aureus* isolées de 19 épisodes épidémiques montre une concordance des résultats obtenus par DiversiLab et la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) pour 15 des 19 épisodes. Ces auteurs décrivent le DiversiLab comme étant une technique rapide et efficace comparé à la PFGE. En effet, le logiciel DiversiLab permet une analyse automatisée des données grâce à une interface web accessible via internet. L'analyse des résultats est donc plus simple que celle obtenue par Bionumerics pour la PFGE. En effet, la résolution du gel ainsi que le choix des bandes à analyser sur Bionumerics restent des critères « subjectifs » qui peuvent varier d'un utilisateur à un autre ce qui risque d'entraîner un biais au niveau de l'interprétation des résultats. Une étude menée par Eckert *et al.* (2011) sur des souches de *Clostridium difficile* a comparé le système DiversiLab au ribotypage, méthode de référence pour le typage de cette espèce en Europe. Ces auteurs accordent un pouvoir discriminant de la rep-PCR plus élevé qu'au ribotypage. Cependant, ils relèvent des limites de cette méthode quant à la nécessité d'avoir un personnel formé pour l'analyse des résultats.



**Figure 16** : Principe du DiversiLab. A : Liaison des amorces aux séquences répétitives ciblées. Le génome est « découpé » en fragments de tailles identiques ou différentes. B : Séparation des fragments amplifiés par électrophorèse / Obtention d'une empreinte génétique unique à chaque souche.

(Source : [http://www.silliker.com/usa/html/publications/eresearch\\_volume6\\_issue2.php](http://www.silliker.com/usa/html/publications/eresearch_volume6_issue2.php)).



## **5.2. Autres méthodes de typage**

### **5.2.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

La RAPD ou AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) se distingue de la rep-PCR par l'utilisation d'une seule amorce qui, en se fixant au hasard sur plusieurs sites du génome de la bactérie va permettre l'amplification d'un ensemble de fragments d'ADN. L'amorce est de petite taille (dizaine de paires de bases) et la température d'hybridation relativement basse (~ 30°C). Cette technique est généralement moins reproductible que les autres techniques de typage et nécessite donc des mises au point préalables pour augmenter les chances de réussite (Hilton *et al.*, 1996).

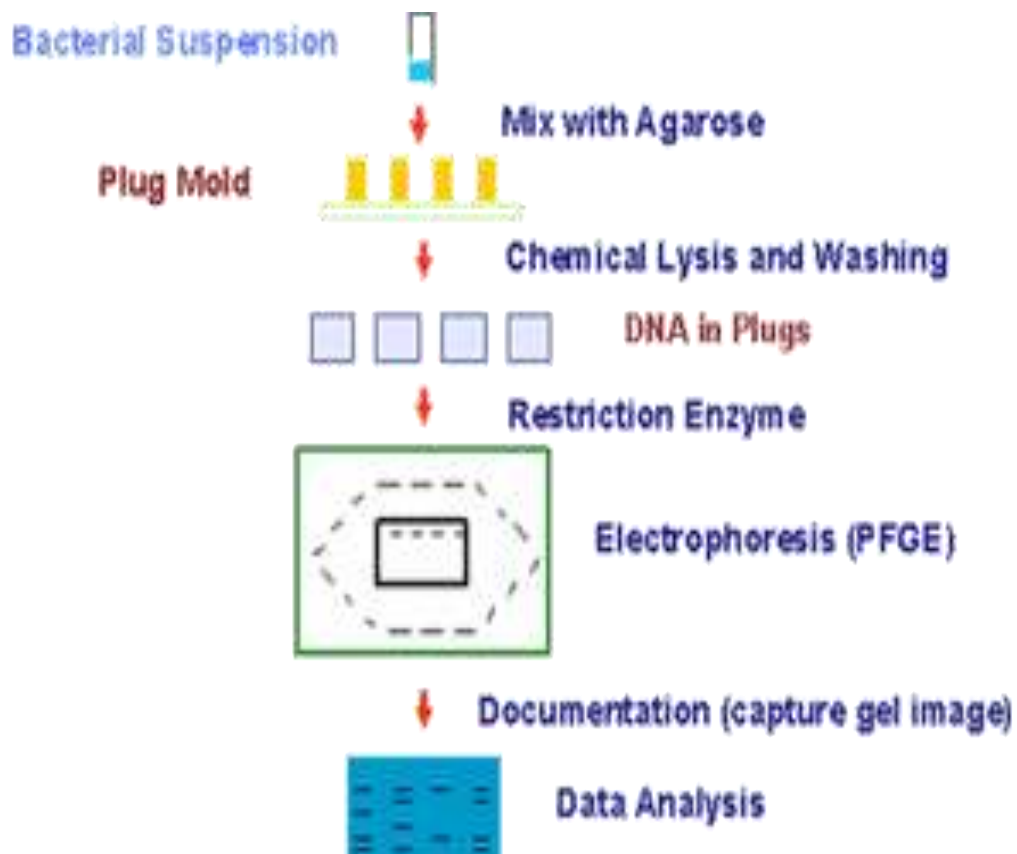
### **5.2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

La restriction de l'ADN couplé à l'AFLP intègre une étape de digestion de l'ADN total par des enzymes de restriction puis une amplification par PCR d'un certain nombre de ces fragments grâce à des ligands fixés à l'extrémité des fragments et complémentaires à la séquence des amorces. Cette technique bien plus lourde que les techniques décrites précédemment, présente l'avantage d'être reproductible d'un laboratoire à un autre et peut donc permettre la création de bases de données communes.

### **5.2.3. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

La PFGE est une électrophorèse en gel d'agarose sous un champ électrique pulsé utilisée initialement en 1984 pour le caryotypage des organismes eucaryotes (Schwartz *et al.*, 1984). Le principe de la PFGE est d'effectuer une macro-restriction du chromosome bactérien au sein même d'une matrice solide (plug d'agarose). Pour cela, des enzymes de restriction possédant peu de sites de coupures sont utilisées afin d'obtenir de grands fragments. Ceux-ci sont séparés sous un champ électrique qui change régulièrement de direction selon un angle défini (en général 120°). Ainsi, les molécules d'ADN sont contraintes de se réorienter en permanence dans les mailles du gel, ce qui permet la séparation des grands fragments (Figure 17) Contrairement à l'électrophorèse unidirectionnelle, qui ne peut pas séparer les molécules d'ADN de taille supérieure à 50 kilobases (Kb), la PFGE peut séparer des molécules d'ADN de taille allant jusqu'à 12 Mégabases (Mb). Depuis les années 1990, cette technique est devenue en épidémiologie la méthode de référence pour typer des souches et ainsi déterminer les relations phylogénétiques au sein d'un groupe d'isolats bactériens. Ainsi, des souches de *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus sciuri* et *Staphylococcus haemolyticus* ont été pulsotypées afin de déterminer leur origine au sein de

patients et de personnel médical (Raponi *et al.*, 2005). De plus, la PFGE a été utilisée pour suivre les transferts horizontaux de gènes de résistance, telles que la résistance des *Staphylococcus* à Coagulase Négative (SCN) aux ammoniums quaternaires utilisés comme désinfectants dans l'industrie alimentaire (Bjorland *et al.*, 2005).



**Figure 17 :** Principe de la PFGE. Une macro-restriction de l'ADN bactérien est effectuée au sein d'une matrice solide (plug d'agarose) afin d'obtenir de grands fragments. Ceux-ci sont séparés sous un champ électrique qui change régulièrement de direction selon un angle défini. Les molécules d'ADN sont contraintes de se réorienter en permanence dans les mailles du gel, ce qui permet la séparation des grands fragments (Source : <http://www.cdc.gov/pulsenet/whatis.htm>).

### **III- MATERIEL ET METHODES**

## A. Procédure de N-D menée dans l'atelier de découpe

Trois campagnes de prélèvements (Février 2009, Novembre 2009 et Mai 2010) ont été menées dans une salle de découpe réfrigérée d'une industrie de viande bovine. La température de l'atelier est d'environ 6°C durant la phase de production et elle atteint 15°C pendant les opérations de N-D. Les opérations d'hygiène de la salle de découpe de notre étude sont réalisées quotidiennement à la fin de la journée de travail (vers 22h00) et sont sous-traitées à une société extérieure. Le N-D consiste tout d'abord en un raclage pour éliminer les résidus de viande puis un rinçage à l'eau chaude (45°C) sous moyenne pression. Une étape de nettoyage est ensuite réalisée et consiste à pulvériser une solution à base d'alcalin chloré sous forme de mousse sur les surfaces avec un temps de contact de 20 minutes (Figure 18) (Annexe 1). Un rinçage avec de l'eau à moyenne pression est ensuite effectué ainsi qu'une désinfection de 20 minutes à base de glutaraldéhyde et d'ammonium quaternaire (Annexe 2). Un détergent-détartrant acide est appliqué sur les surfaces une fois par semaine (Annexe 3) à la place du détergent alcalin chloré suivi d'un rinçage à moyenne pression.



**Figure 18** : Nettoyage-Désinfection au canon à mousse d'un tapis convoyeur en PVC

## B. Prélèvements

Les prélèvements de surfaces ont été réalisés avant et après N-D sur deux équipements : un tapis convoyeur en PVC (Figure 18) et des machines éplucheuses Townsend® en acier inoxydable conçues pour séparer le périnysium du muscle (Figure 19). Le PVC est souvent utilisé comme matériau de tapis convoyeur dans l'industrie agro-alimentaire en raison de sa flexibilité. Quant à l'acier inoxydable, ce dernier est connu pour sa résistance à la corrosion ainsi que pour ses propriétés hygiéniques.



Figure 19 : Machine éplucheuse Townsend® en acier inoxydable

## 1. Prélèvements de surface par chiffonnages

Les surfaces à chiffonner sont délimitées par un gabarit de 566 cm<sup>2</sup>. En effet, les dimensions du gabarit ont été adaptées aux surfaces des machines éplucheuses Townsend®. Avant de procéder aux chiffonnages des équipements, nous avons pris soin d'éliminer les résidus de viande restants sur les surfaces à chiffonner. Une fois les opérations de N-D achevées, nous avons constaté que les surfaces étaient visuellement sèches. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de chiffonnettes stériles imbibés d'un neutralisant polyvalent ATL® (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France) dont le rôle est d'inhiber les principes actifs des désinfectants (Annexe 4). Le chiffonnage est effectué dans trois directions différentes : de gauche à droite, de haut en bas et en diagonale. Cependant des différences au niveau des prélèvements entre la campagne 1 et les campagnes 2/3 sont à noter :

### Campagne 1 :

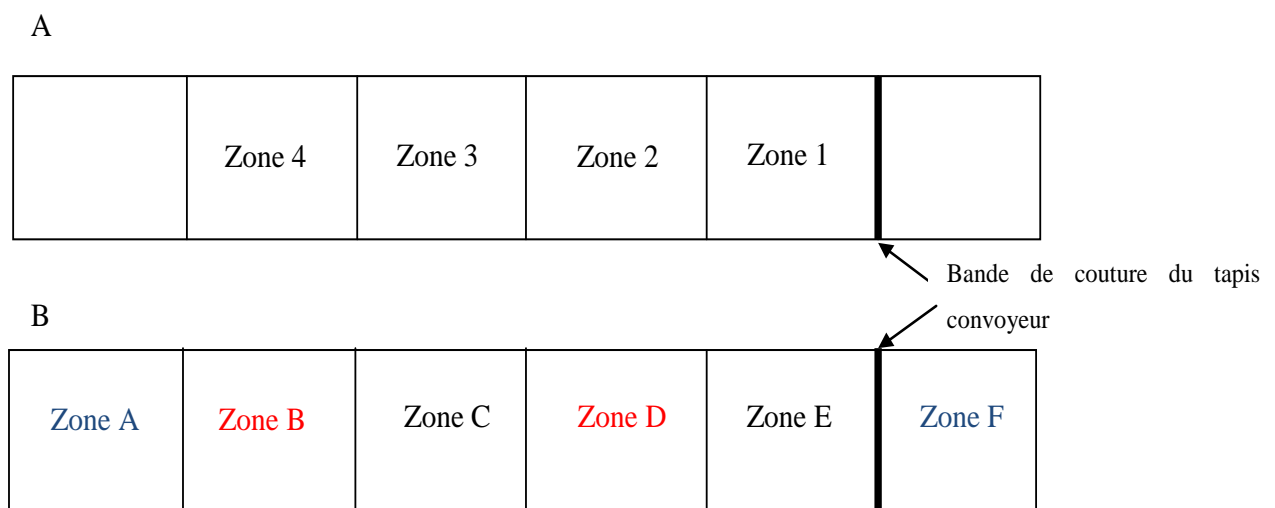
La première campagne nous a permis de fixer notre stratégie de prélèvement et a aussi été l'occasion de collecter des isolats. **Elle sera donc uniquement exploitée pour l'étude de l'écosystème cultivable des surfaces** (Cf. § 1B p 89). Elle a été menée en cours de semaine (nuit du jeudi au vendredi). Deux séries de 10 chiffonnages successifs ont été réalisées avant et après N-D au même endroit sur un tapis convoyeur en PVC (zones 2 et 4 Figure 20A). Pour les machines éplucheuses Townsend® en acier inoxydable, 10 chiffonnages successifs ont été réalisés avant et après N-D également au même endroit sur deux machines séparées (Figure 21).

### Campagnes 2 et 3 :

Ces deux campagnes ont été réalisées à la fin de la semaine (nuit du vendredi au samedi). De plus, nous avons modifié notre stratégie de prélèvement par rapport à la campagne 1 pour les raisons suivantes : (i) les quantifications par qPCR sur acier inoxydable ont donné des résultats très dispersés à la première campagne. Nous avons donc doublé le nombre de surfaces échantillonnées, (ii) nous avons fait plus de chiffonnage sur le PVC pour améliorer l'évaluation

des pentes des droites de décrochement, (iii) l'ensemble des chiffonnages réalisés au même endroit avant et après N-D à la première campagne ne permet pas d'évaluer l'efficacité du N-D réalisé par l'industriel puis que les chiffonnages successifs à eux seul constituent un nettoyage. Nous avons donc choisi de faire les prélèvements avant et après N-D sur des surfaces juxtaposées : deux séries de 15 chiffonnages successifs ont été réalisées sur un tapis convoyeur en PVC. Les zones chiffonnées avant N-D (zones B et D, Figure 20B) sont juxtaposées à celles chiffonnées après N-D (zones A et F, Figure 20B). Pour les machines éplucheuses Townsend<sup>®</sup>, 10 chiffonnages successifs ont été réalisés sur 4 machines avant N-D et 4 autres machines après N-D (Figure 21).

Une fois les prélèvements achevés, les chiffonnettes sont conservées dans des glacières contenant des plaques eutectiques avant d'être traitées au laboratoire dans les 24 heures qui suivent.



**Figure 20** : Représentation schématique de la surface d'un tapis convoyeur en PVC. La bande de couture du tapis convoyeur nous a permis de délimiter les zones à analyser. A : Prélèvements de surfaces à la campagne 1. Les zones 2 et 4 ont servi aux chiffonnages successifs avant et après N-D. Les zones 1 et 3 ont servi aux empreintes gélosées avant et après N-D. B : Prélèvements de surfaces aux campagnes 2 et 3. Les zones B et D ont servi aux 15 chiffonnages successifs avant N-D et les zones A et F aux 15 chiffonnages successifs après N-D. Les zones C et E ont servi aux empreintes gélosées avant et après N-D.



**Figure 21** : Gabarits utilisés pour les prélèvements par chiffonnages (gabarit blanc de droite) et empreintes gélosées (gabarit gris de gauche). Pour la première campagne, les prélèvements par chiffonnage et empreintes ont été réalisés sur les mêmes surfaces avant et après N-D. Pour les campagnes 2 et 3, les prélèvements par chiffonnage et empreintes ont été réalisés sur 4 machines avant N-D et 4 autres machines après N-D.

## 2. Prélèvement de surface par empreintes gélosées

Des empreintes par un milieu gélosé Tryptone Soya Agar, TSA (Oxoid, Dardilly, France) supplémenté avec du neutralisant polyvalent ATL<sup>®</sup> à 10% (Humeau) ont été réalisées sur le tapis convoyeur en PVC et sur les machines éplucheuses Townsend<sup>®</sup>, sur des surfaces juxtaposées à celles échantillonnées par chiffonnage. Les boîtes contact ont été clipsées sur un applicateur adapté ATL<sup>®</sup> (Humeau), conforme à la norme ISO 18593 (Anonyme, 2004) de prélèvements de surfaces en agroalimentaire (temps de contact : 10 secondes, pression appliquée : 25g/cm<sup>2</sup> de gélose, Figure 22). Les empreintes ont été réalisées avant et après N-D exactement au même endroit (Figure 20 pour PVC et Figure 21 pour acier inoxydable). Pour cela, nous avons utilisé un gabarit perforé de 6 cercles. La superficie de contact de la gélose est de 20 cm<sup>2</sup>. Deux empreintes successives ont été réalisées dans chaque cercle, à un intervalle de temps de 10 secondes. Une fois au laboratoire, les boîtes contact de TSA ont été incubées à 25°C pendant 24 heures pour les prélèvements avant N-D. Pour les empreintes réalisées après N-D, les boîtes contact de TSA ont été incubées 6 jours puis la durée prolongée jusqu'à 14 jours. Pour cela, les boîtes ont été emballées de façon non hermétique dans un sac contenant un papier imbibé d'eau stérile pour éviter qu'elles ne se dessèchent. Cette dernière étape n'entraîne pas l'anaérobiose comme en atteste la croissance de colonies d'espèces aérobies strictes, des *Pseudomonas*, observée entre 6 et 14 jours d'incubation.



**Figure 22 :** Boîte contact TSA clipsée sur l'applicateur ATL®

### **3. Prélèvements d'air**

Afin d'évaluer la charge bactérienne qui se dépose sur les surfaces, 12 boîtes de Petri contenant de la gélose blanche à 15g/L (Oxoid) ont été réparties dans la salle de découpe comme suit :

- 2 boîtes placées sur un boîtier électrique à 1m 80 du sol à côté d'une machine éplucheuse
- 3 boîtes placées sur une table à 1m 40 du sol à côté d'une machine éplucheuse
- 2 boîtes placées au dessus du tapis convoyeur à 1m 40 du sol
- 2 boîtes placées sur un boîtier électrique à 1m 80 du sol, entre une machine éplucheuse et un tapis convoyeur
- 3 boîtes placées sur une table à 1m 40 du sol à côté d'une machine éplucheuse.

Les 12 boîtes de gélose blanche ont été laissées ouvertes pendant les 6 heures correspondant au pic d'activité de l'atelier. Elles ont été ensuite fermées puis expédiées au laboratoire pour les analyses. La gélose blanche a été décrochée des boîtes de Petri à l'aide d'une spatule stérile puis déposée dans des sacs stériles type Stomacher munis d'un filtre. Vingt cinq millilitres d'eau peptonnée 1g/L (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés et la gélose passée dans un homogénéisateur péristaltique pendant 1 minute (AES laboratoire, Combourg, France) pour en décrocher les cellules bactériennes et procéder par la suite à un dénombrement des UFC sur milieu TSA à 25°C pendant 3 jours.



## **C. Détermination des populations microbiennes à partir des prélèvements par chiffonnage**

### **1. Traitement des chiffonnettes**

Vingt cinq mL d'eau peptonnée 1g/L sont ajoutés dans chaque sac de chiffonnette. Les prélèvements sont ensuite homogénéisés dans un homogénéisateur péristaltique pendant 1 minute selon la norme ISO 18593 (Anonyme, 2004) . Un mL est utilisé pour la quantification des cellules totales, 1 mL pour la quantification des cellules viables et le reste dédié au dénombrement des cellules cultivables à l'aide du Spiral System (Spiral System<sup>®</sup> DS, Interscience, France). Les fractions servant aux quantifications des cellules totales et viables sont centrifugés à 15000g pendant 3 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot bactérien conservé à - 30°C.

### **2. Dénombrement des UFC**

L'ensemencement des boîtes est réalisé à l'aide du Spiral System<sup>®</sup>. Les suspensions bactériennes des deux premières chiffonnettes sont filtrées sur une grille préalablement désinfectée avec de l'éthanol afin d'éliminer les particules présentes dans les suspensions qui risqueraient de boucher le tube de l'ensemencement. Pour chaque prélèvement, 0,0492 mL est déposé sur milieu TSA. Pour les prélèvements effectués sur l'acier inoxydable après N-D, un double ensemencement au Spiral est réalisé (limite de détection de  $-0,35 \log \text{UFC/cm}^2$ ). Les boîtes de TSA ont été incubées à 25°C pendant 6 jours. Pour les chiffonnages réalisés après N-D, la durée d'incubation des boîtes de TSA a été prolongée jusqu'à 14 jours. Ceci a été fait pour les campagnes 2 et 3. Les boîtes ont donc été emballées dans un sac contenant un papier imbibé d'eau stérile pour éviter la déshydratation du TSA.

### **3. Evaluation des populations totales et viables des surfaces**

#### **3.1. Incorporation de l'EMA dans les cellules**

Les culots bactériens décongelés sont suspendus dans 490  $\mu\text{L}$  d'eau stérile. Dix  $\mu\text{L}$  d'une solution d'EMA (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) à une concentration finale de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Rudi *et al.*, 2005) sont ajoutés aux suspensions bactériennes. Après homogénéisation, les solutions sont incubées à température ambiante pendant 5 minutes à l'obscurité puis exposées à la lumière

pendant 2 minutes. La source de lumière est une lampe Osram SLG 1000 avec une ampoule halogène de 650 W, placée à 20 cm au-dessus des tubes ouverts. Les tubes ont été placés dans la glace avant exposition à la lumière pour réduire au minimum l'élévation de température de la suspension. Les tubes sont centrifugés à 15000 g pendant 3 minutes, le surnageant éliminé et les culots bactériens conservés à - 30°C jusqu'au lendemain pour l'extraction de l'ADN.

### 3.2. Extraction de l'ADN

Les culots bactériens traités et non-traités à l'EMA sont suspendus dans 100 µL de tampon Phosphate (Phosphate Buffer Solution, PBS) 1X filtré (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France). L'ADN total est ensuite extrait en utilisant le kit « MagNa Pure LC DNA isolation kit III » (Roche® Applied Science, Meylan, France), selon les instructions du fabricant (Annexe 5). Les extraits d'ADN sont conservés à - 30°C.

### 3.3. Quantification des cellules totales et viables par PCR en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est réalisée en utilisant l'appareil LightCycler® 480 (Roche® Applied Science). Les réactions d'amplification sont réalisées dans des plaques de 96 puits en utilisant du SYBR®-Green PCR 2X Master Mix (Applied Biosystems®) à une concentration finale de 1X. Chaque réaction est réalisée en double dans un volume final de 25 µL avec une concentration finale de 0,2 µM pour chaque amorce F-Bact1369 (5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3') et R-Prok1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Suzuki *et al.*, 2000) et 10 µL de la dilution 10<sup>-1</sup> des solutions d'ADN afin de diluer d'éventuels inhibiteurs de la PCR. L'amplification est effectuée selon les conditions suivantes :

- Dénaturation initiale : 95°C / 10 min
  - Dénaturation des brins : 95°C / 10 s
  - Hybridation de la *Taq* polymérase : 60°C / 2 sec
  - Elongation du fragment : 60°C / 1 min
- } 40 cycles

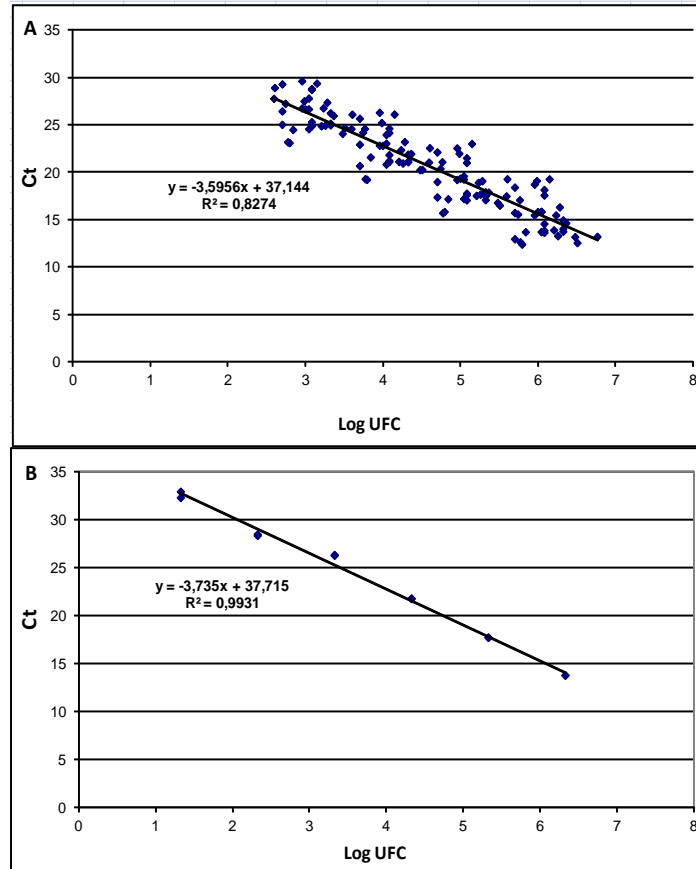
#### Courbe standard de quantification :

Nous avons établi une relation de proportionnalité entre les UFC et les valeurs de cycle seuil (Ct) déterminées par qPCR selon la méthode proposée par Lyons *et al.* (2000). Pour cela, nous avons choisi de travailler sur 33 souches appartenant aux genres bactériens dominants isolés d'équipements de l'atelier de viande bovine (Tableau 3). Les souches sont cultivées dans du

milieu Tryptone Soy Broth, TSB (BioMérieux, Craponne, France) à 25°C pendant 24 h. Les souches sont ensuite repiquées sur TSA en pente (afin d'obtenir un maximum de culture bactérienne) et les tubes incubés à 25°C pendant 24 h. Cinq mL d'eau peptonnée sont ajoutés aux tubes de TSA en pente et la culture bactérienne décrochée à l'aide d'une anse stérile. La suspension bactérienne est ensuite transvasée dans un tube de 1,5 cm de diamètre et la densité optique (DO<sub>600 nm</sub>) fixée à 0,15 à l'aide d'un colorimètre WPA (Biochrom, Cambridge, UK). La concentration de la suspension bactérienne est alors comprise entre 7.10<sup>7</sup> et 10<sup>8</sup> UFC/mL. Le dénombrement des UFC a été réalisé par étalement sur milieu gélosé TSA et incubation des boîtes à 25°C pendant 24 heures. L'ADN bactérien de chacune des suspensions est extrait par le « MagNa Pure LC DNA isolation kit III ». Des quantifications par PCR en temps réel sont réalisées sur des dilutions au dixième en séries (jusqu'à 10<sup>-4</sup>) des ADN obtenus afin de construire le graphe portant le nombre de Ct en fonction du nombre d'UFC. La droite de régression calculée à partir de l'ensemble des points obtenus correspond à notre droite standard de référence (Figure 23). Cette droite standard coïncide avec la droite de régression de la souche *Pseudomonas* 09EMPF54 qui est le témoin positif. C'est cette droite de régression qui sera utilisée pour quantifier les populations bactériennes totales et viables des chiffonnages réalisés sur les surfaces d'équipements de l'atelier de viande.

**Tableau 3 :** Souches choisies pour la courbe standard de quantification par qPCR. L'identification des isolats par comparaison des séquences 16S à celles présentes dans la base de donnée RDP10 ne nous a pas permis d'attribuer un nom d'espèce aux différentes souches. Nous avons donc restreint l'identification phylogénétique au genre.

Genre	Référence
<i>Dermaococcus sp.</i>	09EMPF7
<i>Chryseobacterium sp.</i>	09EMPF8
<i>Acinetobacter sp.</i>	09EMPF9
<i>Arthrobacter sp.</i>	09EMPF10
<i>Staphylococcus sp.</i>	09EMPF11
<i>Psychrobacter sp.</i>	09EMPF14
<i>Corynebacterium sp.</i>	09EMPF15
<i>Microbacterium sp.</i>	09EMPF19
<i>Carnobacterium sp.</i>	09EMPF20
<i>Brochothrix sp.</i>	09EMPF21
<i>Sphingobacterium sp.</i>	09EMPF23
<i>Chryseobacterium sp.</i>	09EMPF24
<i>Kocuria sp.</i>	09EMPF28
<i>Microbacterium sp.</i>	09EMPF36
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF40
<i>Paracoccus sp.</i>	09EMPF43
<i>Rhodococcus sp.</i>	09EMPF44
<i>Massilia sp.</i>	09EMPF48
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF49
<i>Acinetobacter sp.</i>	09EMPF50
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF54
<i>Serratia sp.</i>	09EMPF64
<i>Corynebacterium sp.</i>	09EMPF68
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF71
<i>Aeromonas sp.</i>	09EMPF74
<i>Sejongia sp.</i>	09EMPF75
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	09EMPF76
<i>Rothia sp.</i>	09EMPF85
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF87
<i>Staphylococcus sp.</i>	09EMPF88
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF90



**Figure 23** : A : Gamme standard des 33 souches représentatives des genres isolés sur PVC et acier inoxydable. La droite de régression calculée à partir de l'ensemble des points coïncide avec la droite de régression de la souche *Pseudomonas* 09EMPF54. B : Droite standard de la souche *Pseudomonas* 09EMPF54 (témoin positif) utilisée pour la quantification des populations bactériennes totales et viables.

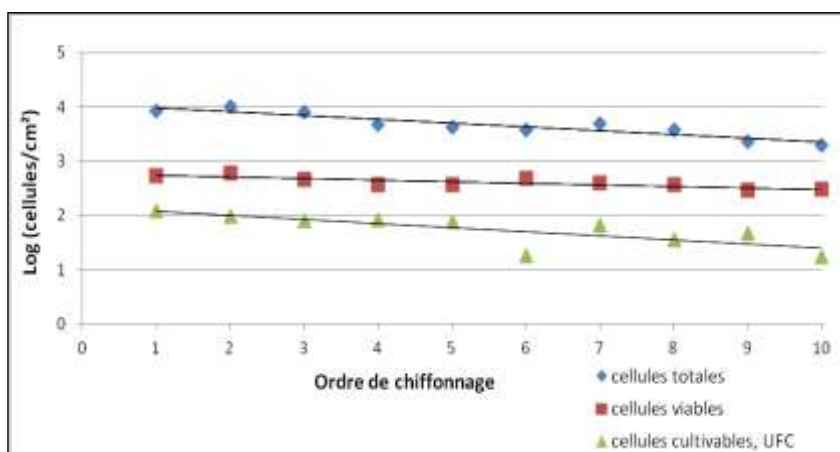
### 3.4. Evaluation de la population bactérienne

Les chiffonnages successifs d'une même surface permettent de construire une droite de décrochement en portant le logarithme du nombre de cellules décrochées en fonction du numéro d'ordre de chiffonnage. Nous obtenons des courbes monophasiques comme le montre la figure 24. L'équation de Veulemans *et al.* (1970) nous permet de calculer une charge bactérienne présente sur les surfaces, plus proche de la réalité que celle qui aurait été évaluée par un seul chiffonnage. La formule employée est :

$$\sum_{n=1}^{n \rightarrow \infty} N_n = \frac{N_1}{1 - 10^{-k}}$$

Où  $n$  est le numéro d'ordre de chiffonnage,  $N_1$  le nombre de cellules décrochées au premier chiffonnage et  $k$  la pente de la droite de décrochement multipliée par  $-1$ . Dix huit des 70 pentes

obtenues (pentes des droites de décrochement des cellules totales, viables et cultivables) ont une valeur positive. Afin d'évaluer une charge bactérienne par la formule de Veulemans, nous avons choisi de remplacer ces pentes positives par la pente négative la plus proche de zéro pour chaque cas figure : PVC avant N-D, PVC après N-D, acier inoxydable avant N-D, acier inoxydable après N-D. Pour deux cas de chiffonnages (acier inoxydable après N-D), un seul point a été obtenu. La formule de Veulemans ne pouvant être appliquée, seul ce point a été considéré pour le calcul de la charge bactérienne. Les résultats des charges bactériennes sont exprimés en log (UFC/cm<sup>2</sup>) pour les cellules cultivables et en log (cellules/cm<sup>2</sup>) pour les cellules totales et viables.



**Figure 24** : Droites de décrochement des cellules totales, viables et UFC après 10 chiffonnages successifs réalisés sur une machine épilucheuse Townsend® en acier inoxydable.

### 3.5. Analyses statistiques

Les résultats sont traités par analyse de variance suivie d'une comparaison multiple des moyennes. Pour le pourcentage des cellules viables parmi les cellules totales et celui des cultivables parmi les viables, la comparaison des pourcentages médians a été réalisée en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis car les variances n'étaient pas homogènes. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Statgraphics 3.3 (Sigma Plus, Paris, France). La signification statistique a été évaluée à  $P \leq 0,05$  avec  $P$  la probabilité limite sous l'hypothèse nulle.

## **D. Isolement des bactéries et conservation des isolats**

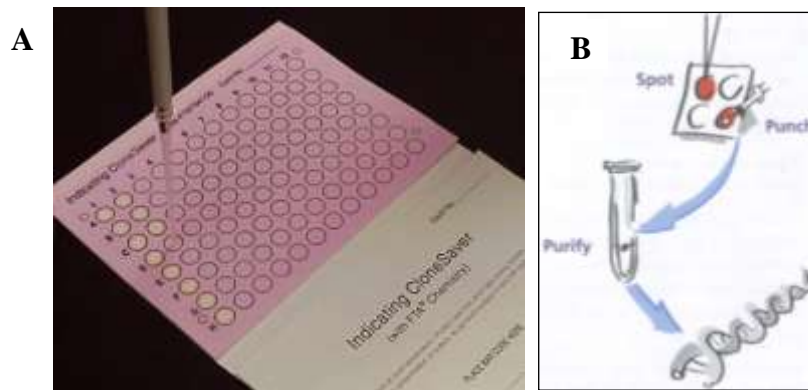
Cent huit, 134, et 127 isolats ont été collectés respectivement durant les campagnes 1, 2 et 3. Les isolats de la campagne 1 proviennent des prélèvements par empreinte (49 isolats) et par chiffonnages (59 isolats) soit un total de 128 prélèvements alors que les isolats des campagnes 2 et 3 proviennent uniquement des prélèvements par chiffonnages lesquelles correspondent à 140 prélèvements. Une colonie a été choisie pour chaque phénotype observé sur les différentes boîtes d'empreintes (campagne 1) et sur une même série de chiffonnages, en partant de la boîte la moins chargée qui correspond au dernier chiffonnage. Les souches ont été isolées sur milieu TSA pour s'assurer de leur pureté. Les souches ont été ensuite conservées à - 80° C comme suit : à partir d'une culture fraîche sur gélose TSA en pente, 10 mL de bouillon de congélation (Annexe 6) sont ajoutés dans chaque tube et la culture décrochée à l'aide d'une anse stérile. La suspension est transvasée dans un flacon stérile et incubée à 25°C pendant 5h ± 1h. La culture est ensuite répartie dans des cryotubes contenant des billes ainsi qu'une solution cryo-préservatrice (AES Chemunex, Combourg, France). Après homogénéisation de la suspension, l'excès de la suspension est retiré et les tubes conservés au congélateur à - 80°C.

## **E. Identification des bactéries par séquençage de l'ADNr 16S**

### **1. Extraction de l'ADN par la technique FTA<sup>®</sup>**

La technique Whatman FTA<sup>®</sup> (Flinders Technology Associates) (Dutscher, Brumath, France) a été utilisée pour extraire l'ADN des isolats collectés durant les trois campagnes de prélèvement. La technique FTA<sup>®</sup> consiste en un traitement chimique sur papier Whatman qui permet l'extraction et le stockage d'ADN (Figure 25A). La lyse cellulaire s'effectue directement sur le papier traité sans utiliser de procédés d'extraction supplémentaires (Smith *et al.*, 2004). A partir d'un cryotube de conservation à - 80°C, les souches sont cultivées sur milieu TSB à 25°C pendant 24 heures. Afin de vérifier la pureté des souches, un isolement est effectué sur milieu TSA. Les souches sont ensuite repiquées à partir du TSB sur TSA en pente et incubées 24 h à 25°C. Les cultures bactériennes sont resuspendues dans de l'eau peptonnée et la densité optique (DO<sub>600 nm</sub>) fixée à 1,5 (concentration bactérienne comprise entre 7.10<sup>8</sup> et 10<sup>9</sup> UFC/mL) dans un tube de 1,5 cm de diamètre. Cinq µL de culture bactérienne sont déposés au centre des cercles imprimés sur la

carte FTA<sup>®</sup> qui est mise à sécher sur PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) pendant une heure. Les cartes FTA<sup>®</sup> sont ensuite pliées et conservées à températures ambiante, à l'abri de l'humidité et de la lumière.



**Figure 25 :** A : Carte Whatman FTA<sup>®</sup>. La culture bactérienne est déposée au centre des cercles imprimés sur la carte qui est mise à sécher. B : Un poinçon de la carte est récupéré à l'aide d'un emporte-pièce puis placé dans un tube stérile pour une étape de purification.

## 2. Amplification de l'ADNr 16S des isolats par PCR classique

### 2.1. Lavage de la membrane FTA<sup>®</sup>

Avant de procéder à l'amplification de l'ADN, une étape de d'élution est réalisée sur les membranes comme suit :

- 1-Découper un disque d'échantillon à l'aide d'un emporte-pièce puis le placer dans un tube stérile (Figure 25B)
- 2-Ajouter 100  $\mu$ L de solution de Purification FTA<sup>®</sup> et laisser agir 3 min
- 3-Retirer la solution de Purification FTA<sup>®</sup> à l'aide d'une micropipette
- 4-Ajouter 100  $\mu$ L d'eau moléculaire (Eppendorf, LePecq, France) et laisser agir 3 minutes
- 5-Retirer l'eau à l'aide d'une micropipette

Les étapes 2 à 5 doivent être répétées une deuxième fois.

### 2.2. Choix des amorces d'amplification de l'ADNr 16S

Les amorces suivantes dites « universelles » sont utilisées pour les différentes réactions d'amplification.

**Tableau 4 :** Amorces choisies pour les réactions d'amplification

Nom	sens / antisens	Séquence (5'- 3')	Position sur <i>E.coli</i>	T°C d'hybridation utilisée	Référence
63F	sens	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	63	60	(Dennis <i>et al.</i> , 2003)
1492R	antisens	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	1510	64	(Devereux <i>et al.</i> , 1995)
27F	sens	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	27	55	(Devereux <i>et al.</i> , 1995)
1387R	antisens	GGG CGG TGT GTA CAA GGC	1387	61	(Dennis <i>et al.</i> , 2003)

### 2.3. Réactions d'amplifications

Les amplifications sont réalisées dans le thermocycleur GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) en utilisant le kit « Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> » (Roche<sup>®</sup> Applied Science). Le mix PCR est composé de tampon de réaction 1X (Concentration initiale de 5X avec 7,5 mM de MgCl<sub>2</sub>), 200 µM de dNTPs, 0,2 µM d'une amorce sens (Forward, F) et antisens (Reverse, R) (Tableau 4) et 2,5 U de *Taq* polymérase 5U/µL pour un volume réactionnel final de 50 µL.

Les couples d'amorces (63/1492, 63/1387, 27/1492 et 27/1387) sont testés jusqu'à l'obtention du produit PCR attendu. Le protocole de PCR est le suivant :

- Dénaturation initiale 94°C / 2 min
  - Dénaturation des brins à 94°C/15 sec
  - Hybridation de la *Taq* pendant 30 sec
  - Elongation 72°C/90 sec
  - Elongation finale 72°C/7 min
- } 30 cycles

### 2.4. Migration des amplicons sur gel d'agarose et dosage par fluorimétrie

La présence des produits d'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant du Bromure d'éthidium BET (Prolabo, Fontenay-sous-bois, France) dans un tampon Tris Borate EDTA, TBE 1X (Euromedex, Mundolsheim, France). Cinq µL de produit PCR mélangés à 5 µL d'un colorant de charge, le bleu de bromophénol (VWR International) sont chargés sur le gel. La taille des produits d'amplification est vérifiée par comparaison à un standard de poids moléculaire (marqueur VI, Roche<sup>®</sup> Diagnostic). Ce marqueur comporte 11 fragments d'ADN double-brin de 154 à 2176 paires de bases. Après migration pendant 1 h à 120 volts, le gel est déposé sur un transilluminateur UV (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) et les produits d'amplifications visualisés. La taille attendue est environ 1500 pb. Les amplicons ont été ensuite dosés en utilisant le fluorimètre Qubit (Life technologies, Villebon-Sur-



Yvette, France) (Annexe 7). La concentration minimale des amplicons retenue pour le séquençage est de 20 ng/μL.

### 3. Séquençage de l'ADNr 16S

Les amorces utilisées pour le séquençage sont décrites dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Amorces choisies pour les réactions de séquençage

Nom	sens / antisens	Séquence (5' - 3')	Tm (°C)	Position sur <i>E.coli</i>	Référence
SP4	antisens	CTC GTT GCG GGA CTT AAC	56	1089	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
SP5	antisens	GNT ACC TTG TTA CGA CTT	50	1492	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
1387R	antisens	GGG CGG TGT GTA CAA GGC	61	1387	(Dennis <i>et al.</i> , 2003)

Les séquençages ont été effectués par la société Eurofins (Paris, France). Les séquences obtenues sont comparées à celles de la base de données RDP10 (<http://rdp/cme.msu.edu>).

## F. Identification-caractérisation des souches de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Acinetobacter*

### 1. Typage moléculaire des souches de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Acinetobacter*

Dans un premier temps nous avons procédé à un alignement de séquences d'ADNr 16S pour éliminer les quelques souches isolées phylogénétiquement et de ce fait non persistantes dans l'usine. Au final, 37, 41 et 25 isolats de *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* issus des trois campagnes de prélèvement ont été retenus pour le typage. Les isolats sont mis en culture dans du TSB à 37°C, 25°C et 30°C respectivement pendant 24 h à partir des cryotubes (une bille par tube de TSB) préalablement décongelés. Les souches sont ensuite étalées sur milieu TSA et les boîtes incubées dans les mêmes conditions. La pureté des cultures est vérifiée visuellement. Les cultures sur boîtes TSA ont été ensuite expédiées au laboratoire de BioMérieux® (Craponne, France) qui utilise le système Diversilab®, un outil qui va permettre de générer des empreintes génétiques des différentes souches bactériennes en se basant sur la technique rep-PCR (Cf.§5.1 p 56).

## **2. Identification des souches de *Staphylococcus* à l'espèce par hybridation sur membrane**

Les souches de *Staphylococcus* choisies pour le typage ont été mises en culture dans du TSB à 37°C pendant 24 h à partir des cryotubes (une bille par tube) préalablement décongelés. Les souches sont ensuite étalées sur milieu TSA et les boîtes incubées dans les mêmes conditions. La pureté des cultures est vérifiée visuellement. Les cultures sur boîtes TSA ont été ensuite expédiées au laboratoire de l'Institut National de Recherche Agronomique Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Clermont-Ferrand-Theix) où Giammarino *et al.* (2005) ont développé une puce de type « macro array » permettant d'identifier des espèces de *Staphylococcus*. Leur outil se base sur l'utilisation de sondes espèces-spécifiques qui ciblent le gène codant la superoxyde dismutase A (*sodA*). Cette technique a été testée avec succès sur des souches isolées aussi bien d'environnements alimentaires que cliniques.

## **G. Etude de l'écosystème des surfaces inertes par la méthode DGGE**

### **1. « Poolage » de l'ADN des différentes chiffonnettes**

L'amplification de l'ADN nécessite une quantité minimale que nous avons obtenue en mélangeant l'ADN des séries de prélèvements faits sur un même matériau lors d'une même campagne: nous avons ainsi mélangé l'ADN de deux séries de chiffonnages successifs réalisés sur le tapis convoyeur en PVC (15 chiffonnages/série). Nous obtenons un échantillon d'ADN issu de 30 chiffonnages. La même procédure a été appliquée pour les machines éplucheuses Townsend<sup>®</sup> en acier inoxydable : nous avons mélangé l'ADN des 10 chiffonnages successifs. Sachant que nous avons chiffonné quatre machines, nous obtenons un échantillon d'ADN issu de 40 chiffonnages. Au final, nous obtenons pour chaque campagne (campagnes 2 et 3) quatre échantillons d'ADN : PVC avant N-D, PVC après N-D, acier inoxydable avant N-D et acier inoxydable après N-D. Une précipitation de l'ADN a été réalisée sur les échantillons « poolés » selon le protocole fourni par Fermentas<sup>®</sup> International (Saint Rémy lès Chevreuses, France) :

- Ajouter 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) à la solution d'ADN
- Ajouter du glycoène (Fermentas<sup>®</sup> International) à raison de 1 µL/mL
- Ajouter 1 volume d'isopropanol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) à la solution et vortexer quelques secondes

- Incuber les solutions à - 30°C pendant 3 heures
- Centrifuger le mélange à 9000g pendant 15 minutes et éliminer le surnageant
- Rincer le culot d'ADN avec de l'éthanol 70% froid (Sigma-Aldrich®)
- Laisser sécher le culot à l'air libre puis resuspendre le culot d'ADN dans 20 µL d'eau moléculaire
- Conserver les solutions d'ADN à -30°C.

## 2. Amplification de l'ADNr 16S et de la région V3

La première PCR (PCR 16S), destinée à amplifier 700 pb de l'ADNr 16S bactérien est réalisée en utilisant les amorces suivantes :

**Tableau 6 :** Amorces utilisées pour la PCR 16S

Nom	sens / antisens	Séquence (5' - 3')	T°C d'hybridation utilisée	Position sur <i>E.coli</i>	Référence
W01	sens	AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC	50	9	Ogier <i>et al.</i> , 2002
W012	antisens	TAC GCA TTT CAC C(GT)C TAC A	50	702	Ogier <i>et al.</i> , 2002

Les amplifications sont réalisées dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700. Le protocole d'amplification est celui décrit à la page 78 à l'exception des amorces W01 et W012 qui sont à une concentration finale de 0,6 µM. Les cycles d'amplification sont programmés comme suit :

- Dénaturation initiale 96°C / 4 min
  - Dénaturation des brins à 96°C/10 sec
  - Hybridation à 50°C/30 sec
  - Elongation 72°C/2 min
  - Elongation finale 72°C/7 min
- } 30 cycles

Une seconde PCR dite « PCR nichée » destinée à amplifier la région discriminante V3 de 200 pb, est directement réalisée sur 1 µL du produit PCR de l'ADNr 16S précédemment amplifié, avec les mêmes conditions d'amplification précédentes, à l'exception des amorces HDA1 et HDA2 qui sont à des concentrations finales respectives de 2,1 µM et 0,6 µM (Tableau 7). Les cycles d'amplification de la région V3 sont programmés comme suit :

- Dénaturation initiale 94°C/ 4 min
  - Dénaturation des brins 94°C/30 s
  - Hybridation à 58°C/30 s
  - Elongation 72°C/1 min
  - Elongation finale 72°C/ 7 min
- } 30 cycles

**Tableau 7** : Amorces utilisées pour la PCR V3

Nom	sens / antisens	Séquence (5'- 3')	T°C d'hybridation utilisée	Position sur <i>E.coli</i>	Référence
HDA1	sens	<sup>1</sup> CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG	58	338	Ogier <i>et al.</i> , 2002
HDA2	antisens	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	58	536	Ogier <i>et al.</i> , 2002

<sup>1</sup>L'amorce HDA1 contient en 5' une queue GC qui n'est pas destinée à s'hybrider avec l'ADN mais qui permet de maintenir les deux brins d'ADN lors de la migration électrophorétique.

### 3. Préparation du gel, électrophorèse et révélation du gel

Le système Ingeny phorU (Ingeny international<sup>®</sup>, Amundsenweg, Pays-Bas) est utilisé pour la séparation des produits d'amplification. Le dispositif est composé d'une cassette munie de deux plaques en verre et d'une cuve dotée d'un système de chauffage assurant la circulation du tampon de migration. Un dispositif formé de deux compartiments séparés par une vanne permet de couler le gel entre les deux plaques de verre (Figure 26). Des essais préalables ont été réalisés pour optimiser le gradient chimique en urée/formamide du gel afin d'obtenir la meilleure séparation possible des fragments V3 des espèces bactériennes. Ces conditions doivent être suffisamment dénaturantes pour déstabiliser les 3 liaisons H liant les bases G et C d'espèces « haut GC ». Le gradient chimique en urée/formamide retenu dans notre étude est de 38 - 65%. La composition du gel est la suivante :

Produits	Solution à 38% dite « bas GC »	Solution à 65% dite « haut GC »
Urée (Euromedex, Mundolsheim, France)	3,83 g	6,55 g
Formamide (Euromedex, Mundolsheim France)	3,65 mL	6,24 mL
Tris-acétate-EDTA (TAE) 50 X (Euromedex, Mundolsheim, France)	480 µL	480 µL
Acrylamide (Euromedex, Mundolsheim, France)	4,8 mL	4,8 mL
Eau stérile	qsp 24 mL	qsp 24 mL

qsp : quantité suffisante pour

Les solutions « haut GC » et « bas GC » sont versées séparément dans chacun des compartiments à gradient (la vanne qui sépare les deux compartiments est fermée, Figure 26). Cent microlitres de persulfate d'ammonium (APS) 10% (Euromedex, Mundolsheim, France) et 6  $\mu$ L de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthane-1,2-diamine) (Euromedex, Mundolsheim, France) sont ajoutés dans chaque compartiment afin d'initier et catalyser la polymérisation. La vanne est ensuite ouverte afin de permettre le mélange des deux solutions. A l'aide de l'aiguille reliée au compartiment contenant chacune des deux solutions, on réalise le gradient en faisant couler le gel entre les deux plaques de verre. Après polymérisation du gel, un gel de concentration est coulé en haut du gel de séparation afin de permettre une diffusion homogène de l'échantillon dans les mailles du gel. Le gel de concentration est préparé comme suit :

- Ajouter dans un bécher 200  $\mu$ L de TAE 50 X et 2 mL d'acrylamide et mettre sous agitation pendant quelques minutes
- Transvaser dans une éprouvette graduée et compléter le volume à 10 mL avec de l'eau stérile
- Retransvaser la solution dans le bécher puis ajouter 200  $\mu$ L d'APS 10% et 12  $\mu$ L de TEMED
- Couler la solution en haut du gel de séparation en faisant coulisser la pipette le long de la paroi de la plaque en verre puis insérer le peigne.

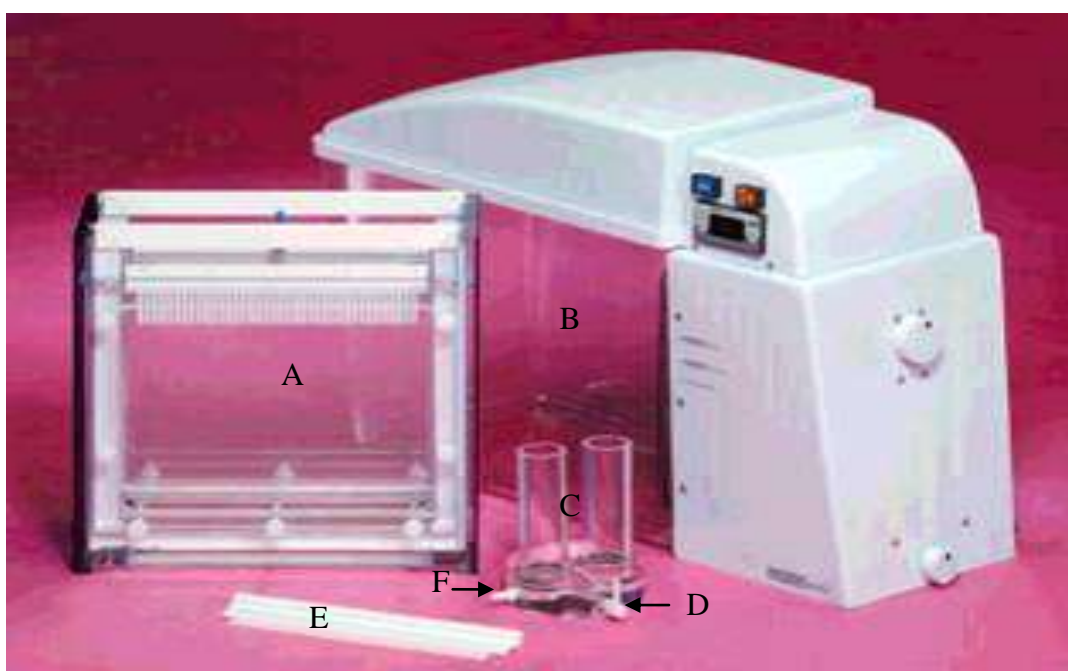
Une fois le gel polymérisé, le peigne est retiré et la cassette plongée dans la cuve contenant 17 litres de tampon TAE 1,25X préalablement chauffé à 60°C. Dix  $\mu$ L d'échantillon sont mélangés avec 4  $\mu$ L de bleu de bromophénol puis déposés en haut du gel. La migration a lieu pendant 16 h à 60°C. Les conditions de Voltage/Ampérage utilisés sont 120V/80 mA. Une fois la migration achevée, le gel est révélé 20 minutes dans un bain de TAE 1X contenant 100  $\mu$ L/L de BET (Prolabo) puis rincé 20 minutes dans un bain de TAE 1X. Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur à UV puis photographié et converti directement en image digitale pour analyse sur le logiciel Bionumerics.

#### **4. Analyse du gel par Bionumerics**

La photo convertie en fichier image est traitée par le logiciel Bionumerics (Applied-Maths, Kortrijk, Belgique) qui a pour fonction principale de standardiser les distances de migration des bandes par alignement avec des marqueurs de standardisation. Le logiciel permet la construction de dendrogrammes à partir du calcul de la distance entre deux profils selon l'indice de Jaccard. Le regroupement des profils se fait suivant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

## 5. Séquençage des bandes

Les bandes d'intérêt sont découpées avec des lames de scalpel neuves et introduites séparément dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. L'ADN est extrait en appliquant le protocole « Qiaex II Polyacrylamide Gel Extraction » (Qiagen, Courtaboeuf, France, Annexe 8). Dix  $\mu\text{L}$  de l'ADN extrait sont utilisés pour réaliser une PCR avec les amorces HDA1 et HDA2 sans la queue GC (Cf. §G.2 p 77). Les amplicons sont déposés sur un gel d'agarose 2% (Cf. §E.2.4 p 73) et les séquençages effectués par la société Eurofins. Les séquences obtenues sont comparées à celles déposées dans la base de données RDP10 (<http://rdp/cme.msu.edu>).



**Figure 26** : Dispositif IngenyphorU utilisé pour la séparation des produits d'amplification :

A : Cassette munie de deux plaques en verre

B : Cuve à électrophorèse contenant 17 litres de tampon de migration TAE à 1,25X

C : Compartiments à gradients

D : Vanne séparant les deux compartiments

E : Peigne utilisé pour la formation des puits dans le gel

F : Embout reliant l'aiguille (non illustrée sur ce schéma) aux compartiments à gradients.

## **IV- RESULTATS ET DISCUSSION**

# A. Quantification des bactéries de surfaces

## 1. Avant-propos

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué la charge bactérienne en termes de cellules totales (cellules vivantes et mortes), cellules viables et UFC des surfaces d'un tapis convoyeur en PVC et de machines épilucheuses Townsend® en acier inoxydable, avant et après les opérations d'hygiène menées dans l'atelier de découpe. Nous avons appliqué la formule de Veulemans *et al.* (1970) afin d'estimer une charge bactérienne plus proche de la réalité que celle qui aurait été évaluée par un seul chiffonnage. En effet, un seul chiffonnage est uniquement réalisé par les professionnels lors des contrôles microbiologiques des surfaces. Afin d'évaluer les forces d'adhésion des bactéries aux surfaces de l'atelier, nous avons exploité les valeurs des pentes  $k$  des droites de décrochement obtenues ainsi que le pourcentage de la population détachée par le premier chiffonnage. A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été jusqu'à présent réalisée sur terrain. Dans cette partie, nous allons présenter les résultats des campagnes 2 et 3 réalisées strictement de la même façon. Afin de faciliter l'interprétation de ces résultats, ces derniers seront exprimés sous forme de moyennes des deux campagnes.

## 2. Résultats

### 2.1. Populations des surfaces avant N-D

D'après la figure 27, on constate que la charge bactérienne des cellules totales est plus importante sur PVC (5,6 log cellules/cm<sup>2</sup>) que sur acier inoxydable (4,7 log cellules/cm<sup>2</sup>) ( $P=0,02$ ) contrairement aux cellules viables qui atteignent des charges équivalentes sur les deux matériaux (4,5 et 4,4 log cellules/cm<sup>2</sup>). Sur PVC, la charge bactérienne des UFC avant N-D est de 3,8 log UFC/cm<sup>2</sup> alors qu'elle atteint 2,9 log UFC/cm<sup>2</sup> sur acier inoxydable.

La proportion de cellules viables parmi les totales sur acier inoxydable (63%) est significativement plus importante que celle retrouvée sur PVC (8%). La proportion d'UFC parmi les cellules viables varie seulement de 3 à 9 % sur les deux matériaux, ce qui permet d'estimer l'importance de la population VNC sur les surfaces inertes de l'atelier de viande (Tableau 8).



**Tableau 8 :** Pourcentages médians des cellules viables parmi les totales évaluées par EMA-qPCR et des UFC parmi les viables. Une même lettre associée à deux valeurs signifie que les médianes de ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes.

	PVC		Acier inoxydable	
	Avant N-D	Après N-D	Avant N-D	Après N-D
Pourcentages des cellules viables parmi les totales	8% (B)	25% (BC)	63% (C)	2% (A)
Pourcentages des cellules cultivables parmi les viables	9% (C)	3% (BC)	3% (B)	0,3% (A)

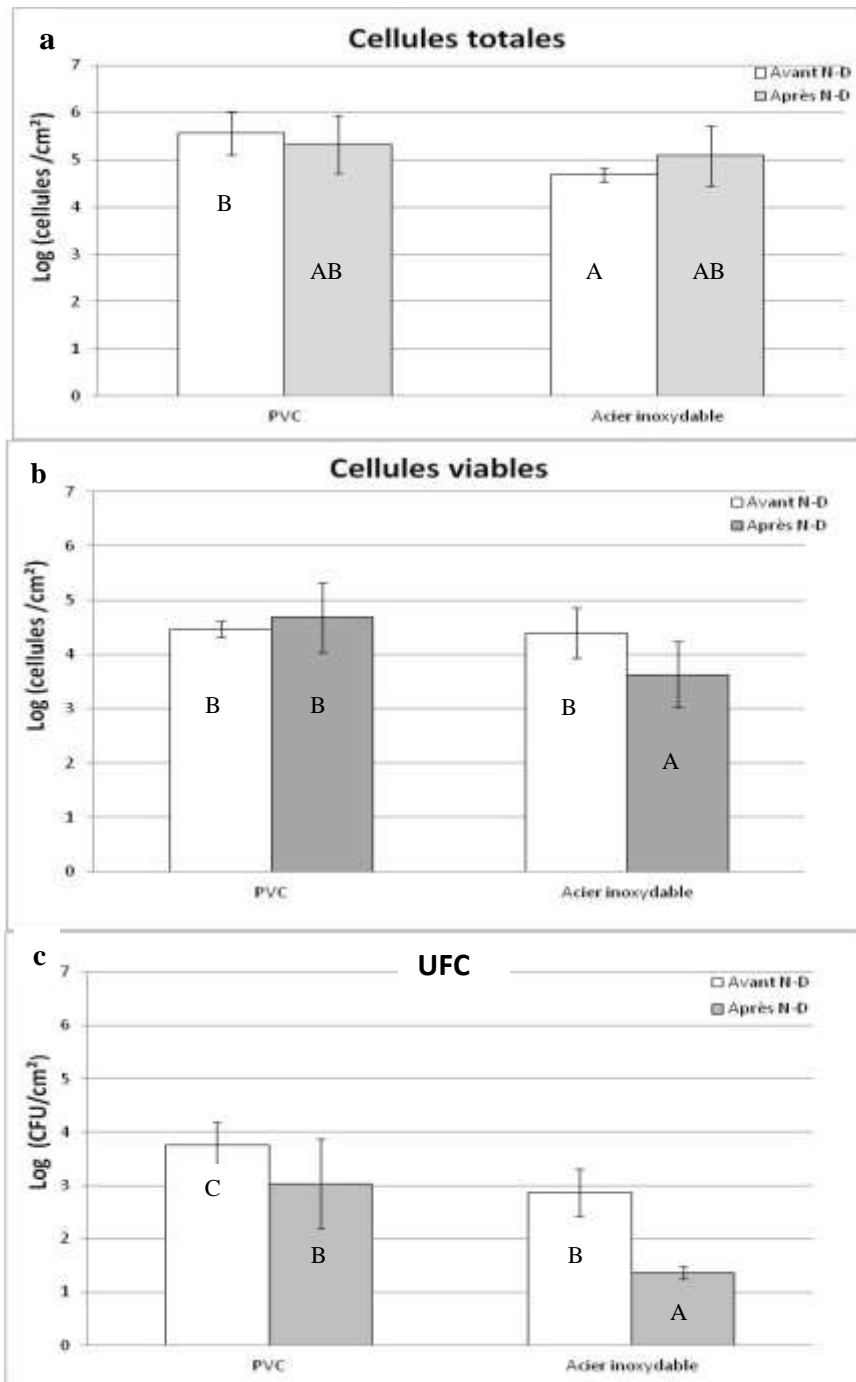
## 2.2. Efficacité des opérations d'hygiène

Le N-D n'entraîne pas de réduction des populations totales et viables sur PVC. (Figures 27a et b). Une légère réduction significative est cependant observée sur les UFC (Figure 27c,  $P=0,0003$ ). Sur l'acier inoxydable, le nombre de cellules totales est légèrement plus élevé après N-D (5,1 log cellules/cm<sup>2</sup>). Cette charge est équivalente à celle du PVC après N-D (5,3 log cellules/cm<sup>2</sup>, Figure 27a). Par ailleurs, on constate que la réduction du N-D sur l'acier inoxydable porte essentiellement sur les UFC avec 1,5 RD (Figure 27c) et sur les cellules viables avec 0,8 RD (Figure 27b) ( $P \leq 0,007$ ).

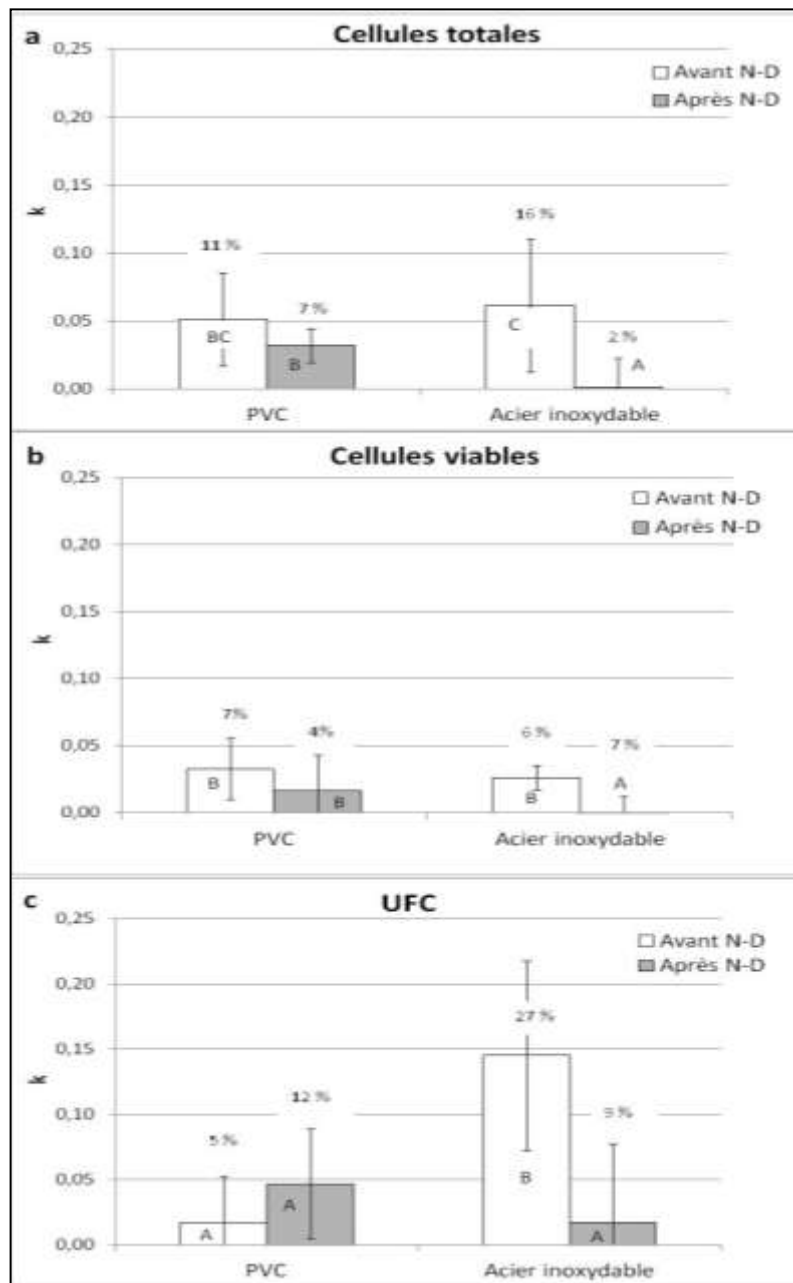
D'après le tableau 8, on voit que le pourcentage de cellules viables parmi les totales est réduit à 2 % après N-D sur acier inoxydable ( $P = 0,007$ ). La proportion d'UFC parmi les viables quant à elle atteint 0,3 % après N-D. Sur PVC, cette proportion n'est pas significativement différente de celle trouvée avant N-D.

## 2.3. Evaluation des forces d'adhésion des cellules bactériennes

Quelle que soit la population considérée sur PVC, il n'existe pas de différence significative des forces d'adhésion avant et après N-D (Figure 28,  $P \geq 0,23$ ) contrairement à l'acier inoxydable où les forces d'adhésions avant N-D sont plus faibles qu'après N-D ( $P \leq 0,01$ ) : Les UFC sont mieux décrochées que les cellules totales et les cellules viables ( $P=0,02$ ). Ce résultat est corroboré par les dénombrements du premier chiffonnage où le pourcentage de cellules totales et d'UFC décrochées avant N-D sur acier inoxydable est respectivement de 27 % et 16 %. Ces pourcentages diminuent après N-D pour atteindre 9 % et 2 % respectivement.



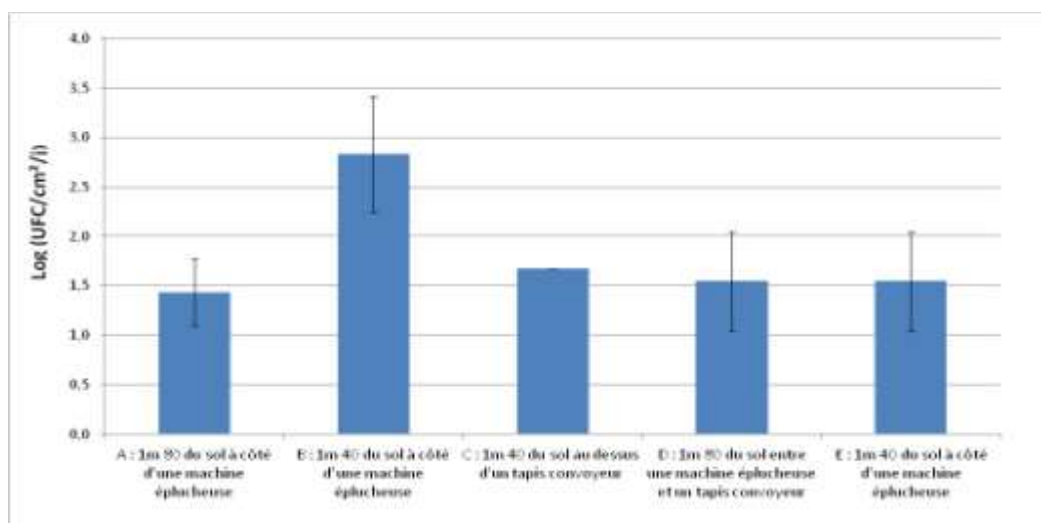
**Figure 27** : Populations totales (a), viables (b) et UFC (c) avant et après N-D. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types, n= 4 pour le PVC et n=8 pour l'acier inoxydable. Une même lettre associée à deux valeurs signifie que les moyennes de ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes ( $P>0,05$ ).



**Figure 28** : Evaluation des forces d'adhésions des cellules totales (qPCR, a), viables (EMA-qPCR, b) et UFC (c) par le pourcentage de cellules détachées par le premier chiffonnage ainsi que la pente  $k$  des droites de décrochement multipliée par  $-1$ . Plus les valeurs des  $k$  sont grandes, moins les forces d'adhésions des bactéries sont importantes. Les barres d'erreur représentent les écarts-type des valeurs de  $k$  :  $n=4$  pour PVC and  $n=8$  pour l'acier inoxydable. Une même lettre associée à deux conditions signifie que les moyennes de ces deux conditions ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ). Les différences significatives observées pour les valeurs moyennes de  $k$  sont aussi observées pour les pourcentages moyens du premier chiffonnage à l'exception des cellules viables sur acier inoxydable après N-D où les pourcentages moyens du premier chiffonnage n'étaient pas significativement différents (6 et 7 %).

## 2.4. Quantification de la charge bactérienne cultivable aéroportée

La charge bactérienne journalière cultivable qui se dépose sur les surfaces de la salle de découpe atteint en moyenne 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>/j. Cette charge est équivalente quel que soit l'emplacement étudié à l'exception de la zone où se trouve l'éplucheuse 8 où la charge bactérienne déposée atteint 2,8 log UFC/cm<sup>2</sup>/j (Figure 29).

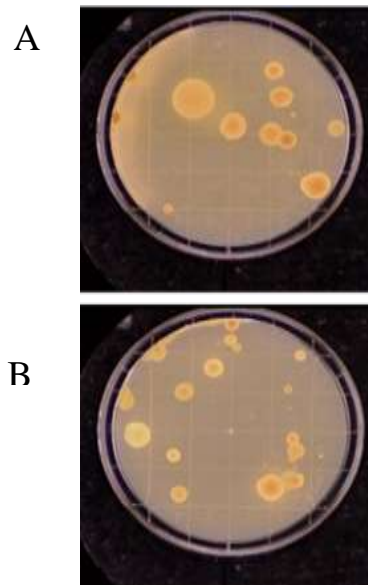


**Figure 29** : Charge bactérienne cultivable aéroportée qui se dépose sur les surfaces de l'atelier entre deux opérations d'hygiène. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types : n = 2 (A) ; n = 3 (B) ; n = 2 (C) ; n = 2 (D) ; n = 3 (E).

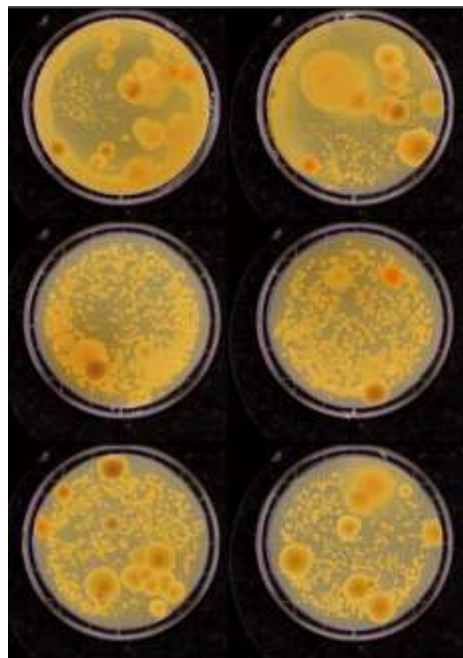
## 2.5. Empreintes gélosées après N-D

La figure 30 montre deux empreintes TSA réalisées sur PVC après N-D au même endroit à 10 secondes d'intervalle après incubation des boîtes à 25°C pendant 6 jours. Nous constatons qu'aucune des colonies des deux empreintes successives ne sont au même emplacement. La même observation a été faite sur les autres empreintes réalisées sur PVC et sur acier inoxydable où les colonies étaient moins nombreuses (résultats non présentés). La figure 31 montre les 6 boîtes contacts après 14 jours d'incubation. On constate la présence de deux types de populations bactériennes : une population formée de grosses colonies visibles après 6 jours d'incubation et une autre population formée de petites colonies qui ont poussées au bout de 14 jours d'incubation. Ces colonies ne sont pas visibles sur les empreintes réalisées sur l'acier inoxydable. Sur PVC, la différence du nombre de colonies obtenues entre 6 jours et 14 jours est en moyenne 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>. D'autre part, la comparaison de la charge bactérienne obtenue après application de la formule de Veulemans et celle obtenue sur la première boîte contact montre une différence de 1,9

et  $2,7 \log \text{ UFC/cm}^2$  sur PVC et acier inoxydable respectivement après 14 jours d'incubation de la première boîte contact. La figure 31 montre aussi qu'il n'y a pas de colonies alignées qui correspondent aux nombreuses entailles observées sur la surface du tapis convoyeur étudié.



**Figure 30** : Deux empreintes successives sur un tapis convoyeur en PVC après N-D (zone C, campagne 2). A : première empreinte, B : deuxième empreinte réalisée au même endroit que la première à 10 secondes d'intervalle. Les boîtes contact ont été incubées à  $25^\circ\text{C}$  pendant 6 jours.



**Figure 31**: Six empreintes TSA appliquées sur un tapis convoyeur en PVC après N-D (zone C, campagne 2). On constate la présence de deux types de populations bactériennes : une population formée de grosses colonies visibles après 6 jours d'incubation à  $25^\circ\text{C}$  et une autre population formée de petites colonies qui ont poussé après 14 jours d'incubation à  $25^\circ\text{C}$ .

### 3. Discussion

Il est étonnant de voir que le N-D provoque une faible réduction des cellules totales sur PVC malgré l'application d'opérations d'hygiène agressives. Une faible réduction des cellules totales a été également observée par Firmesse *et al.*, 2011 (résultats non publiés) sur des surfaces de meubles frigorifiques de vente soumis à des opérations d'hygiène moins agressives que celles réalisées dans les ateliers de viande. Par ailleurs, on constate que le nombre de cellules totales sur acier inoxydable est légèrement plus élevé après N-D et atteint une charge équivalente à celle retrouvée sur du PVC après N-D. Sachant que le N-D provoque la formation d'aérosols, ces fines particules portent des micro-organismes susceptibles de recontaminer les surfaces désinfectées en se redéposant (Burfoot, 2005). Selon Frenchia *et al.* (1998), le pouvoir contaminant de l'air est multiplié par 10 à 100 environ lorsqu'il y'a formation d'aérosols surtout pendant le nettoyage à la pression. La charge bactérienne en termes d'UFC retrouvée sur les surfaces proviendrait de la contamination aéroportée de l'industrie (1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>/j en moyenne dans notre cas) ainsi que de la charge bactérienne de la viande en contact avec ces surfaces. Par ailleurs, on constate que les populations de cellules totales sont équivalentes sur PVC et acier inoxydable après N-D malgré la présence d'entailles sur le tapis en PVC qui pourraient être des zones de rétention. Nous avons aussi constaté aussi pour les empreintes réalisées sur PVC après N-D, une différence de 1,5 log pour les UFC entre les boîtes incubées à 6 jours et celles incubées à 14 jours. Sachant qu'une incubation de 5 jours à 25°C est préconisée pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile (Anonyme, 1992), une sous estimation du nombre d'UFC est réalisée par les professionnels dans le cadre d'une surveillance de la propreté microbiologique des surfaces d'équipements.

Les principaux facteurs induisant la perte de cultivabilité sont les changements de température (Oliver *et al.*, 1995), la privation nutritionnelle (Byrd *et al.*, 1991), les chocs osmotiques (Oliver, 2005) ainsi que le nettoyage-désinfection (Leriche *et al.*, 1995). Sachant que l'atelier de viande est soumis à des opérations d'hygiène quotidiennes assez agressives, il n'est guère étonnant de trouver sur les surfaces une population viable non cultivable. Leriche *et al.* (1995) ont démontré que la population de cellules actives recensées par la méthode DVC de biofilms de *Salmonella* Typhimurium soumis pendant 4 jours à des cycles quotidiens de chocs au chlore puis remise en culture comptait 80% de cellules non cultivables. Alliot (1999) a montré lors d'études réalisées dans des environnements fromagers, qu'il existait sur les surfaces ouvertes une flore non cultivable sur des milieux gélosés de laboratoire beaucoup plus importante que la flore cultivable. Mettler *et al.* (1997) ont constaté de fortes différences, allant de 3,7 à 6,7 log, entre le nombre d'UFC et le nombre de cellules colorées par l'orangé d'acridine présentes sur des joints de pasteurisateur de lait. Par ailleurs, les faibles proportions des cellules viables parmi les totales et

des UFC parmi les viables observées sur acier inoxydable après N-D montrent bien que l'acier inoxydable est plus facile à désinfecter que d'autres matériaux (Krysinski *et al.*, 1992; Van der Veen *et al.*, 2011). Une étude menée par Holah *et al.* (1990) sur des matériaux de fabrication d'éviers domestiques a permis de classer l'acier inoxydable comme le matériau le plus facilement nettoyable après abrasion. De plus, les pentes des droites de décrochement des UFC sur acier inoxydable avant N-D montrent bien que les forces d'adhésion de ces cellules sont les plus faibles. La meilleure propreté microbiologique de l'acier inoxydable après N&D est aussi due à ces faibles forces d'adhésion qui ont déjà été observées dans d'autres études réalisées au laboratoire (Midelet *et al.*, 2002) ou dans des meubles frigorifiques de vente de supermarché (Firmesse *et al.*, résultats non publiés). Si l'on considère le PVC, on remarque que le N-D ne modifie pas significativement les forces d'adhésion des cellules totales, viables et des UFC. Par contre pour l'acier inoxydable, les forces d'adhésion de ces populations sont plus importantes après N-D. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Midelet *et al.* (2006) qui observent sur des biofilms de *Listeria monocytogenes* soumis à des traitements chimiques par des produits d'hygiène que les forces d'adhésion mesurées sur les cellules qui ont résisté au traitement chimique sont supérieures à celles mesurées avant le traitement chimique. Asséré *et al.* (2008) suggèrent la présence d'une sous-population de cellules nommées « persister cells » (Lewis, 2007) qui sont à la fois résistantes aux désinfectants et fortement adhérentes aux surfaces. Les deux empreintes appliquées successivement au même endroit sur PVC et acier inoxydable après N-D montrent que les colonies ne sont localisées au même endroit. Ceci nous conduit à faire l'hypothèse que dans notre étude, les UFC ne sont pas présentes sous forme de micro-colonies.

#### **4. Conclusion**

Le N-D ne semble pas avoir d'effet visible sur les cellules totales quel que soit le matériau considéré. L'efficacité du N-D porte principalement sur les cellules viables et les UFC et plus particulièrement sur l'acier inoxydable. Le pourcentage de cellules viables parmi les totales ainsi que celui des UFC parmi les viables est le plus faible sur acier inoxydable après N-D. De plus, les faibles forces d'adhésion des UFC observées sur acier inoxydable avant N-D ainsi que la forte réduction des UFC par les opérations d'hygiène, expliquent que ces cellules soient mieux détachées et éliminées sur acier inoxydable, un matériau connu pour ses qualités hygiéniques comparé au PVC. La charge bactérienne des cellules totales sur acier inoxydable après N-D suggère que les opérations d'hygiène provoquent la formation d'aérosols qui vont recontaminer les surfaces désinfectées des équipements de l'atelier.

Cette première étude nous a permis d'estimer la charge bactérienne des surfaces inertes de l'atelier de découpe. Nous allons dans une seconde partie étudier la diversité de cet écosystème par une identification / caractérisation de la flore bactérienne cultivable retrouvée sur les surfaces.

## **B. Etude de l'écosystème bactérien cultivable des surfaces**

### **1. Avant-propos**

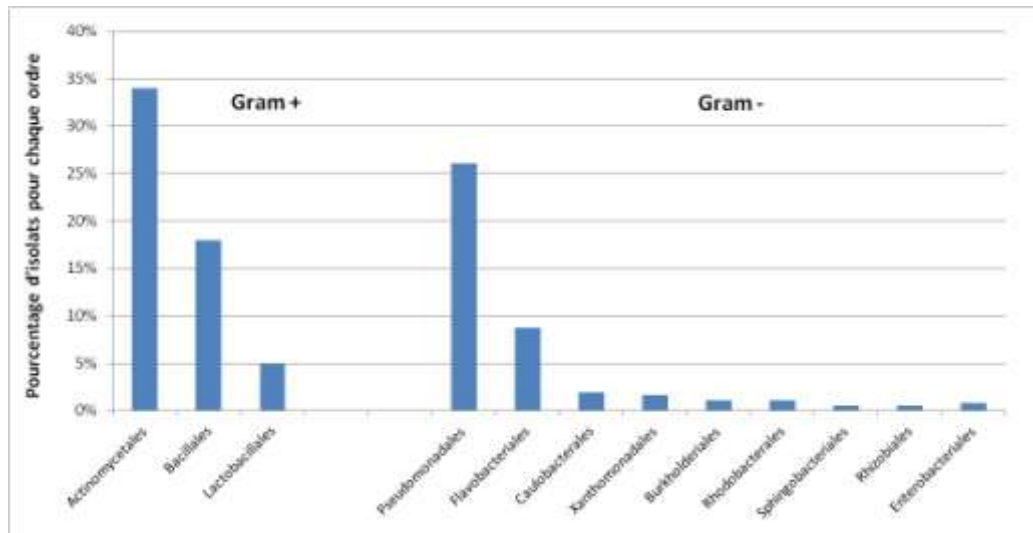
Dans cette partie, nous allons étudier la diversité bactérienne de la fraction cultivable à partir des isolats collectés durant les campagnes de prélèvements 1, 2 et 3. Les isolats de la première campagne proviennent des prélèvements par empreinte et par chiffonnages soit un total de 128 prélèvements alors que ceux des campagnes 2 et 3 proviennent uniquement par chiffonnages lesquels correspondent à 140 prélèvements.

### **2. Résultats**

#### **2.1 Evolution de l'écosystème au cours des trois campagnes**

Trois cent soixante neuf isolats issus des trois campagnes sont répartis comme suit : 108 isolats à la campagne 1, 134 isolats à la campagne 2 et 127 isolats à la campagne 3. Nous avons ainsi isolé 210 (57%) bactéries à coloration de Gram positive, (Gram +, 3 ordres et 28 genres), et 159 (43%) bactéries à coloration de Gram négative (Gram -, 9 ordres et 23 genres). L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les proportions d'isolats Gram + et Gram - obtenus dans les trois campagnes de prélèvement ( $P=0,17$ ). La diversité bactérienne au niveau ordinal est plus importante chez les Gram -. L'ordre dominant est celui des Actinomycétales avec 34% des isolats suivi par les Pseudomonadales avec 26% des isolats (Figure 32).

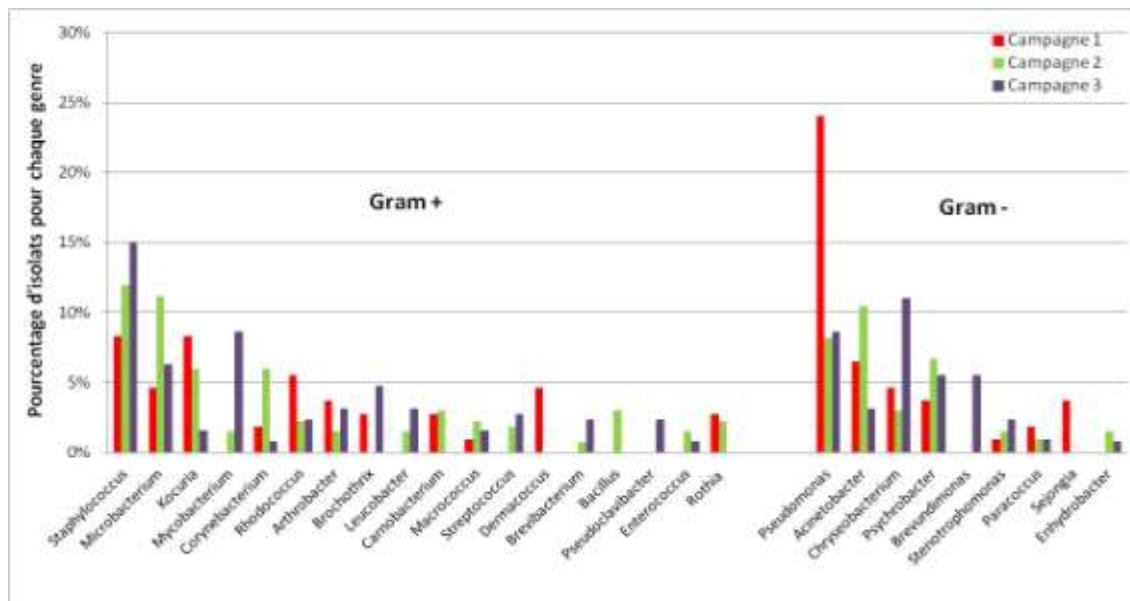




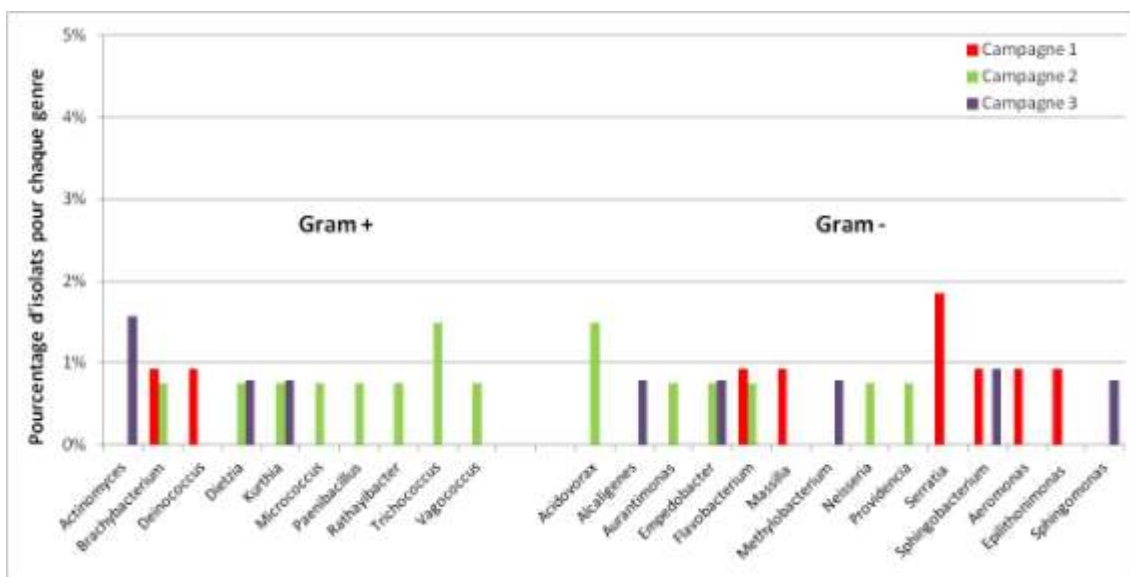
**Figure 32** : Répartition du pourcentage d'isolats Gram + et Gram – en fonction des ordres.

L'identification des isolats des trois campagnes de prélèvement par comparaison des séquences 16S à celles présentes dans la base de donnée RDP10 ne nous a pas permis d'attribuer un nom d'espèce aux différents isolats. Nous avons donc restreint l'identification phylogénétique au genre. Cette identification nous a permis de déterminer 26 genres à la campagne 1, 36 genres à la campagne 2 et 30 genres à la campagne 3. Treize genres bactériens sont présents aux 3 campagnes (Figure 33) et représentent 75, 72 et 62% de l'ensemble des isolats des campagnes 1, 2 et 3 respectivement. Parmi ces genres, les plus fréquents sont : *Pseudomonas* (48 souches), *Staphylococcus* (44 souches), *Microbacterium* (28 souches), *Acinetobacter* (25 souches), *Chryseobacterium* (23 souches), *Psychrobacter* (20 souches), et *Kocuria* (19 souches). La figure 33 montre un écosystème qui change au cours du temps : des genres non isolés à la première campagne sont retrouvés à la deuxième et la troisième (*Mycobacterium*, *Leucobacter*, *Streptococcus*, *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Enhydrobacter*). D'autre part, des genres sont uniquement isolés dans une seule campagne (*Dermacoccus* et *Sejongia* isolés à la campagne 1, *Bacillus* à la campagne 2, *Pseudoclavibacter* et *Brevundimonas* à la campagne 3). Par ailleurs, on constate qu'à la première campagne, les isolats de *Pseudomonas* sont les plus nombreux et représentent 24% de la totalité des isolats alors qu'ils ne dépassent pas les 8 et 9% aux campagnes 2 et 3. La proportion des isolats de *Staphylococcus* est de 8% à la première campagne et elle atteint 12 et 15% aux campagnes 2 et 3 respectivement. En ce qui concerne les 48 autres genres bactériens identifiés, certains peuvent correspondre à un nombre d'isolats important comme par exemple *Mycobacterium* qui représente 9% des isolats en campagne 3 mais seulement 1% en campagne 2 et qui est absent en campagne 1. De même 6% des isolats de la campagne 3 sont des *Brevundimonas* qui sont absents dans les 2 autres campagnes. Vingt quatre genres minoritaires

dont le nombre d'isolats est inférieur à 3, ont été également retrouvés sur les surfaces ouvertes des équipements. Ces genres ont été isolés uniquement dans une ou deux campagnes (Figure 34).



**Figure 33** : Pourcentage d'isolats obtenus aux campagnes 1, 2 et 3 pour les genres dont le nombre d'isolats est supérieur ou égal à 3 (campagne 1 : 108 isolats ; campagne 2 : 134 isolats ; campagne 3 : 127 isolats).

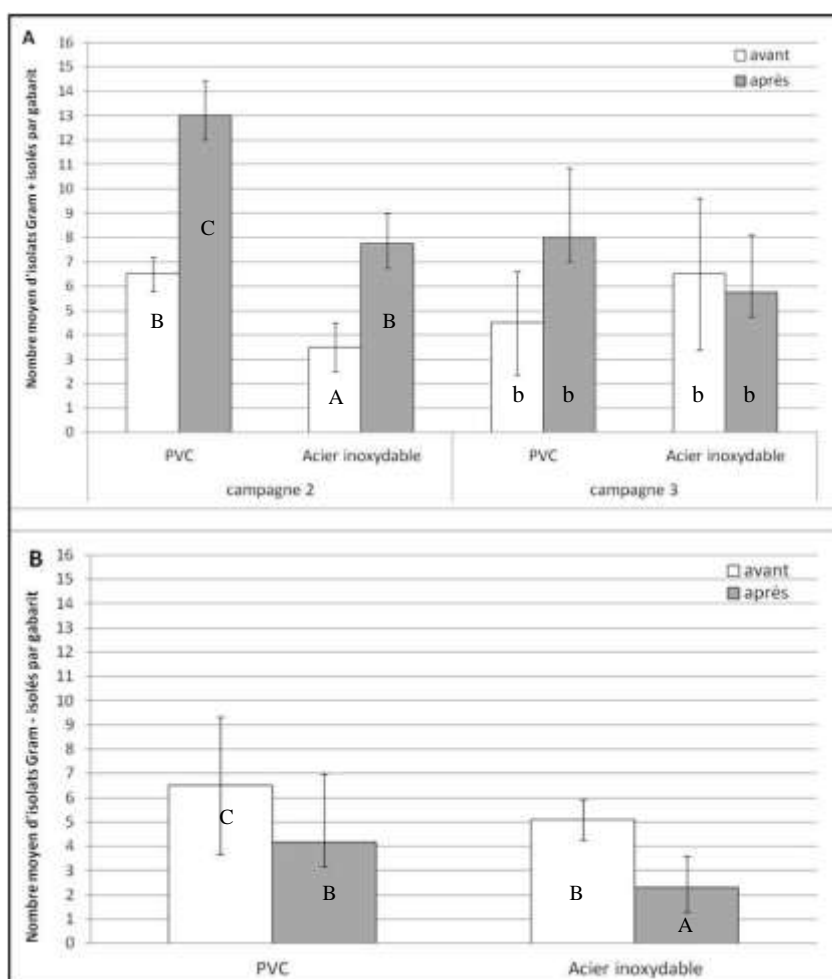


**Figure 34** : Pourcentage d'isolats obtenus à chaque campagne pour les genres dont le nombre d'isolats est inférieur à 3 (campagne 1 : 108 isolats ; campagne 2 : 134 isolats ; campagne 3 : 127 isolats).

## 2.2. Effet du N-D sur le nombre moyen d'isolats / gabarit

L'analyse de la variance montre une différence significative du nombre moyen d'isolats Gram + / gabarit pour la campagne 2 avant et après N-D ( $P=0,02$ , Figure 35A) : Sur PVC, le nombre moyen d'isolats Gram + / gabarit est de 7 avant N-D. Ce chiffre augmente après N-D pour atteindre en moyenne 13 isolats. Sur acier inoxydable, 3 isolats ont été retrouvés en moyenne par gabarit avant N-D, tandis qu'après N-D, ce chiffre augmente pour atteindre en moyenne 8 isolats.

Pour les isolats Gram -, un effet campagne non significatif est observé sur le nombre moyen d'isolats Gram - / gabarit ( $P = 0,9$ ). Les résultats seront présentés sous forme de moyennes des deux campagnes. L'analyse de la variance montre un effet significatif du N-D sur le nombre moyen d'isolats Gram - / gabarit quel que soit le matériau ( $P=0,0001$ , Figure 35B). Contrairement au Gram +, les Gram - sont facilement éliminés par les opérations d'hygiène menées dans l'industrie.



**Figure 35** : Nombre moyen de genres Gram + (A) et Gram - (B) isolés / gabarit (566 cm<sup>2</sup>) sur PVC et acier inoxydable avant et après N-D aux campagnes 2 et 3. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. (A) : n = 2 pour PVC et n = 4 pour l'acier inoxydable. (B) : n = 4 pour PVC et n = 8 pour l'acier inoxydable.

### 2.3. Effet du matériau sur la diversité des genres

Dans cette partie, nous allons considérer les genres majoritaires dont le nombre d'isolats est supérieur ou égal à 3. Pour la campagne 2, 10 des 13 genres isolés ont été retrouvés sur le tapis convoyeur en PVC et sur les machines éplucheuses Townsend® en acier inoxydable. Les 3 autres genres ont été retrouvés uniquement sur acier inoxydable (*Macrococcus*, *Rhodococcus* et *Rothia*). Concernant la campagne 3, 14 des 17 genres isolés ont été retrouvés sur les deux matériaux : les genres *Arthobacter* et *Brochothrix* ont été isolés uniquement sur acier inoxydable. Le genre *Leucobacter* quant à lui a été retrouvé uniquement sur PVC.

### 2.4. Diversité bactérienne de la flore aéroportée cultivable

Quarante et un isolats ont été obtenus à partir des boîtes de gélose blanche ouvertes en cours de production : 76% des isolats sont des bactéries Gram + (3 ordres et 9 genres) et 24% des isolats sont des bactéries Gram – (4 ordres et 5 genres). Pour 4 isolats, l'identification par comparaison des séquences 16S à celles présentes dans la base de donnée RDP10 ne nous a pas permis d'attribuer un nom de genre. Nous avons donc limité l'identification à la famille.

L'ordre dominant est celui des Actinomycétales avec 41% des isolats suivi par les Bacillales avec 32% des isolats (Figure 36). Chez les Gram +, le genre dominant est *Staphylococcus* avec 27% des isolats alors que chez les Gram –, le genre le plus fréquent est *Psychrobacter* avec seulement 7% des isolats. Contrairement aux prélèvements de surfaces, le genre *Pseudomonas* est minoritaire et ne représente que 2% des isolats des prélèvements d'air (Figure 37).

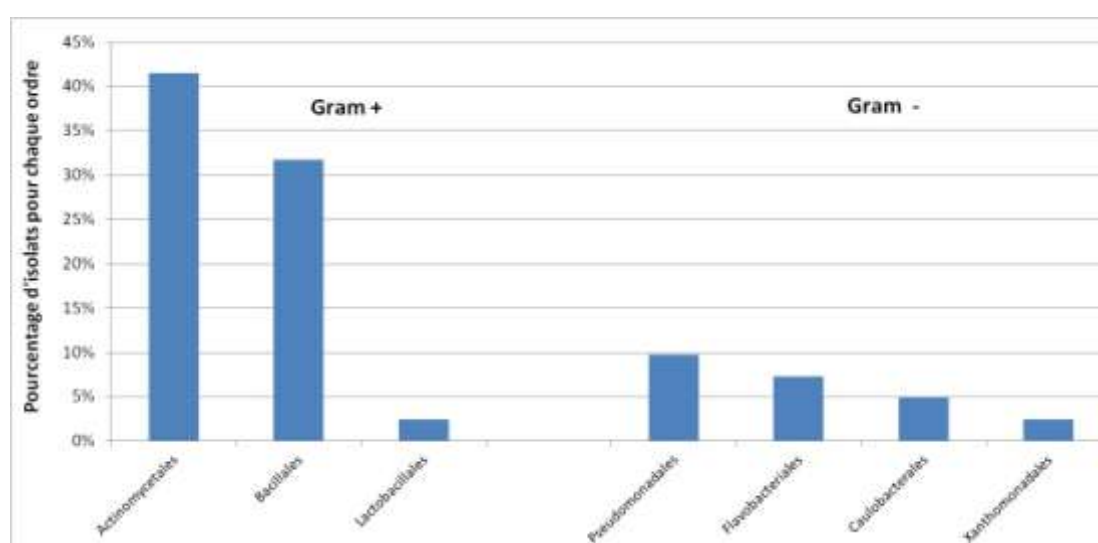
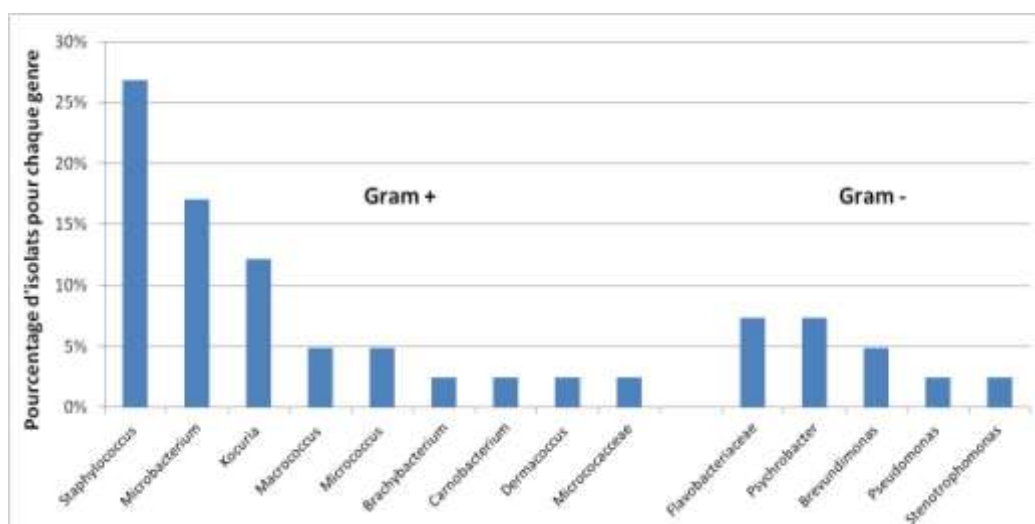


Figure 36 : Répartition du pourcentage d'isolats issus des prélèvements d'air en fonction des ordres.



**Figure 37** : Répartition du pourcentage d'isolats issus des prélèvements d'air en fonction des genres et éventuellement des familles.

## 2.5. Typage des genres *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* par rep-PCR

Les isolats de *Staphylococcus* se répartissent en 8 espèces et 20 types différents (Figure 38). Les espèces *S. capitis* (2 isolats), *S. fleuretti* (1 isolat), *S. arlettae* (1 isolat), *S. aureus* (1 isolat), *S. warneri* (1 isolat) et *S. xylosus* (1 isolat) ont été détectées de façon sporadique dans une seule campagne. Seules les espèces *S. sprophyticus*, *S. equorum*, *S. epidermidis* et *S. vitulinus* ont été retrouvées dans deux campagnes. L'espèce *S. saprophyticus* est représentée par deux types contenant chacun 1 isolat. Cependant, chaque type a été isolé dans une campagne différente. L'espèce *S. equorum* constituée de 18 isolats prédomine largement. Ces isolats sont répartis en 3 types dont un seul (type 6) composé de 12 isolats a été retrouvé aux campagnes 2 et 3 (5 et 7 isolats respectivement) : les isolats de la deuxième campagne ont été obtenus uniquement après N-D (4 isolats sur PVC et 1 isolat sur acier inoxydable) alors que ceux de la troisième campagne ont été obtenus avant N-D (2 isolats sur PVC) et après N-D (3 isolats sur PVC et 2 isolats sur acier inoxydable). Concernant l'espèce *S. epidermidis*, 6 types ont été obtenus pour les 8 isolats : un seul type (type 10) a été isolé aux campagnes 2 et 3 sur acier inoxydable après N-D (un isolat à chaque campagne). Par ailleurs, l'espèce *S. vitulinus* est représentée par 2 types : seul le type 9 a été retrouvé aux campagnes 1 et 3 sur acier inoxydable avant N-D.

Le typage des souches d'*Acinetobacter* met en évidence 25 types différents contenant chacun un isolat (Figure 39). Concernant les souches de *Pseudomonas*, une plus grande diversité génotypique est observée au sein de ce genre avec 36 types différents : chaque type contient un isolat à l'exception des types 21, 22 et 33 contenant chacun 2 isolats et du type 26 contenant 3

isolats (Figure 40). Cependant, les isolats de ces 4 types ont été retrouvés dans une même campagne (types 21, 22 et 26 isolés à la campagne 1, type 33 isolé à la campagne 2).

### 3. Discussion

Les prélèvements de surfaces menés dans l'atelier de découpe ont permis d'isoler 57% bactéries Gram +, et 43% de bactéries Gram -. Ces derniers comportent des micro-organismes d'altération dits « putréfiants » qui dégradent les acides aminés et les protéines, entraînant des altérations des qualités organoleptiques, (couleur, odeur, saveur) qui rendent inconsommables les viandes ainsi contaminées. Parmi ces bactéries, on cite les genres *Pseudomonas* et *Psychrobacter*. Les caractères physiologiques de *Pseudomonas* en font un genre ubiquitaire et il n'est guère surprenant qu'il fasse partie de la flore dominante des surfaces puisqu'il est très fréquent sur la viande fraîche réfrigérée. En effet, cette bactérie psychrotrophe possède un avantage écologique à basses températures où elle se développe plus rapidement que d'autres flores. De plus, elle possède un spectre d'assimilation des substrats carbonés particulièrement large (sucres, acides gras, acides aminés) et n'a pas besoin de facteurs de croissance, ce qui lui confère un avantage compétitif vis-vis d'autres genres au spectre nutritionnel plus réduit (Garcia-Lopez *et al.*, 1998). D'autre part, l'eau apparaît comme l'un des vecteurs potentiels des *Pseudomonas* qui font partie de la flore autochtone des eaux de source. Dans l'étude de Mosso *et al.* (1994), le genre *Pseudomonas* est détecté dans plus de 90% des prélèvements d'eaux de source. Une bonne maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau s'avère nécessaire pour limiter l'entrée de cette flore d'altération. D'ailleurs, les normes sur les eaux potables n'imposent pas aux compagnies, s'occupant de la distribution des eaux, la recherche spécifique des *Pseudomonas* ni leur dénombrement. Seuls les germes entérobactéries coliformes, *E. coli* et les streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés. Dans notre étude, la réduction du nombre de souches *Pseudomonas* isolées entre la campagne 1 et les campagnes 2 et 3 pourrait être due à une amélioration de la qualité microbiologique des carcasses livrées durant cette période. En effet, 70% des carcasses livrées en 2009 étaient de qualité microbiologique «satisfaisante» tandis qu'en 2010, ce pourcentage s'élevait à 90%.

*Psychrobacter* est une bactérie aérobie stricte retrouvée dans une large gamme d'habitats. Un grand nombre d'espèces étudiées sont isolées d'environnements froids, salins et d'environnements marins (Bowman, 2006). Certaines espèces qui font partie de la flore microbienne de poissons, fromages et viandes peuvent altérer ces aliments. Certaines souches présentent un intérêt biotechnologique comme la production de protéines et enzymes actives à des températures froides. Ainsi, Kulakova *et al.* (2004) montrent que le remplacement d'un acide aminé (Glycine)

situé près du site actif d'une estérase de *Psychrobacter* par un autre résidu (Proline) permettait d'en augmenter la thermostabilité. Cette modification s'accompagnait aussi d'une diminution de la vitesse de réaction des enzymes à basse température. La souplesse structurelle qui caractérise les enzymes des bactéries adaptées au froid leur permet de réaliser les changements de conformation nécessaires à la catalyse en requérant une quantité d'énergie moins importante. La conséquence est une thermolabilité beaucoup plus prononcée que chez les bactéries mésophiles.

Une autre bactérie Gram – isolée des surfaces de l'atelier de viande est le genre *Acinetobacter*. Ce genre est présent en grand nombre dans la flore des aliments frais ou altérés (carcasse de la volaille, viande des animaux de boucherie, produits laitiers) stockés dans des conditions d'aérobiose. Ces micro-organismes sont capables d'utiliser une gamme de composés divers comme source de carbone leur conférant ainsi une capacité d'adaptation élevée qui explique qu'ils soient retrouvés dans les environnements carnés tout comme le genre *Pseudomonas*. Leur rôle en tant qu'agents d'altération est discuté car ces bactéries ne sont pas ou peu protéolytiques (Euzéby, 1997). Une étude menée par Saha *et al.* (2001) dans 12 ateliers de transformation de viande a montré que sur 98 souches isolées de viandes commercialisées, *Acinetobacter* était le deuxième genre dominant (28% des isolats) isolé de la viande réfrigérée après *Pseudomonas* (48% des isolats). Certaines souches d'*Acinetobacter* suscitent un intérêt croissant en vue d'application biotechnologiques telle que la dégradation de nombreux composés polluants notamment des composés aromatiques, des hydrocarbures et des métaux lourds.

Nos résultats montrent un effet significatif du N-D sur le nombre moyen de genres Gram – isolés par unité de surface contrairement au nombre moyen de genres Gram + qui n'est pas réduit par les opérations d'hygiène. Il est connu que les bactéries Gram + présentent une forte tolérance aux conditions environnementales (températures de réfrigération, faible humidité relative, et pH). Peut-on dans notre cas, considérer que les isolats Gram + soient résistants aux produits de N-D utilisés dans l'industrie ? Bridier *et al.* (2011) ont testé l'action de l'acide péricétique, du chlorure de benzalkonium et de l'ortho-phthalaldehyde sur 77 souches bactériennes. Il en ressort que les souches Gram + sont plus résistantes que les souches Gram – à des concentrations bactéricides des produits. En revanche, une étude menée par Lelieveld *et al.* (2003) a montré que les bactéries Gram – étaient plus résistantes que les bactéries Gram + à 10°C pour des concentrations de désinfectant inférieures à 50 ppm. Dans notre cas, la flore Gram + est composée majoritairement de *Staphylococcus* dont la proportion augmente au cours des trois campagnes de prélèvement. Une étude menée par Bagge-Ravn *et al.* (2003) dans une industrie de fabrication de caviar a montré que le pourcentage de *Staphylococcus* isolés n'était pas réduit après N&D. Marouani-Gadri *et al.* (2009) montrent aussi la forte prévalence du genre *Staphylococcus* après les opérations de N-D dans un atelier de transformation de viande bovine. Des souches de

*Staphylococcus* résistantes au chlorure de benzalkonium ont aussi été décrites dans des environnements d'industries agro-alimentaires (Heir *et al.*, 1999). Cette bactérie est isolée de sources environnementales très variées : terre, sable, eau, air, poussière. Il semblerait que les animaux, y compris les humains, soient responsables de la dissémination de ces bactéries via les squames de peaux qu'ils perdent continuellement. Cette flore peut provenir des matières premières contaminées lors de l'abattage et/ou des manipulations successives. Ainsi, beaucoup de *Staphylococcus* se retrouvent dans les produits alimentaires particulièrement ceux d'origine animale comme les produits carnés. Selon Leroy *et al.* (2010), la flore staphylococcale des surfaces d'une industrie de fabrication de saucisses serait principalement composée de staphylocoques à coagulase négative (SCN) qui proviendraient de la flore indigène du produit et qui peuvent participer au processus de fermentation en développant les qualités organoleptiques. L'identification à l'espèce des isolats *Staphylococcus* suggère que l'espèce *S. equorum* prédomine (43% des isolats *Staphylococcus* identifiés) (Figure 38). Cette même proportion a été retrouvée dans des saucissons français naturellement fermentés (Corbière Morot-Bizot *et al.* (2006). Dans des saucissons italiens, la proportion de *S. equorum* varie de 10 à 40% (Mauriello *et al.*, 2004). Des souches de *S. equorum* ont également été isolées de saumures utilisées dans la fabrication des jambons crus. La dominance de *S. equorum* a été aussi observée dans des ateliers d'affinage d'une production fromagère avec 66% d'isolats (Alliot, 1999) ainsi que dans des laits et fromages de chèvre avec 58% des isolats appartenant à cette espèce (Meugnier *et al.*, 1996). Les espèces *S. xylosus*, *S. saprophyticus* et *S. capitis* ont aussi été identifiées parmi nos isolats. Une étude menée sur des échantillons de viande de boeuf récupérés en sortie d'abattoir a permis d'identifier une flore composée des espèces *S. xylosus*, *S. lentus* et *S. sciuri* contaminant la viande lors de l'abattage, et une autre composée des espèces *S. capitis*, *S. auricularis*, et *S. warneri* probablement véhiculées par le personnel (Shale *et al.*, 2005). D'autre part, l'analyse de la flore staphylococcale de saucisses fraîches non ensemencées conservées à 4°C a montré que la population était initialement composée des espèces *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. warneri* et *S. saprophyticus* (Rantsiou *et al.*, 2005). Des souches de *S. equorum* et *S. saprophyticus* ont ainsi été isolées dans des saucissons italiens dits « Salame di Senise ». Malgré leur faible activité protéolytique et lipolytique, ces deux espèces possèdent une activité nitrate réductase contribuant au développement et à la stabilité de la couleur rouge caractéristique des salaisons (Baruzzi *et al.*, 2006). Cependant, depuis la découverte de l'implication de *S. saprophyticus* dans des infections humaines, l'identification plus précise des membres du groupe des SCN présente un intérêt majeur.

Parmi les bactéries dominantes retrouvées sur les surfaces de l'atelier de découpe on cite également les genres *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* et *Kocuria*.



Les niches écologiques de ces flores sont très variées : ensilages, sols, eau, peau et tubes digestifs des animaux. *Corynebacterium* et *Arthrobacter* constituent la flore dominante du cuir de l'animal vivant et il n'est pas étonnant que ces micro-organismes soient transférés aux carcasses au moment de la dépouille. Des bactéries appartenant au genre *Kocuria* ont été identifiées dans l'environnement d'ateliers de fabrication de saucissons fermiers ainsi que dans les boyaux. Cette bactérie, en présence d'autres souches de SCN, favoriserait la fermentation de saucissons par son activité protéolytique et lipolytique (Tremonte *et al.*, 2007). Les échanges air/surfaces favorisés par les pratiques engendrant des aérosols participent aussi à la dissémination des bactéries sur les surfaces des équipements. Parmi les souches isolées des prélèvements d'air, le genre *Staphylococcus* apparaît dominant alors que les *Pseudomonas* sont minoritaires (2% des isolats). Il est connu que les bactéries Gram + possèdent une meilleure résistance à la dessiccation que les bactéries Gram -. Une étude sur la survie à la dessiccation sur lames de verre de différentes bactéries a montré que les bactéries Gram + ne perdaient que 2 log après 25 jours à 50% d'humidité relative (HR) à 21°C alors que chez des bactéries Gram négatif, aucune cellule viable n'était détectée après 7 heures (Hirai, 1991).

Au cours des trois campagnes, des genres minoritaires ont aussi été isolés sur les surfaces de l'atelier de découpe. Leur faible occurrence est due à une faible présence dans la viande réfrigérée ou bien à des spécificités physiologiques les rendant inaptes à survivre sur les surfaces (T°C, pH, HR ...). *Actinomyces* est une bactérie anaérobie facultative qui fait partie de la flore normale des muqueuses de l'oropharynx de l'être humain et des animaux. L'espèce *bovis* peut être responsable chez les bovins de l'actinomycose, une maladie caractérisée par des trajets purulents dans le tissu granuleux de la cavité orale ou de la peau (Meyer C., 2012). Les genres *Trichococcus* et *Vagococcus* sont des bactéries lactiques typiques d'aliments fermentés. Les genres *Brevundimonas*, *Methylobacterium* *Sphingomonas* et *Acidovorax* (anciennement identifié comme *Pseudomonas*) (Willems *et al.*, 1990), sont le plus souvent isolés du sol, de la boue, et d'une variété de sources hydriques. Certaines espèces d'*Acidovorax* sont des bactéries phytopathogènes. Les résultats du typage des isolats de *Staphylococcus* montrent que l'espèce *equorum*, isolée aux campagnes 2 et 3 principalement après N-D sur les deux équipements, pourrait être considérée comme « persistante » dans l'atelier de découpe. La capacité de *S. equorum* à persister peut s'expliquer par la forte prévalence de cette espèce et par sa psychrotrophie. Puisque cette espèce est introduite dans l'atelier en grand nombre, la probabilité qu'elle atteigne une zone de rétention où elle sera protégée du nettoyage est forte. Ensuite, compte tenu de sa capacité à croître à basses températures, elle pourra s'adapter aux conditions de l'atelier et croître tout en devenant rapidement de plus en plus résistante au N-D comme l'ont montré expérimentalement Pan *et al.* (2006) pour *L. monocytogenes* à 22,5°C, Peneau *et al.* (2007) pour *Pseudomonas* à 10°C, et

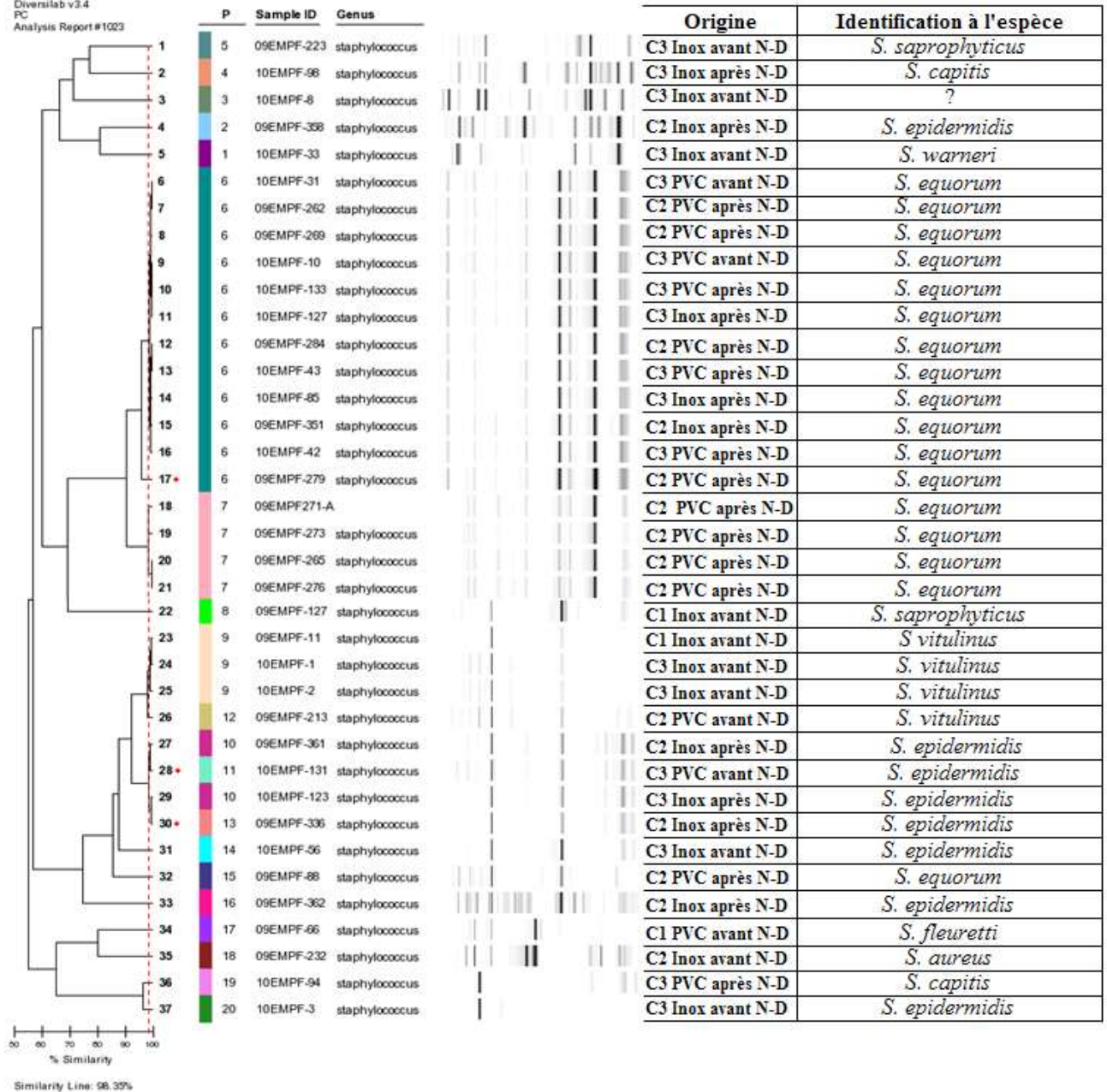
Marouani *et al.* (2010) pour *E. coli* à 20°C. Une étude menée par Leroy *et al.* (2009) dans un atelier de fabrication de saucissons secs fermentés a montré la persistance de 6 souches de *S. equorum* isolées après N-D sur une période de 6 mois. Parmi ces isolats, 4 souches ont été retrouvées dans l'environnement industriel et dans les produits finaux. Ces mêmes auteurs précisent que la persistance de ces souches n'est pas forcément corrélée à la formation de biofilms sur les surfaces. La même observation a été faite sur des souches de *L. monocytogenes* par Nilsson *et al.* (2011). De même, une étude menée par Harvey *et al.* (2007) a montré que la production de biofilms était similaire pour des souches de *L. monocytogenes* transitoires et persistantes. Selon Carpentier *et al.* (2011), il n'y aurait pas de souches de *L. monocytogenes* possédant des propriétés particulières qui conduisent à une persistance, mais des conditions de croissance se trouvant particulièrement dans les zones de rétention des équipements et locaux.

Des isolats de *S. epidermidis* et *S. vitulinus* appartenant au même type ont été retrouvés respectivement aux campagnes 2 et 3 et aux campagnes 1 et 3. Peut-on considérer qu'elles sont persistantes sachant qu'un faible nombre d'isolats a été retrouvé uniquement sur un seul matériau (2 isolats pour *S. epidermidis* et 3 isolats pour *S. vitulinus* tous retrouvés sur l'acier inoxydable) ? L'importance du personnel travaillant dans l'atelier comme vecteur de flores de *S. epidermidis* constitue une hypothèse forte. Cependant, l'innocuité sanitaire des SCN est parfois remise en cause. En effet, certaines souches de *S. epidermidis* peuvent synthétiser des amines biogènes grâce à leur activité amino-décarboxylase. Ces amines peuvent en conséquence entraîner des troubles de santé (allergies, migraines) (Coton *et al.*, 2010). Concernant les souches de *S. vitulinus*, Švec *et al.* (2004) publient les résultats d'une étude qui démontre que *S. vitulinus* et *S. pulvereri* constituent en fait une unique espèce. La nomenclature de *S. vitulinus* a priorité sur celle de *S. pulvereri* et les souches autrefois dénommées *S. pulvereri* doivent être appelées *S. vitulinus* (Euzéby, 1997). Cette bactérie a été isolée de l'homme (infections urinaires, infection de la hanche), de divers mammifères (cheval, campagnol) et de denrées alimentaires d'origine animale (viande hachée d'agneau ; viande de volailles de bœufs et de veau ; saucissons). Le pouvoir pathogène de cette espèce est peu documenté.

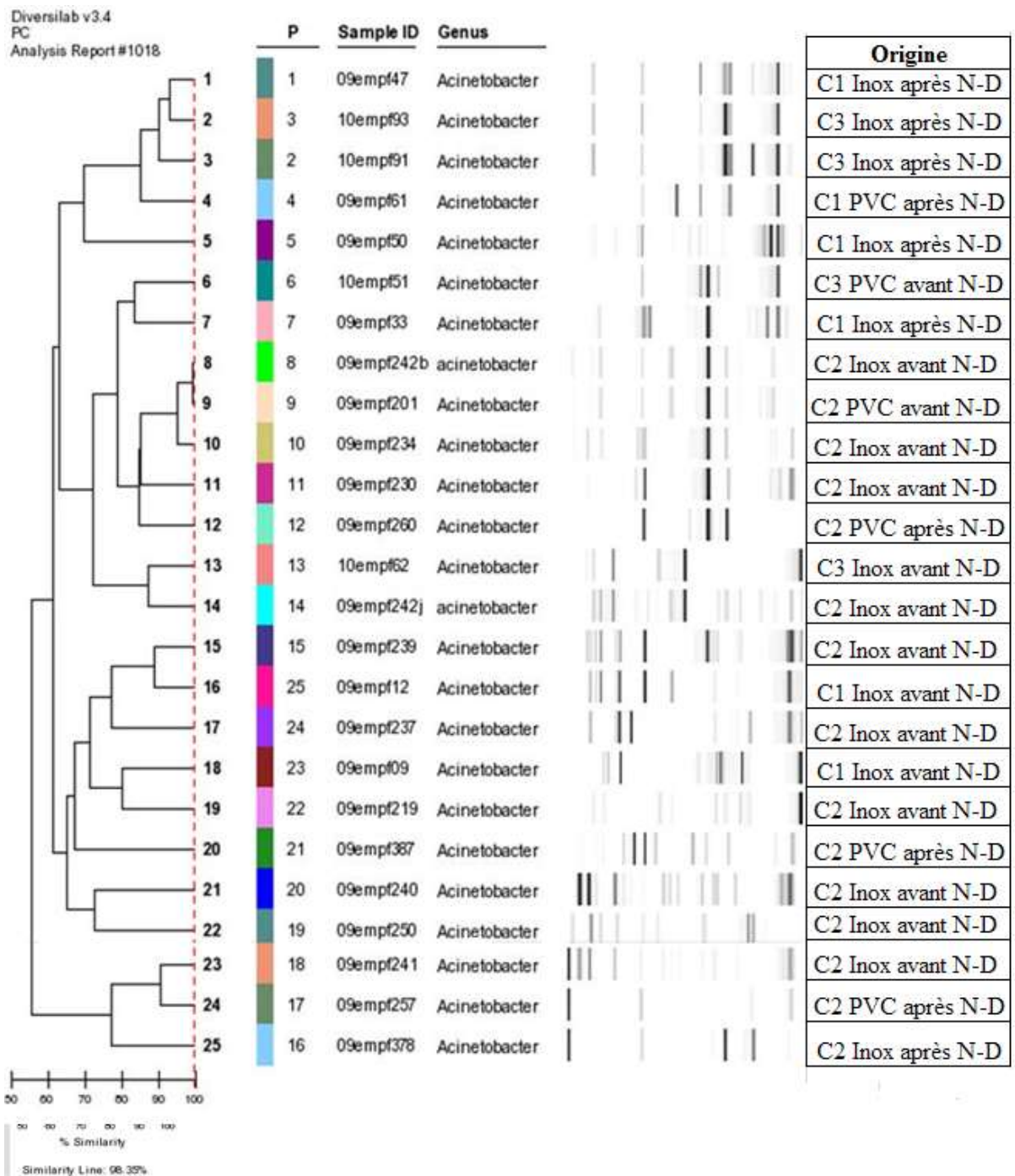
La caractérisation par typage des souches de *Pseudomonas* et d'*Acinetobacter* permet de mettre en évidence une diversité génotypique au sein de ces genres dominants sur les surfaces de l'atelier de découpe. Cependant, aucun isolat n'a été retrouvé dans au moins deux campagnes. Aucune des souches isolées ne persiste donc dans l'atelier de découpe. Ces bactéries seraient introduites dans l'atelier à travers la matière première en contact avec les surfaces et seraient éliminées de façon permanente par les opérations de N-D quotidiennes.

## 4. Conclusion

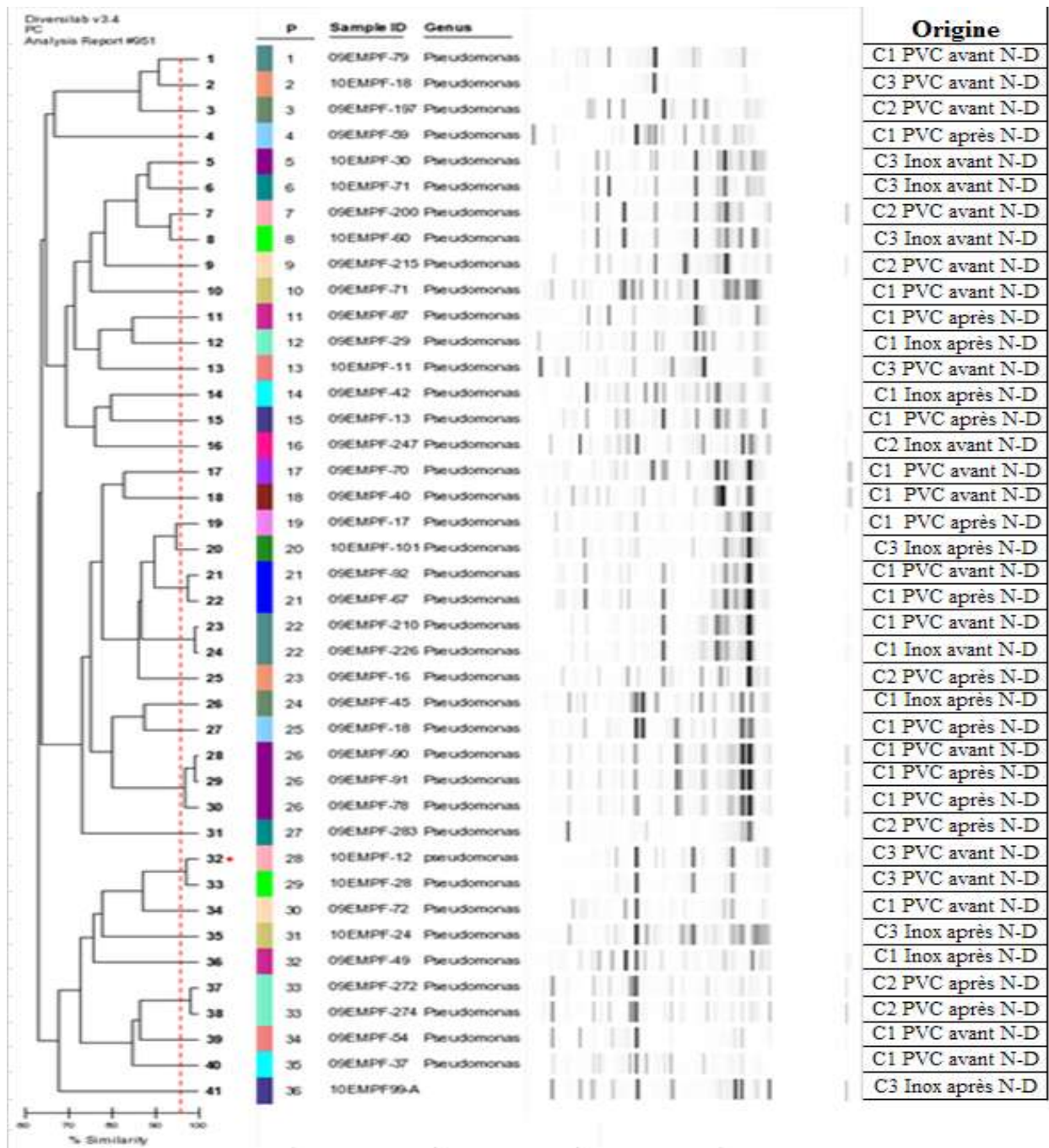
L'étude de l'écologie microbienne de la fraction cultivable nous a permis d'identifier 51 genres différents, parmi lesquels 13 retrouvés aux 3 campagnes. Des genres non isolés dans une campagne sont retrouvés aux deux autres. D'autres genres sont uniquement isolés dans une seule campagne. Des genres minoritaires (nombre d'isolats inférieur à 3) ont été retrouvés dans une ou deux campagnes. Ces résultats suggèrent une variation de l'écosystème d'une campagne à une autre. Ces modifications de la diversité bactérienne reflèteraient les modifications de flores des viandes traitées dans l'atelier lesquelles ont des origines multiples. Par ailleurs, il apparaît que, contrairement à ce qui est généralement admis, les bactéries Gram – sont plus facilement inactivées que les bactéries Gram +. Parmi les bactéries Gram – isolées, *Pseudomonas* est le genre dominant. Cette bactérie ubiquitaire et psychrotrophe est fréquemment retrouvée sur la viande fraîche réfrigérée et peut engendrer des altérations au niveau de la qualité organoleptique du produit. Par ailleurs, *Staphylococcus* est le genre dominant parmi les bactéries Gram +. Les espèces identifiées font partie du groupe des SCN qui constituent la flore indigène des produits carnés. En revanche, Le typage moléculaire des genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Staphylococcus* suggère que seule l'espèce *S. equorum* est persistante sur les surfaces de l'atelier. Toutes ces observations nous permettent de conclure que les bactéries seraient introduites dans l'atelier à travers la matière première et seraient éliminées de façon permanente par les opérations de N-D quotidiennes.



**Figure 38** : Dendrogramme de similarité des empreintes génétiques de souches de *Staphylococcus* isolées sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D aux campagnes de prélèvement 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3). P = pattern (type). La souche 10EMPF8 n'a pas été identifiée car elle n'a pas poussée sur milieu de culture.



**Figure 39 :** Dendrogramme de similarité des empreintes génétiques de souches d'*Acinetobacter* isolées sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D aux campagnes de prélèvement 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3). P = pattern (type). La souche 09EMPF242 présente deux types de morphologie après isolement sur milieu TSA. Ces deux morphologies ont donné deux empreintes génétiques complètement différentes. L'une des deux morphologies (09EMPF 242b) est similaire à la souche 09EMPF201, elles ont seulement une bande d'écart. L'autre morphologie (09EMPF 242j) a une empreinte génétique différente des autres souches testées.



**Figure 40** : Dendrogramme de similarité des empreintes génétiques de souches de *Pseudomonas* isolées sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D aux campagnes de prélèvement 1, 2 et 3 (C1, C2 et C3). P = pattern (type).

## C. Etude de l'écosystème des surfaces sans culture préalable

### 1. Avant-propos

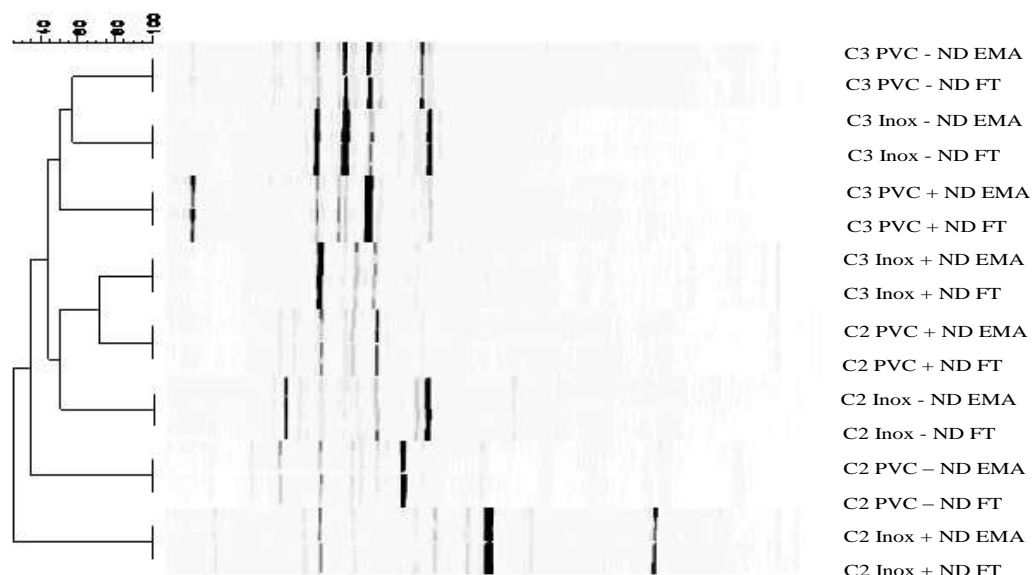
Dans cette partie, nous allons aborder la diversité de l'écosystème bactérien par une méthode moléculaire, la PCR-DGGE en faisant migrer L'ADN (traités et non traités à l'EMA) des prélèvements de surfaces provenant des campagnes 2 et 3.

### 2. Résultats

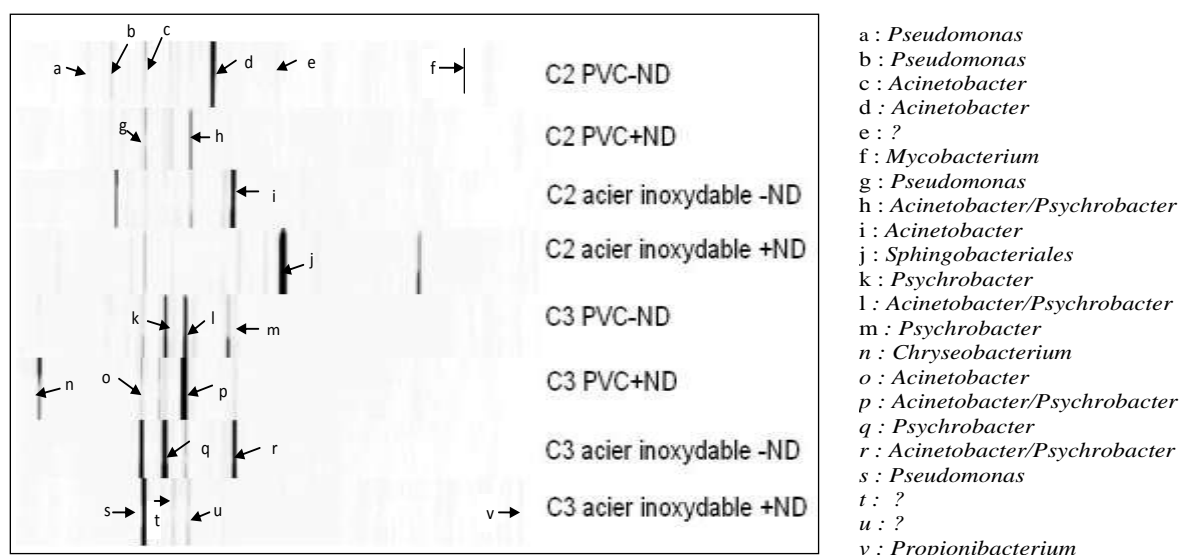
Les profils électrophorétiques des échantillons de surfaces des campagnes 2 et 3 traités ou non à l'EMA, sur PVC et acier inoxydable sont présentés dans la figure 41. On constate que les profils « cellules totales » et « cellules viables » sont identiques. Les espèces dominantes sont toutes sous forme de cellules vivantes, autrement dit aucune espèce n'a été détectée uniquement sous forme de cellules mortes. Dans la suite de l'étude et par mesure de simplification, nous allons considérer uniquement les prélèvements non traités à l'EMA qui représentent les cellules totales des surfaces. Vingt deux bandes d'intérêt représentées sur la figure 42 ont été excisées puis séquencées mais seules 19 bandes ont pu être identifiées. En effet, nous avons rencontré des problèmes de co-migrations pour 3 bandes (e, t et u) dont les séquences n'étaient pas interprétables. De plus, les bandes c, g, o et s sont assignées à des espèces co-migrantes (*Acinetobacter* et *Pseudomonas*). D'ailleurs, le calcul des températures de demi-dénaturation ( $T_m$ ) de leurs séquences révèle des températures identiques pour les deux espèces ( $T_m$  de 80°C). Finalement, le résultat d'identification de quelques bandes après comparaison de la séquence à la base de données RDP10 donnait deux genres. Tel était le cas pour les genres *Acinetobacter* et *Psychrobacter* (bandes h, l, p et r) : les pourcentages de similitudes étant très proches, nous avons préféré retenir ces deux identifications. Dans la suite de l'étude, les bandes h, l, p et r seront désignées par «*Acinetobacter / Psychrobacter*».

D'après la figure 42, on voit que les genres *Acinetobacter* et *Psychrobacter* sont dominants parmi les genres identifiés par DGGE (8 bandes sur 19). Ces deux genres sont retrouvés aux deux campagnes. La même observation est faite pour le genre *Pseudomonas* représenté par 4 bandes sur le profil DGGE. Le genre *Psychrobacter* quant à lui a été identifié uniquement à la campagne 3 (bandes k et q). Un genre appartenant à l'ordre des Sphingobactériaux a été observé à la campagne 2 (bande j). Le genre *Chryseobacterium* a été isolé une fois à la campagne 3 (bande n). Tous ces genres ont été identifiés par culture et font parti des genres dominants isolés des surfaces. Par ailleurs, il est étonnant de voir que seul un genre Gram + est détecté par DGGE :

*Mycobacterium* isolé une fois à la campagne 2 (bande f). Par ailleurs aucune bande parmi celles séquencées n'a été assignée à *Staphylococcus* (ou éventuellement *Microbacterium*) alors que ces genres ont été isolés en grand nombre sur milieu TSA. Finalement, une bande assignée à *Propionibacterium* (bande v) est identifiée à la campagne 3 uniquement par DGGE. Ce genre n'a pas été isolé parmi la flore cultivable des surfaces.



**Figure 41** : Dendrogramme des profils électrophorétiques DGGE de prélèvements de surface de la flore viable (EMA) et de la flore totale (FT) réalisés sur PVC et acier inoxydable (Inox) avant (-) et après (+) N-D au cours des campagnes de prélèvement 2 et 3 (C2 et C3).



**Figure 42** : Profils électrophorétiques d'un gel DGGE de prélèvements de surface réalisés sur PVC et acier inoxydable (inox) avant (-) et après (+) N-D au cours des deux campagnes de prélèvement (C2 : campagne 2 ; C3 : campagne 3). Les lettres a à v correspondent aux bandes d'intérêts qui ont été séquencées. Les bandes e, t et u n'ont pas pu être séquencées.



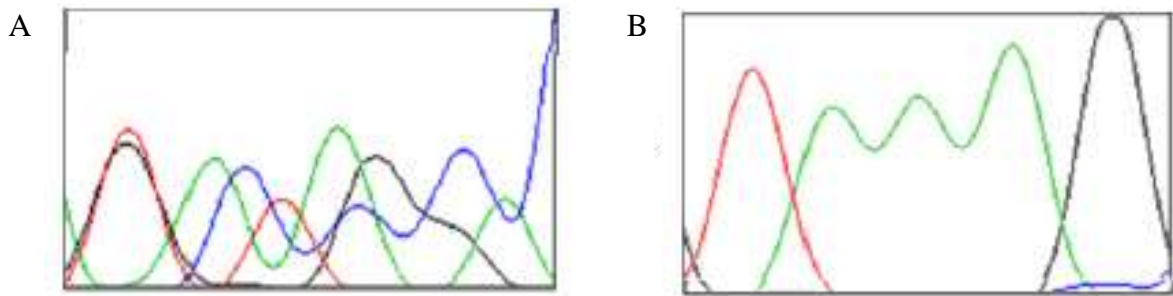
### 3. Discussion

La DGGE a permis d'obtenir une image globale des genres majoritaires de la communauté bactérienne des surfaces de l'atelier de viande bovine, avant et après N-D. Les principaux genres retrouvés sont *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* et *Chryseobacterium* qui font partie de la flore dominante cultivable. Une étude menée par Pennacchia *et al.* (2011) portant sur les bactéries d'altération de la viande bovine conservée à l'air libre et sous atmosphère modifiée montre que les genres *Psychrobacter*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* étaient majoritaires au cours des premiers jours de conservation mais qu'à ce stade là, ils ne semblaient pas constituer un agent majeur d'altération. Dans notre étude, il est étonnant de voir que des genres Gram + dominants dans l'écosystème cultivable des surfaces (exemple : *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Kocuria*) n'ont pas été identifiés sur les profils DGGE. Ces genres pourraient ne pas être détectés sur DGGE à cause de la sensibilité de la méthode qui ne permet pas d'accéder à la totalité des espèces présentes. En effet, Muyzer *et al.* (1993) montrent que la DGGE peut détecter une espèce dont la proportion d'ADN extrait est supérieure à 1% de l'ADN de la population totale. Les genres Gram + dominants dans l'écosystème cultivable sont masqués par les bactéries Gram – qui sont plus nombreux mais majoritairement sous forme VNC. Une étude menée par Brightwell *et al.* (2006) utilisant la méthode RFLP sur un tapis convoyeur dans atelier de transformation d'agneau montre que les genres *Serratia*, *Alcaligenes* et *Microbacterium* étaient uniquement identifiés sur des milieux de culture. Seul le genre *Pseudomonas* était détecté par RFLP et sur milieu gélosé.

Une des limites de la DGGE est le phénomène de co-migration, mis en évidence par Murray *et al.* (1996) par comparaison du profil DGGE d'un assemblage artificiel constitué de 18 espèces avec les profils de migration de chacune des espèces. Cette co-migration peut être due à une analogie de séquences ou de température de demi-dénaturation ( $T_m$ ) entre deux espèces, ce qui est le cas pour *Acinetobacter* et *Pseudomonas* dans notre étude ( $T_m$  de 80°C pour ces 2 genres). Une autre limite de la DGGE est la présence de plusieurs bandes pour une même espèce dues à une hétérogénéité de l'ADNr ce qui peut conduire, à une surestimation du nombre d'espèces présentes dans l'écosystème comme c'est le cas pour les bactéries corynéformes en TTGE (Ogier *et al.*, 2002). L'identification des bandes V3 par comparaison avec un référentiel bactérien préalablement établi reste donc une approche délicate. En effet, les travaux de Moore *et al.* (1996) montrent que des souches de *P. fluorescens* classées au sein de la même « lignée » en raison de la forte homologie de leurs séquences d'ADNr 16S, peuvent présenter des différences au niveau de certaines régions dites hypervariables et notamment de la région V3, ce qui se traduit sur le gel par une divergence au niveau des empreintes électrophorétiques obtenues. Bossis *et al.* (2000) montrent que cette divergence décrite au sein de l'espèce *P. fluorescens* peut être associée à la

variété des niches écologiques des souches (eau, lait, viande, sol, plantes...). Pour cela, la seule méthode fiable d'identification des bandes reste le séquençage. Néanmoins, le séquençage présente des limites. Selon Ercolini *et al.*, (2006) les régions V6-V8 de l'ADNr 16S chez certaines souches de *Pseudomonas* ne sont pas suffisamment variables pour pousser l'identification jusqu'à l'espèce. Selon Walter *et al.* (2000), la région V2-V3 s'avère être plus discriminante avec une identification de l'espèce satisfaisante. Dans notre étude, 4 bandes ont été assignées aux genres *Psychrobacter*/*Acinetobacter*. Les pourcentages d'homologies des séquences de ces deux genres après comparaison à la base de données RDP 10 étaient très proches. La limite des gels à gradient dénaturant contraint l'utilisation de courts fragments PCR afin d'assurer une résolution correcte des profils de migration, ce qui entraîne une perte d'information par rapport à la totalité de la séquence de l'ADNr 16S. Pour le couple d'amorces HDA1-HDA2 utilisé, seules 150 pb sont amplifiées sur 1500. L'identification bactérienne qui en résulte est donc tronquée ce qui explique qu'on ait des bandes de gels difficilement identifiables au niveau de l'espèce et parfois même au niveau du genre, comme c'est le cas dans notre étude. Par ailleurs, il arrive que certaines bandes ne puissent être séquencées (3 bandes dans notre cas). En effet, l'analyse des séquences de ces bandes révèle des chromatogrammes avec des signaux multiples prouvant la présence de plusieurs séquences par bande (Figure 43). Afin de pallier aux co-migrations, une étape de clonage des fragments d'ADN extraits des différentes bandes du gel est nécessaire. Ce travail s'avère cependant long et fastidieux lorsqu'un grand nombre d'échantillons est concerné.

La DGGE, grâce à l'analyse directe de l'ADN, permet de pallier les limites liées aux méthodes culture-dépendantes. Une approche plus exhaustive est ainsi réalisée quant à l'étude de la diversité des genres dominants au sein d'une communauté complexe. Ainsi, le genre *Propionibacterium* non isolé parmi les bactéries cultivables, a été détecté à la campagne 3 sur acier inoxydable avant N-D. *Propionibacterium* est une bactérie anaérobie Gram positif non mobile et non sporulente à contenu élevé en GC. *P. freudenreichii* est couramment trouvé dans le lait et les produits laitiers mais a été également isolé du sol et d'ensilages. Le potentiel probiotique de cette espèce fait l'objet d'un intérêt grandissant (Falentin *et al.*, 2010). Brightwell *et al.* (2006) montrent sur un tapis convoyeur en Intralox<sup>®</sup> que les Sphingomonadaceae étaient dominants lorsqu'une méthode sans culture préalable était appliquée alors que les identifications par culture montraient une dominance des Pseudomonadaceae.



**Figure 43 :** Illustration des problèmes de séquençage des bandes V3 rencontrés dans la DGGE. A : chromatogramme à signaux multiples caractérisant une séquence non interprétable, B : chromatogramme à signal unique caractérisant une séquence interprétable. La présence d'un seul pic (B) illustre l'incorporation d'un seul nucléotide.

## 4. Conclusion

La DGGE nous a permis de détecter seulement 7 genres bactériens sur les 51 genres obtenus en UFC. Ces genres dominants ont tous été retrouvés sous forme cultivable à l'exception d'un seul genre *Propionibacterium*, non isolé sur milieu de culture. Par ailleurs, la majorité des genres détectés sur gel DGGE sont des bactéries Gram négatif (6 genres sur 7). En effet, les genres *Staphylococcus*, *Microbacterium* ou *Kocuria* qui font partie de la flore dominante cultivable n'ont pas été détectés sur gel DGGE. Ceci suggère que les bactéries Gram + sont masqués par les Gram – qui sont majoritairement sous forme VNC sur les surfaces. Afin de pallier aux problèmes de co-migration rencontrés, une étape de clonage des bandes s'avère nécessaire afin d'affiner l'identification de l'écosystème bactérien.

## **V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'écosystème des surfaces ouvertes d'un atelier de découpe de viande bovine avant et après les opérations de N-D a été en un premier temps abordé d'un point de vue quantitatif. Nous avons ainsi évalué la charge bactérienne des cellules totales, viables et UFC en appliquant la formule de Veulemans *et al.* (1970) afin d'estimer une charge bactérienne plus proche de la réalité que celle qui aurait été évaluée par un seul chiffonnage. Nos résultats montrent qu'avant N-D, la population de cellules totales est plus importante sur PVC (5,4 log cellules/cm<sup>2</sup>) que sur acier inoxydable (4,7 log cellules/cm<sup>2</sup>). Pour les cellules viables, cette charge bactérienne atteint 4 et 4,4 log cellules/cm<sup>2</sup> sur les deux matériaux. Les opérations d'hygiène provoquent une faible réduction des cellules totales sur PVC malgré l'application d'opérations d'hygiène agressives. Sur acier inoxydable, le nombre de cellules totales est légèrement plus élevé après N-D (5 log cellules/cm<sup>2</sup>). Cette charge est équivalente à celle du PVC après N-D (5,1 log cellules/cm<sup>2</sup>), ce qui suggère que la formation d'aérosol pendant le N-D participe à une augmentation de la charge bactérienne sur l'acier inoxydable. L'effet du N-D est surtout visible sur les cellules cultivables et plus particulièrement sur l'acier inoxydable avec 1,6 réduction décimale.

Les valeurs des pentes *k* des droites de décrochement obtenues ainsi que le pourcentage de la population détachée par le premier chiffonnage nous ont permis d'évaluer les forces d'adhésion des populations sur les surfaces. Il en résulte que sur PVC, les cellules qui ont résisté au N-D ont des forces d'adhésion similaires à celles mesurées avant N-D, contrairement à l'acier inoxydable où les forces d'adhésions avant N-D sont plus faibles qu'après N-D, les UFC étant mieux décrochées que les cellules totales et les cellules viables. Ce résultat est corroboré par les dénombrements du premier chiffonnage où le pourcentage de cellules cultivables décrochées avant N-D sur acier inoxydable est le plus élevé (27%).

La comparaison de la charge bactérienne obtenue après application de la formule de Veulemans et celle obtenue sur la première boîte contact révèle une différence moyenne de 1,9 et 2,7 log UFC/cm<sup>2</sup> sur PVC et acier inoxydable respectivement. Une durée d'incubation de 5 jours à 25°C est habituellement préconisée pour le dénombrement des UFC de la viande. Nous avons cependant constaté pour les empreintes réalisées sur PVC après N-D, une différence de 1,5 log pour les UFC après incubation des boîtes à 6 et 14 jours. Ces résultats montrent bien la sous-estimation de la contamination des surfaces réalisée par les professionnels lors d'une surveillance de la propreté microbiologique de leurs équipements.

Dans un second temps, nous avons abordé la diversité bactérienne des surfaces ouvertes de l'atelier de découpe à travers l'étude de la fraction cultivable. Trois cent soixante neuf isolats ont été collectés durant les trois campagnes de prélèvement. Il en ressort que 57% des isolats obtenus sont des bactéries Gram +, et 43% des bactéries Gram -. L'identification des isolats par comparaison des séquences 16S à celles présentes dans la base de donnée RDP10 ne nous a pas

permis d'attribuer un nom d'espèce aux différents isolats. L'identification a donc été restreinte au genre. Cinquante et un genres bactériens (28 genres Gram + et 23 genres Gram -) ont été mis en évidence. L'ordre dominant est celui des Actinomycétales (34% des isolats) suivi par les Pseudomonadales (26% des isolats) et les Bacillales (18% des isolats). Treize genres bactériens ont été isolés à chacune des 3 campagnes parmi lesquels les plus fréquents sont *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter* et *Kocuria*. Les isolats des genres présents à chaque campagne représentent 75, 72 et 62% des isolats des campagnes 1, 2 et 3 respectivement. Des genres bactériens peuvent être représentés par de nombreux isolats lors d'une campagne et être absent lors d'une autre campagne. Des genres minoritaires ont aussi été isolés : leur faible occurrence est due à une faible présence sur la viande fraîche réfrigérée ou bien à des spécificités physiologiques les rendant inaptes à survivre sur les surfaces.

Parmi les 159 isolats Gram – obtenus, *Pseudomonas* est le genre dominant. Cette bactérie psychrotrophe possède un avantage écologique à basses températures où elle se développe plus rapidement que d'autres flores. De plus, elle possède un spectre d'assimilation des substrats carbonés particulièrement large et n'a pas besoin de facteurs de croissance, ce qui lui confère un avantage compétitif vis-à-vis d'autres genres au spectre nutritionnel plus réduit.

Notre étude montre que le N-D entraîne une réduction significative du nombre moyen de genres Gram – isolés par unité de surface ce qui n'est pas le cas pour le nombre moyen de genres Gram +. Il est connu que les bactéries Gram + présentent une forte tolérance aux conditions environnementales (températures de réfrigération, faible humidité relative, et pH). D'ailleurs, une étude menée sur 77 souches bactériennes a démontré que les souches Gram + étaient plus résistantes que les souches Gram – à des concentrations bactéricides de désinfectants. Dans notre cas, la flore Gram + est composée majoritairement de *Staphylococcus*. Ce genre bactérien isolé de sources environnementales très variées (terre, sable, eau, air) peut aussi provenir des matières premières contaminées lors de l'abattage et/ou des manipulations successives. Les résultats d'identification des isolats de *Staphylococcus* par hybridation de sondes ciblant le gène *sodA*, montrent que la majorité des espèces appartiennent au groupe des staphylocoques à coagulase négative qui constituent la flore indigène des produits carnés.

L'identification de la fraction cultivable des bactéries de surface suggère une variation de l'écosystème d'une campagne à une autre. Ces modifications de la diversité bactérienne reflèteraient les modifications de flores des viandes qui sont traitées dans l'atelier lesquelles ont des origines multiples. Y'aurait-il un genre persistant dans l'atelier de découpe ? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé le typage des trois genres dominants *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* en utilisant la rep-PCR. Seule l'espèce *Staphylococcus equorum*,

bactérie typique d'aliments fermentés, serait persistante dans l'atelier de découpe. Bien que des isolats de *S. epidermidis* et *S. vitulinus* appartenant au même type ont été retrouvés respectivement aux campagnes 2 et 3 et aux campagnes 1 et 3, nous avons préféré ne pas les considérer comme étant « persistantes » étant donné qu'un faible nombre d'isolats a été isolé uniquement sur un seul matériau (2 isolats pour *S. epidermidis* et 3 isolats pour *S. vitulinus* tous retrouvés sur l'acier inoxydable). Toutes ces observations nous permettent de conclure que les bactéries qui se trouvent sur les surfaces des équipements sont majoritairement des bactéries en survie transitoire, qui ont vocation à être éliminées par les opérations d'hygiène et à être remplacées par de nouvelles souches bactériennes.

Dans la dernière partie, nous avons étudié l'écosystème bactérien des surfaces par une méthode moléculaire qui est la DGGE. La région V3 composée d'environ 200 pb, a été séquencée et a permis l'identification au niveau du genre ou de l'ordre. Sept genres bactériens sur les 50 genres obtenus en UFC ont été mis en évidence. Ces genres dominants ont tous été retrouvés sous forme cultivable à l'exception d'un seul genre *Propionibacterium* observé une seule fois dans une seule campagne (C3) et non isolé sur milieu de culture. Des genres Gram + faisant partie de la flore dominante cultivable (exemple *Staphylococcus*, *Microbacterium* ou *Kocuria*) n'ont pas été identifiés sur gel DGGE. En effet, 6 parmi 7 genres identifiés par DGGE sont des bactéries Gram -. D'ailleurs, les résultats de quantifications par qPCR des cellules viables et des UFC ont montré que la charge bactérienne des VNC était supérieure à celle des UFC d'environ 1 log. Nous pouvons donc conclure que les bactéries Gram - viables non cultivables sont majoritaires sur les surfaces de l'atelier et masquent les bactéries Gram +, ce qui explique pourquoi elles n'ont pas été identifiées sur DGGE.

Au terme de ce travail, il est important d'établir les perspectives. Les résultats d'empreintes de TSA ont montré qu'une incubation de 14 jours était nécessaire pour permettre la croissance d'un plus grand nombre d'UFC. Une optimisation de la fabrication des milieux de culture pourraient être envisagée de la part des fournisseurs afin de réduire ce temps de latence. Par ailleurs, l'étude de l'écosystème bactérien par DGGE a montré des problèmes de co-migration pour certaines bandes. Il serait donc judicieux de cloner ces fragments d'ADN afin d'affiner les résultats d'identification. Par ailleurs, la quantification de la flore bactérienne présente sur les surfaces d'équipement a été réalisée grâce à des amorces universelles. Or l'étude qualitative de cette flore par DGGE a montré la présence de bactéries Gram - majoritairement sous forme viable non cultivable. En effet, si les *Pseudomonas* cultivables sont moins fréquents aux campagnes 2 et 3, c'est parce qu'ils sont non cultivables. Sachant que la flore *Pseudomonas* reste « la bête noire » des industriels en termes d'altération des produits carnés, il serait intéressant d'étudier ce genre de plus près. Des *Pseudomonas* VNC peuvent-ils retourner à l'état cultivable et altérer la viande ?

Des PCR spécifiques de certaines espèces (exemple *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida*) pourront être ainsi développées afin d'estimer la charge bactérienne VNC. L'évaluation de cette charge bactérienne permettra aux industriels de mettre en place des procédures de désinfection sélectives capable de détruire la flore d'altération. Notre étude montre que le N-D n'entraîne pas une réduction significative du nombre moyen de genres Gram + isolés par unité de surface. Il serait donc intéressant de sélectionner quelques souches bactériennes et d'étudier leur comportement à des concentrations bactéricides de désinfectants. Cette étude pourra aussi se faire sur *S. equorum* persistante dans l'atelier afin de voir si le phénomène de persistance de cette souche est corrélé à un phénomène de résistance aux produits de N-D utilisés dans l'industrie. D'autres questions pourront être aussi abordées à la lumière des résultats obtenus: Combien de temps faut-il aux espèces majoritaires non persistantes pour quitter l'atelier? Comment se comporte *L. monocytogenes* en présence de l'espèce persistante *S. equorum* (effet protecteur, compétition...)? Dans le prolongement de ces travaux, des quantifications de la charge bactérienne aéroportée en termes de cellules totales et cellules viables pourront être menées afin de compléter les résultats obtenues en UFC. Des recherches futures sur les transferts bactériens de la viande vers les surfaces inertes pourront être aussi réalisées.

La démarche d'étude écologique mise en place dans ce projet est applicable pour toute étude des flores des environnements agroalimentaires. Les progrès considérables réalisés en biologie moléculaire offrent désormais des perspectives nouvelles aux industriels pour le suivi et la maîtrise des bactéries indésirables susceptibles de persister dans les ateliers.



## **VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A-B-C

- Agustí, G., Codony, F., Fittipaldi, M., Adrados, B., Morató, J. 2010. Viability determination of *Helicobacter pylori* using propidium monoazide quantitative PCR. *Helicobacter* 15, 473-476.
- Alliot, M. 1999. Ecologie microbienne des sites industriels fromagers : identification, caractérisation des flores isolées et étude des facteurs régissant leur implantation. Ph. D., Institut national agronomique de Paris-Grignon, Paris, France.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 59, 143.
- Anonyme. 1992. Viandes et produits à base de viande- Dénombrements des micro-organismes, méthode par comptage des colonies obtenues à 25°C. Association Française de Normalisation NF V 04-506.
- Anonyme. 1999. Salles propres et environnement maîtrisés apparentés. Maîtrise de la biocontamination. Partie 1 et 2. Organisation internationale de normalisation, NF EN ISO 14698.
- Anonyme. 2004. Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons. International Standard NF ISO 18593. Association Française de Normalisation, La Plaine Saint Denis, France.
- Arajo, C.d.A. 2002. Mise au point d'une méthode de controle de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection en élevage porcin, Ecole Vétérinaire de Toulouse, Toulouse.
- Asséré, A., Oulahal, N., Carpentier, B. 2008. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. *J Appl Microbiol* 104, 1692-1702.
- Avrahami, S., Conrad, R., Braker, G. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Applied and environmental microbiology* 68, 5685.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* 87, 239-250.
- Baleux, B., Caro, A., Lesne, J., Got, P., Binard, S., Delpeuch, B. 1998. Survie et maintien de la virulence de *Salmonella* Typhimurium VNC exposée simultanément à trois facteurs stressants expérimentaux. *Oceanologica Acta* 21, 939-950.
- Bano, N., Hollibaugh, J.T. 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and environmental microbiology* 68, 505.
- Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L., Morea, M. 2006. Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Science* 72, 261-269.
- Benezech, T., Lalande, M. 1999. Le nettoyage en place (NEP). JY Leveau et M. Bouix: Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 341-363.
- Bernal, A., Ear, U., Kyrpides, N. 2001. Genomes OnLine Database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide. *Nucleic acids research* 29, 126-127.
- Bièche, C., de Lamballerie, M., Chevret, D., Federighi, M., Tresse, O. 2012. Dynamic proteome changes in *Campylobacter jejuni* 81-176 after high pressure shock and subsequent recovery. *Journal of Proteomics* 75, 1144-1156.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of

- haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 11, 671-676.
- Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M., Heir, E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *Journal of clinical microbiology* 43, 4363.
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S. 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and environmental microbiology* 69, 4116.
- Boistier-Marquis, E., Lagsir-Oulahal, N., Callard, M. 1999. Applications des ultrasons de puissance en industries alimentaires. *Industries alimentaires et agricoles* 116, 23-31.
- Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS microbiology ecology* 39, 101-112.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* : current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51-63.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD® BacLight (TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of microbiological methods* 37, 77-86.
- Bourion, F., Cerf, O. 1996. Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. *Sciences des Aliments* 16, 151-166.
- Bowman, J. 2006. The genus *Psychrobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., (Eds.). Springer New York. 920-930.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. 2011. Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and ortho-phthalaldehyde on 77 bacterial strains. *Journal of Hospital Infection* 78, 208-213.
- Brightwell, G., Boerema, J., Mills, J., Mowat, E., Pulford, D. 2006. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 47-53.
- Brown, V., Lowbury, E. 1965. Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical pathology* 18, 752.
- Burfoot. 2005. Aerosols as a contamination risk. In: Lelieveld, H.L.M., Mostert, M.A., Holah, J.T., (Eds.), *Handbook of Hygiene in The Food Industry*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge. 93-102.
- Byrd, J., J., Xu, H.-S., Colwell, R., R. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and environmental microbiology* 57, 875-878.
- C, K., S, E., W, J., H, S., B, R., J, M., S, M., Yong, H., K, H., Y, H. 2006. 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *Journal of microbiology and biotechnology* 16, 92-101.
- Carpentier, B. 2009. Biofilms in red meat processing. In: Fratamico, P.M., Bassam, A.A., Gunther, N.W., (Eds.), *Biofilms in the food and beverage industries*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. 375-395.
- Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* in equipment and premises. *New food* 14, 17-20.
- Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., Muyzer, G. 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 66, 499.

- Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "Resistance" has different meanings. *International Journal of Food Microbiology* 136, 247-254.
- Champomier-Vergès, M.C., Stintzi, A., Meyer, J.M. 1996. Acquisition of iron by the non-siderophore-producing *Pseudomonas fragi*. *Microbiology* 142, 1191.
- Chen, K., Pachter, L. 2005. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS computational biology* 1, e24.
- Chen, N.T., Chang, C.W. 2010. Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real time quantitative PCR. *Journal of Applied Microbiology* 109, 623-634.
- Chen, W., Martinez, G., Mulchandani, A. 2000. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Analytical Biochemistry* 280, 166-172.
- Christieans, S., Fravallo, P., Frencia, J.-P. 2006. Etude comparative de méthodes de prélèvement sur carcasses de bovins pour le dénombrement bactérien. ADIV-AFSSA.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 2259-2261.
- Clegg, R.M. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Current opinion in biotechnology* 6, 103-110.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and environmental microbiology* 67, 5113.
- Colwell, R.R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A., Levine, M.M. 1996. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 28-31.
- Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S., Talon, R. 2006. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International journal of food microbiology* 108, 210-217.
- Coton, E., Mulder, N., Coton, M., Pochet, S., Trip, H., Lolkema, J.S. 2010. Origin of the putrescine-producing ability of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Applied and environmental microbiology* 76, 5570-5576.
- Cotte, C., Orenga, S., Andréa, R., Robichon, D. 2006. *Staphylococcus aureus* specific detection media and identifying and/or counting method using same EP Patent 1,390,524.
- Criquelion, J., Durand, F., Olivier, F., Rauwel, G., Sabat, F. 1999. Caractéristiques générales des fonctions chimiques désinfectantes. In: Leveau, J.Y., Bouix, M., (Eds.), *Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries (Collection STAA)*, Paris.
- Crump, B.C., Hopkinson, C.S., Sogin, M.L., Hobbie, J.E. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and environmental microbiology* 70, 1494.

## D-E-F

- Dainty, R., Mackey, B. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Microbiology* 73, 103s-114s.
- Day, I., O'Dell, S.D., Cash, I.D., Humphries, S.E., Weavind, G.P. 1995. Electrophoresis for genotyping: temporal thermal gradient gel electrophoresis for profiling of oligonucleotide dissociation. *Nucleic acids research* 23, 2404.
- Deberghes, P., Kleiss, T., Cordier, J.L., Vincent, J.P., Hornez, J.-P., Catteau, M. 1995. Amélioration de l'efficacité du prélèvement de surface par utilisation d'éponges. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 13, 409-412.
- Delbes, C., Montel, M.C. 2005. Design and application of a *Staphylococcus* specific single strand conformation polymorphism PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Letters in applied microbiology* 41, 169-174.
- Dennis, P., Edwards, E.A., Liss, S.N., Fulthorpe, R. 2003. Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Applied and environmental microbiology* 69, 769.
- Dijkshoorn, L., Towner, K.J., Struelens, M. 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands.
- Doré, J., Rigottier-Gois, L. 2001. Molecular analysis of the colonic microflora. *Gastroenterol Clin Biol* 25, C74-78.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., Raoult, D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology* 38, 3623.
- Drancourt, M., Raoult, D. 2002. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of clinical microbiology* 40, 1333.
- Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and environmental microbiology* 69, 3840.
- Eckert, C., Van Broeck, J., Spigaglia, P., Burghoffer, B., Delmee, M., Mastrantonio, P., Barbut, F. 2011. Comparison of a commercially available rep-PCR system (Diversilab (R)) with PCR-ribotyping for typing of *Clostridium difficile* strains. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 00324-00311v00321.
- Ellerbroek, L. 1997. Airborne microflora in poultry slaughtering establishments. *Food microbiology* 14, 527-531.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F. 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and environmental microbiology* 72, 4663-4671.
- Euzéby, J.P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International journal of systematic bacteriology* 47, 590-592.
- Falentin, H., Deutsch, S.M., Jan, G., Loux, V., Thierry, A., Parayre, S., Maillard, M.B., Dherbécourt, J., Cousin, F.J., Jardin, J. 2010. The Complete Genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications. *PLoS One* 5, e11748.
- Fan, E., Levin, D., Glickman, B., Logan, D. 1993. Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 288, 85-92.
- Fischer, S., Lerman, L. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 1579.

- Forsman, P., Tilsaia-Timisjärvi, A., Alatosava, T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143, 3491.
- Fortin, N.Y., Mulchandani, A., Chen, W. 2001. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Analytical Biochemistry* 289, 281-288.
- Frencia, J.P. 1998. Les facteurs d'efficacité du nettoyage. *Viandes et produits carnés* 20.
- Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O., Heulin, T. 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-Laccaria bicolor mycorrhizosphere. *Applied and environmental microbiology* 63, 1852.

## G-H-I

- Gafan, G.P., Spratt, D.A. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE)–An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS microbiology letters* 253, 303-307.
- Garcia-Lopez, M., Prieto, M., Otero, A. 1998. The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. *The microbiology of meat and poultry*, 1-34.
- García-Martínez, J., Bescós, I., Rodríguez-Sala, J.J., Rodríguez-Valera, F. 2001. RISSC: a novel database for ribosomal 16S–23S RNA genes spacer regions. *Nucleic acids research* 29, 178.
- Gardner, G.A. 1982. Psychotrophic micro-organisms in spoilage and pathogenicity, T., A., Roberts ed. 139-173.
- Giammarinaro, P., Leroy, S., Chacornac, J.P., Delmas, J., Talon, R. 2005. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *Journal of clinical microbiology* 43, 3673.
- Giglio, S., Monis, P.T., Saint, C.P. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real time multiplex PCR. *Nucleic acids research* 31, e136.
- Gilbert, R.J. 1970. Comparison of materials used for cleaning equipment in retail food premises and of two methods for the enumeration of bacteria on cleaned equipment and work surfaces. *Journal of Hygiene* 68, 221-232.
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J.L., Carlier, V., Ermel, G. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International journal of food microbiology* 53, 127-140.
- Glazer, A.N., Mathies, R.A. 1997. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Current opinion in biotechnology* 8, 94-102.
- Gonzales, R. 1995. Etude comparative des différentes techniques manuelles de controle de l'état microbiologique des surfaces, Université de Paris XII-Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, Paris.
- Gray, N.D., Miskin, I.P., Kornilova, O., Curtis, T.P., Head, I.M. 2002. Occurrence and activity of Archaea in aerated activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* 4, 158-168.
- Grosskopf, R., Janssen, P.H., Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and environmental microbiology* 64, 960.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 669-685.

- Haroux, C. 1999. Le nettoyage par voie enzymatique : vers une hygiène propre et douce. In: Leveau, J.Y., Bouix, M., (Eds.), Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries (Collection STAA), Paris.
- Harvey, J., Keenan, K., Gilmour, A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food microbiology 24, 380-392.
- Healy, M., Huang, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R. 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. Journal of clinical microbiology 43, 199.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome research 6, 986.
- Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Applied and environmental microbiology 68, 114.
- Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L. 1999. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. International journal of food microbiology 48, 211-219.
- Hilton, A., Banks, J., Penn, C. 1996. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. Journal of Applied Microbiology 81, 575-584.
- Hirai, Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. Journal of Hospital Infection 19, 191-200.
- Holah, J.T., Thorpe, R.H. 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. Journal of Applied Bacteriology 69, 599-608.
- Holzappel, W.H. 1998. The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. The microbiology of meat and poultry, 35-84.
- Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W., Geis, A., Heller, K. 2004. Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. Systematic and applied microbiology 27, 211-218.
- Imamovic, L., Balleste, E., Jofre, J., Muniesa, M. 2010. Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. Applied and environmental microbiology 76, 5693.

## J-K-L

- Jacquet, C., Reynaud, A. 1994. Differences in the sensitivity to eight disinfectants of *Listeria monocytogenes* strains as related to their origin (short note). International journal of food microbiology 22, 79-83.
- Jaudon, P. 2000. Hygiène et propreté des surfaces en milieu agro-alimentaire: produits humides Éd. PYC livres.
- Jawad, A., Snelling, A., Heritage, J., Hawkey, P. 1998. Comparison of ARDRA and *recA*-RFLP analysis for genomic species identification of *Acinetobacter* spp. FEMS microbiology letters 165, 357-362.
- Jeng, D.K., Lin, L.I., Hervey, L.V. 1990. Importance of ultrasonication conditions in recorvery of microbial contamination from material surfaces. Journal of Applied Bacteriology 68, 479-484.
- Jiang, Y., Gao, F., Xu, X., Su, Y., Ye, K., Zhou, G. 2010. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE. Meat Science 86, 889-895.

- Jiang, Y., Gao, F., Xu, X., Ye, K., Zhou, G. 2011. Changes in the Composition of the Bacterial Flora on Tray-Packaged Pork during Chilled Storage Analyzed by PCR-DGGE and Real-Time PCR. *Journal of Food Science* 76, M27-M33.
- Jones, M.V., Herd, T.M., Christie, H.J. 1989. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* 58, 49-61.
- Karsai, A., Muller, S., Platz, S., Hauser, M.T. 2002. Evaluation of a homemade SYBR® Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques* 32, 790-796.
- Kaur, J., Radu, S., Ghazali, F.M., Kqueen, C.Y. 2010. Real-time PCR-based detection and quantification of genetically modified maize in processed feeds commercialised in Malaysia. *Food Control* 21, 1536-1544.
- Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B. 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of clinical microbiology* 42, 3925.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. 1978. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 415-420.
- Kozdrój, J., van Elsas, J.D. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of microbiological methods* 43, 197-212.
- Krysinski, E.P., Brown, L.J., Marchisello, T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection* 55, 246-251.
- Kukita, Y., Tahira, T., Sommer, S.S., Hayashi, K. 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Human Mutation* 10, 400-407.
- Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., Esaki, N. 2004. Cold-active esterase from *Psychrobacter* spp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1696, 59-65.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research* 28, 655.
- Labadie, J. 2004. Les écosystèmes microbiens dans les produits carnés. *Viandes et produits carnés* 25.
- Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology* 70, 5644.
- Langsrud, S., Sundheim, G. 1997. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J Appl Microbiol* 82, 705-712.
- Lawrence, L.M., Gilmour, A. 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 61, 2139-2144.
- Lee, J.L., Levin, R.E. 2009. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *Journal of microbiological methods* 76, 93-96.
- Lelieveld, H., Mostert, I., White, B., Holah, J. 2003. *Hygiene in food processing: principles and practice* Woodhead.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., Faille, C. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26, 421-431.



- Leriche, V., Carpentier, B. 1995. Viable but non culturable *Salmonella* Typhimurium within single and binary species biofilms in response to chlorine treatment. *Journal of Food Protection* 58, 1186-1191.
- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J.P., Lebert, I., Talon, R. 2010. Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food microbiology* 27, 294-301.
- Leroy, S., Lebert, I., Chacornac, J.P., Chavant, P., Bernardi, T., Talon, R. 2009. Genetic diversity and biofilm formation of *Staphylococcus equorum* isolated from naturally fermented sausages and their manufacturing environment. *International journal of food microbiology* 134, 46-51.
- Lewis, K. 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5, 48-56.
- Li, M., Zhou, G., Xu, X., Li, C., Zhu, W. 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food microbiology* 23, 607-611.
- Liolios, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C. 2006. The Genomes On Line Database (GOLD) v. 2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic acids research* 34, D332-D334.
- Lyons, S.R., Griffen, A.L., Leys, E.J. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2362.

## M-N-O

- Marouani-Gadri, N., Augier, G., Carpentier, B. 2009. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by *Sakai* and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 133, 62-67.
- Marouani-Gadri, N., Firmesse, O., Chassaing, D., Sandris-Nielsen, D., Arneborg, N., Carpentier, B. 2010. Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. *International journal of food microbiology* 144, 96-103.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research* 20, 3479.
- Martinson, A., Cronin, U., Quealy, J., Stapleton, A., Wilkinson, M. 2011. Swab sample preparation and viable real-time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces. *Food Control*.
- Masurovsky, E.B., Jordan, W.K. 1960. Studies on the removal of *Staphylococcus aureus* from milk-contact surfaces by ultrasonic cleaning methods. *Journal of Dairy Science* 43, 1545-1559.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., Villani, F. 2004. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science* 67, 149-158.
- McEniry, J., O'Kiely, P., Clipson, N.J.W., Forristal, P.D., Doyle, E.M. 2008. Bacterial community dynamics during the ensilage of wilted grass. *Journal of Applied Microbiology* 105, 359-371.
- McGuinness, S., McCabe, E., O'Regan, E., Dolan, A., Duffy, G., Burgess, C., Fanning, S., Barry, T., O'Grady, J. 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat Science* 83, 555-562.

- Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., Audurier, A. 2000. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol* 66, 5083-5086.
- Mettler, E., Carpentier, B. 1997. Location, enumeration and identification of the microbial contamination after cleaning of EPDM gaskets introduced into a milk pasteurization line. *Lait* 77, 489-503.
- Mettler, E., Carpentier, B. 1998. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *J Food Prot* 61, 57-65.
- Meugnier, H., Bes, M., Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Brun, Y., Freney, J., Fleurette, J. 1996. Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. *International journal of food microbiology* 31, 325-331.
- Meyer C. 2012. Dictionnaire des Sciences Animales. [On line]. Cirad, Montpellier, France.
- Midelet, G., Carpentier, B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl Environ Microbiol* 68, 4015-4024.
- Midelet, G., Kobilinsky, A., Carpentier, B. 2006. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Applied and environmental microbiology* 72, 2313.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 65, 3518.
- Mokgatla, R.M., Gouws, P.A., Brozel, V.S. 2002. Mechanisms contributing to hypochlorous acid resistance of a *Salmonella* isolate from a poultry-processing plant. *J Appl Microbiol* 92, 566-573.
- Molin, G., Ternström, A. 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *Journal of general Microbiology* 128, 1249.
- Molin, G., Ternström, A., Ursing, J. 1986. Notes: *Pseudomonas lundensis*, a New Bacterial Species Isolated from Meat. *International journal of systematic bacteriology* 36, 339.
- Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular microbiology* 26, 1005-1011.
- Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Van De Peer, Y., De Wachter, R., Timmis, K.N. 1996. The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. *Systematic and applied microbiology* 19, 478-492.
- Moore, G., Griffith, C. 2002. Factors Influencing Recovery of Micro-organisms from Surfaces by Use of Traditional Hygiene Swabbing. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 22, 410-421.
- Moore, G., Griffith, C., Fielding, L. 2001. A Comparison of Traditional and Recently Developed Methods for Monitoring Surface Hygiene within the Food Industry : A Laboratory Study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 21, 478-488.
- Moreau, L. 1993. Le plan de nettoyage et de désinfection en industrie alimentaire. Application à un atelier de jambons cuits. Th. : Med. vet. : Nantes : 1993-NAN 67, 137.
- Mosso, M.A., Rosa, M.C., Vivar, C., Medina, M.R. 1994. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 77, 370-381.
- Mourcel, P., Bourion, F., Hermon, C., Haroux, C., Amgar, A. 1998. Nettoyage et désinfection dans les entreprises alimentaires. ASEPT ed.
- Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and environmental microbiology* 62, 2676-2680.

- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317-322.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59, 695.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Nieminen, T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M., Björkroth, K. 2010. Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified-atmosphere packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *International journal of food microbiology*.
- Nilsson, R.E., Ross, T., Bowman, J.P. 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International journal of food microbiology* 150, 14-24.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A.K. 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* 54, 276-289.
- Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods* 67, 310-320.
- Nunan, N., Daniell, T.J., Singh, B.K., Papert, A., McNicol, J.W., Prosser, J.I. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Applied and environmental microbiology* 71, 6784.
- Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y., Delacroix-Buchet, A. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 70, 5628.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 68, 3691.
- Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43, 93-100.
- Oliver, J.D., McDougald, D., Barrett, T., Anne Glover, L., Prosser, J.I. 1995. Effect of temperature and plasmid carriage on nonculturability in organisms targeted for release. *FEMS microbiology ecology* 17, 229-237.
- Oppliger, A., Charrière, N., Droz, P.O., Rinsoz, T. 2008. Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Annals of occupational hygiene* 52, 405.
- Oulahal-Lagsir, N.A.M.-G., E. Boistier', L.J. Blumand M. Bonneau. 2000. The development of an ultrasonic apparatus for the non-invasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment. *Letters in applied microbiology* 30, 47-52.
- Oulahal, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., L.J. Blum, L.J. 2006. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 192–196.

## P-Q-R

- Pan, Y., Breidt Jr, F., Kathariou, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and environmental microbiology* 72, 7711.
- Peneau, S., Chassaing, D., Carpentier, B. 2007. First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. *Appl Environ Microbiol* 73, 2839-2846.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F. 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food microbiology* 28, 84-93.
- Pinhassi, J., Zweifel, U.L., Hagstrom, A. 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Applied and environmental microbiology* 63, 3359.
- Poitras, E., Houde, A. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotechnol* 2, 2-11.
- Puleo, J., R., Favero, M., S., Petersen, N., J. 1967. Use of ultrasonic energy in assessing microbial contamination on surfaces. *Applied Microbiology* 15, 1345-1351.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., Vaughan, E.E. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and environmental microbiology* 68, 1882.
- Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L. 2005. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *International journal of food microbiology* 97, 277-284.
- Raponi, G., Ghezzi, M., Gherardi, G., Dicuonzo, G., Caputo, D., Venditti, M., Rocco, M., Micozzi, A., Mancini, C. 2005. Antimicrobial susceptibility, biochemical and genetic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from the bloodstream of patients hospitalized in critical care units. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 17, 264.
- Relman, D.A., Falkow, S. 2001. The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends in microbiology* 9, 206-208.
- Ritz, M., Tholozan, J., Federighi, M., Pilet, M. 2001. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and environmental microbiology* 67, 2240.
- Rodríguez Valera, F. 2004. Environmental genomics, the big picture? *FEMS microbiology letters* 231, 153-158.
- Roszak, D.B., Colwell, R.R. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2889-2893.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., Holck, A.L. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and environmental microbiology* 71, 1018.
- Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G., Villani, F. 2006. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food microbiology* 23, 797-802.
- Ryan, M.P., Adley, C.C. 2010. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *Journal of Hospital Infection* 75, 153-157.

## S-T-U

- Saha, S., Chopade, B. 2001. Studies on occurrence and distribution of *Acinetobacter* spp. and other gram-negative bacteria from meat. *Journal of food science and technology* 38, 17-22.
- Schlegelova, J., Babak, V., Holasova, M., Konstantinova, L., Necidova, L., Sisak, F., Vlkova, H., Roubal, P., Jaglic, Z. 2010. Microbial Contamination after Sanitation of Food Contact Surfaces in Dairy and Meat Processing Plants. *Czech journal of food sciences* 28, 450-461.
- Schloss, P.D., Handelsman, J. 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biology* 6, 229.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R. 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *Genome Research* 4, 234.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Scola, B.L., Bui, L., Baranton, G., Khamis, A., Raoult, D. 2006. Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS microbiology letters* 263, 142-147.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* 23, 1205-1208.
- Shale, K., Lues, J., Venter, P., Buys, E. 2005. The distribution of *Staphylococcus* spp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food microbiology* 22, 433-438.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 232.
- Sheridan, G., Masters, C., Shallcross, J., Mackey, B. 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and environmental microbiology* 64, 1313.
- Short, J.M. 1997. Recombinant approaches for accessing biodiversity. *Nature biotechnology* 15, 1322-1323.
- Shutt, C.K., Pounder, J.I., Page, S.R., Schaecher, B.J., Woods, G.L. 2005. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of clinical microbiology* 43, 1187.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C.C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of microbiological methods* 69, 470-479.
- Smith, L., Burgoyne, L.A. 2004. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC ecology* 4, 4.
- Speksnijder, A.G.C.L., Kowalchuk, G.A., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J.R., Laanbroek, H.J. 2001. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Applied and environmental microbiology* 67, 469.
- Steve Yan, S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P., Foley, S.L. 2004. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4, 189-204.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and environmental microbiology* 66, 4605.

- Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Engelbeen, K., Štětina, V., Swings, J., Petráš, P. 2004. Reclassification of *Staphylococcus pulvereri* Zakrzewska-Czerwińska et al. 1995 as a later synonym of *Staphylococcus vitulinus*. Webster *et al.* 1994. International journal of systematic and evolutionary microbiology 54, 2213-2215.
- Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M., Gotou, S., Watanabe, I., Fujii, T. 2004. Direct detection and identification of lactic acid bacteria in a food processing plant and in meat products using denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Food Protection 174; 67, 2515-2520.
- Tanaka, Y., Takahashi, H., Kitazawa, N., Kimura, B. 2010. Rapid Estimation of Microbial Populations in Fish Samples by Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S rDNA. Journal of Food Protection 174; 73, 104-113.
- Trachoo, N., Frank, J., Stern, N. 2002. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. Journal of Food Protection 174; 65, 1110-1116.
- Tremonte, P., Succi, M., Reale, A., Di Renzo, T., Sorrentino, E., Coppola, R. 2007. Interactions between strains of *Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats. Journal of Applied Microbiology 103, 743-751.
- Tse, C., Capeau, J. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin 61, 279-293.

## V-W-X

- Van de Peer, Y., Chapelle, S., De Wachter, R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. Nucleic acids research 24, 3381.
- Van der Veen, S., Abee, T. 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. International journal of food microbiology 144, 421-431.
- Van Hannen, E.J., Zwart, G., Van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Ebert, J., Laanbroek, H.J. 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. Applied and environmental microbiology 65, 795.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 304, 66.
- Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic acids research 19, 6823.
- Veulemans, A., Jacquain, E., Jacquain, D. 1970. Etude d'une méthode simple pour la détermination du degré de pollution des surfaces et la comparaison du pouvoir désinfectant de divers produits d'entretien. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires 25, 58-65.
- Vincent, J. 1999. La chimie du nettoyage. In: Leveau, J.Y., Bouix, M., (Eds.), Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries (Collection STAA), Paris.
- Walter, J., Tannock, G., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D., Munro, K., Alatossava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Applied and environmental microbiology 66, 297.
- Warriner, K., Aldsworth, T.G., Kaur, S., Dodd, C.E. 2002. Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing. J Appl Microbiol 93, 169-177.
- Watanabe, K., Nelson, J., Harayama, S., Kasai, H. 2001. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. Nucleic acids research 29, 344.

- Weidner, S., Arnold, W., Puhler, A. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* 62, 766.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173, 697.
- Wilhelm, N., Le Coustumier, A., Fevrier, F., Le Flèche, A., Grasmick, C., Grimont, P. 2005. Bactéries d'identification difficile ou non cultivables en routine: Quelles solutions? Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine. *Spectra biologie* 24, 49-54.
- Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J. 1990. Acidovorax, a New Genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) Group 13, EF Group 16, and Several Clinical Isolates, with the Species *Acidovorax facilis*, *Acidovorax delafieldii*, and *Acidovorax temperans* *International journal of systematic bacteriology* 40, 384-398.

## X-Y-Z

- Yaron, S., Matthews, K. 2002. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology* 92, 633-640.
- Yu, F.P., McFeters, G.A. 1994. Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection. *Applied and environmental microbiology* 60, 2462.
- Yu, Z., Morrison, M. 2004. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 70, 4800.
- Zhuang, R., Beuchat, L., Angulo, F. 1995. Fate of *Salmonella* montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied and environmental microbiology* 61, 2127.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and environmental microbiology* 64, 3854.

## **VII- ANNEXES**



# ANNEXE 1

14%

Detarjeur

Temps d'action 20'

Produit : **DEPTAL MCL**  
Date de MAJ : 15/01/08  
version 2.4

**HYPRED**

Code : 0 208 0

# DEPTAL MCL

Liquide concentré à usage professionnel

INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES

Alcalin chloré

DÉTERGENT-DÉSINFECTANT

POUR APPLICATION MOUSSE

NOUVEAU : PRODUIT BIOCIDÉ

Substance(s) active(s) : Hypochlorite de sodium, exprimé en chlore actif 5,62% (exprimé en p/p)

GROUPE 1 : Désinfectants et produits biocides généraux; Type de produits 4 : Désinfectants pour les surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux

Homologation bactéricide n° 9400362 délivrée par le Ministère de l'Agriculture : Locaux de stockage (P.O.V), Locaux de stockage (P.O.A), Matériel de laiterie, à la concentration de 2,0 % pour 5 min de temps de contact

Homologation fongicide n° 9400362 délivrée par le Ministère de l'Agriculture : Locaux de stockage (P.O.V), Locaux de stockage (P.O.A), Matériel de laiterie, à la concentration de 4,0 % pour 15 min de temps de contact

---

## PRESENTATION

- . Liquide limpide, Jaune pâle
- . pH pur : 14+/- 0,5
- . pH à 10 g/l : 11,9+/- 0,2

HYPRED SA au capital de 230 124 euros  
RCS St Malo B 330 507 419 - SIRET 330507419 00019  
55 Boulevard Jules VERGER B.P. 10180,35803 DINARD CEDEX,FRANCE - Tél : (33) (0)2 99 16 50 00 - Fax : (33) (0)2 99 16 50 20

- 1 / 5 -

. Masse volumique à 20° C : 1,195+/- 0,01 g/cm<sup>3</sup>

. Point de gel : -5 °C

### PROPRIETES

. Détergent

. Désinfectant bactéricide et fongicide

. Moussant

. Mouillant

. Antitartre

### APPLICATION

. Nettoyage en application mousse des surfaces : sols, murs, tables, extérieur de cuveries, machines.

. Rincer abondamment avant que la solution ne sèche.

. A utiliser avec précautions sur les métaux légers et ou colorés.

---

#### Mode d'emploi:

Concentration : 2 - 4 %

Température : Ambiante

Temps de contact : 15 - 20 min

Produit : **DEPTAL MCL**

Date de MAJ : 15/01/08  
version 2.4

**HYPRED**

Code : 0 208 0

Séquence standard d'utilisation :

Rinçage à l'eau

Application solution DEPTAL MCL en mousse

Rinçage final à l'eau potable

### **CONTRÔLE DE LA SOLUTION**

- . Prise d'échantillon : 50 ml
- . Indicateur : Phénolphtaléine
- . Réactif(s): HCl N/2 ; Na2S2O3
- . Facteur de titrage :  $f = 0,52$

*Concentration en % = chute de burette \* f*

*Concentration en g/l = chute de burette \* f \* 10*

---

### **CONDITIONNEMENT**

Jerrican 10l Jaune 12kg

Jerrican 22l Jaune 26kg

Fût 120l Bleu foncé 130kg

HYPRED SA au capital de 230 124 euros  
RCS St Malo B 330 507 419 - SIRET 330507419 00019  
55 Boulevard Jules VERGER B.P. 10180,35803 DINARD CEDEX,FRANCE - Tél : (33) (0)2 99 16 50 00 - Fax : (33) (0)2 99 16 50 20

- 3/ 5-

Fût 200l Bleu foncé 230kg

Container 800l 950kg

Container One Way 1000l 1150kg

Si le produit n'est pas utilisé dans les 6 mois à partir de sa date de fabrication mais que les conditions de stockage ont été respectées alors un délai supplémentaire pourra lui être attribué. Dans ce cas, contacter notre service commercial.

## SECURITE

Consulter la fiche de données de sécurité disponible sur INTERNET : <http://www.hypred.fr>

## LEGISLATION

Ce produit est conforme à l'arrêté du 8 septembre 1999 concernant les produits utilisés pour le nettoyage des surfaces pouvant entrer en contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux.

Pour les produits désinfectants, les tests d'efficacité suivants ont été réalisés en conformité avec les normes en vigueur

# DOSSIER EFFICACITE

8 PAGES ATTACHEES

Ces documents ont été reproduits électroniquement par le laboratoire en charge des tests et sont valables sans signature.

EN 1276	Conditions de saleté	2 %
EN 1650	Conditions de saleté	0,5 %
EN 13697	En cours	

## ANNEXE 2

2%

desinfectant

Produit : **DEPTIL G4**  
Date de MAJ : 12/01/09  
version 2.4

Temps d'action: 20'

**HYPRED**

Code : 0 302 0

# DEPTIL G4

→ Poluérésistins au  
Canon.

Liquide concentré à usage professionnel

INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES

## DESINFECTION

PRODUIT BIOCIDE - N° MEEDDAT : 7971

Substance(s) active(s) : Composés de l'ion ammonium quaternaire, benzylalkyl diméthyles, chlorures 8,5%+Glutaral 6,5%

(exprimé en p/p)

GROUPE 1 : Désinfectants et produits biocides généraux; Type de produits 3 : Produits biocides destinés à l'hygiène vétérinaire; Type de produits 4 : Désinfectants pour les surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux

Homologation bactéricide n° 9000297 délivrée par le Ministère de l'Agriculture : Locaux de stockage (P.O.A), Matériel de transport (P.O.A), à la concentration de 0,4%, Logements d'animaux domestiques, Matériel transport animaux domestiques, Matériel d'élevage, à la concentration de 1,8 % pour 5 min de temps de contact

## PRESENTATION

- . liquide, Incolore
- . pH pur : 6+/- 1,0
- . pH à 10 g/l : 6+/- 1,0
- . Masse volumique à 20° C : 1,01+/- 0,01 g/cm<sup>3</sup>
- . Point de gel : -5 °C

HYPRED SA au capital de 230 124 euros  
RCS St Malo B 330 507 419 - SIRET 330507419 00019  
55 Boulevard Jules VERGER B.P. 10180.35803 DINARD CEDEX, FRANCE - Tél : (33) (0)2 99 16 50 00 - Fax : (33) (0)2 99 16 50 20

- 1/ 5 -



## PROPRIETES

- . Contient 2 principes actifs
- Glutaraldéhyde à 50% : 131 g/l
- Chlorure de benzalkonium à 50% : 171 g/l
- . Spectre d'activité très large du fait de la présence d'un aldéhyde couplé avec un ammonium quaternaire. Homologation bactéricide
- . Peu sensible à la présence de substances interférentes.
- . Non corrosif sur les matériaux usuels aux concentrations d'emploi.
- . Pouvoir mouillant très élevé, avec une tension superficielle basse du fait des propriétés tensio-actives des ammoniums quaternaires.

## APPLICATION

**Industries des boissons** : Désinfection des surfaces ouvertes, des sols, des soutireuses, des extérieurs de cuves.

**Industries de la viande** : Désinfection du matériel : tables de découpes, tapis, cutters, hachoirs, etc.....

Mode d'emploi:

Concentration : 0.5-2 %

Température : < 50 °C

Temps de contact :> 20 min

Séquence standard d'utilisation :

Elimination souillure physique et rinçage

Application de DEPTIL G4

Rinçage final à l'eau (eau potable pour les industries alimentaires)

### CONDITIONNEMENT

Jerrican 5l Blanc 5kg

Jerrican 22l Vert 22kg

Fût 220l 200kg

Container 800l 800kg

Container One Way 1000l 1000kg

---

Si le produit n'est pas utilisé dans les 12 mois à partir de sa date de fabrication mais que les conditions de stockage ont été respectées alors un délai supplémentaire pourra lui être attribué.

Dans ce cas, contacter notre service commercial.

### SECURITE

. Attention par sa teneur en ammonium quaternaire, DEPTIL G4 risque d'opacifier le plexiglas par un phénomène de dépolymérisation.

Consulter la fiche de données de sécurité disponible sur INTERNET : <http://www.hypred.fr>

## LEGISLATION

Ce produit est conforme à l'arrêté du 8 septembre 1999 concernant les produits utilisés pour le nettoyage des surfaces pouvant entrer en contact avec des denrées, produits et boissons pour l'alimentation de l'homme et des animaux.

Utilisez les biocides avec précaution. Avant toute utilisation, lisez l'étiquette et les informations concernant le produit.

---

Pour les produits désinfectants, les tests d'efficacité suivants ont été réalisés en conformité  
avec les normes en vigueur

## DOSSIER EFFICACITE

8 PAGES ATTACHEES

---

EN 1276 : Activité bactéricide	Conditions de propreté	0,4 %
EN 1650 : Activité levuricide	Conditions de propreté	0,5 %

# ANNEXE 3

# DEPTACID ARS

(1/2 for seaw)

Acide liquide auto-moussant

INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES

## PRESENTATION

- . Liquide opalescent
- légèrement jaunâtre
- . pH pur : Non renseigné
- . pH à 10 g/l : 1,6+/- 0,2
- . Masse volumique à 20° C : 1,235+/- 0,01 g/cm<sup>3</sup>
- . Point de gel : -20 °C

---

## PROPRIETES

- . Détartrant puissant
- . Mouillant
- . Détergent
- . Moussant

. Utiliser avec précaution sur les alliages d'aluminium, les métaux colorés (cuivre et alliages)

. Eviter l'emploi sur l'acier ordinaire, l'acier galvanisé.

### **APPLICATION**

Acide liquide auto-moussant

INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES

Mode d'emploi:

Concentration : 2 - 6 %

Température : Ambiante

Temps de contact : 15 - 20 min

Séquence standard d'utilisation :

---

Rinçage à l'eau

Application de DEPTACID ARS

Rinçage final à haute pression

### **CONTRÔLE DE LA SOLUTION**

HYPRED SA au capital de 230 124 euros

RCS St Malo B 330 507 419 - SIRET 330507419 00019

55 Boulevard Jules VERGER B.P. 10180,35803 DINARD CEDEX,FRANCE - Tél : (33) (0)2 99 16 50 00 - Fax : (33) (0)2 99 16 50 20

- 2/3-

Produit : **DEPTACID ARS**

Date de MAJ : 21/11/05

version 1.2



Code : 0 12Z 0

- . Prise d'échantillon : 50 ml
- . Indicateur : Méthylorange
- . Réactif(s): NaOH N/2
- . Facteur de titrage : f = 0,2

*Concentration en % = chute de burette \* f*

*Concentration en g/l = chute de burette \* f \* 10*

### **CONDITIONNEMENT**

Jerrican 22l Rouge 28kg

Fût 220l Bleu foncé 270kg

Container One Way 1000l 1200kg

Si le produit n'est pas utilisé dans les 12 mois à partir de sa date de fabrication mais que les conditions de stockage ont été respectées alors un délai supplémentaire pourra lui être

attribué. Dans ce cas, contacter notre service commercial.

### **SECURITE**

Consulter la fiche de données de sécurité disponible sur INTERNET : <http://www.hypred.fr>



# ANNEXE 4

## Composition du neutralisant polyvalent de désinfection ATL<sup>®</sup>

**Domaine d'utilisation :** Ce neutralisant polyvalent inhibe l'action d'un ou de plusieurs produits désinfectants de surfaces. A diluer au 10<sup>ème</sup> dans les milieux de culture.

### Composants du neutralisant et principes neutralisés

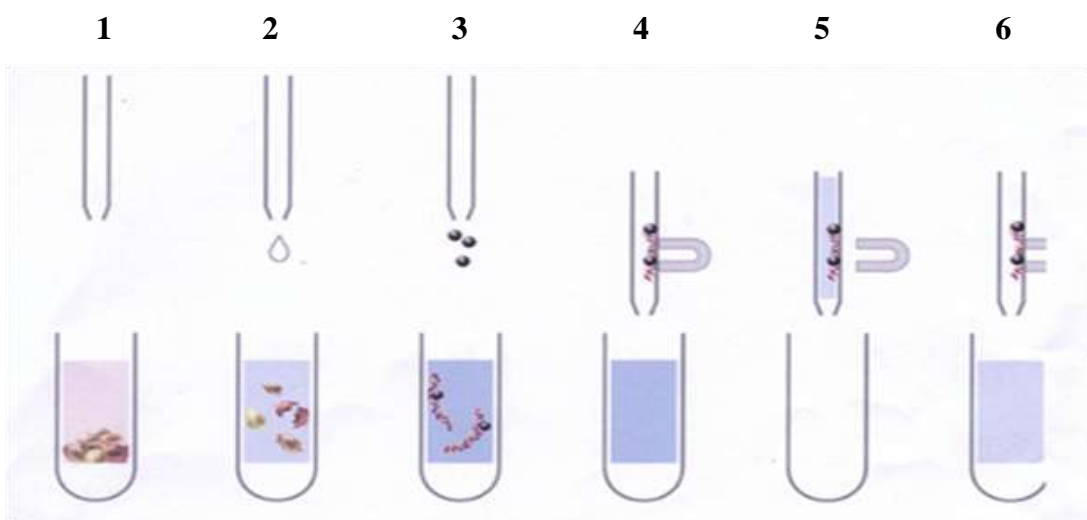
<u>Composition</u>	<u>Quantité en g/L de neutralisant préparé</u>	<u>Désinfectants neutralisés</u>
Lécithine d'œuf	3	Ammonium quaternaire, éthanol, phénols
Tween 80	30	Ammonium quaternaire, éthanol, phénols, aldéhydes
L-Histidine	1	Aldéhydes, phénols
Thiosulfate de sodium Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -5H <sub>2</sub> O	7,8	Halogènes, phénols
Phosphate disodique Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O	100,8	Rôle de tampon

# ANNEXE 5

# Protocole d'extraction d'ADN à l'aide du « MagNa Pure LC DNA Isolation Kit III »

## Principe du test :

La procédure d'isolement est basée sur une technologie de billes magnétiques. Les échantillons sont lysés par incubation dans un tampon contenant des sels chaotropiques et de la protéinase K. Des particules en verre magnétisées sont ajoutées et l'ADN se fixe à leur surface. Les substances non fixées sont enlevées par l'intermédiaire de plusieurs lavages, puis l'ADN est élué. Les étapes du principe de l'isolement de l'ADN sont les suivantes :



1. L'échantillon est placé dans les puits de la cartouche.
2. Le tampon de lyse et de fixation est ajouté à l'échantillon, favorisant la lyse cellulaire complète et le re-largage des acides nucléiques. Les nucléases sont dénaturées. La protéinase K dénature les protéines.
3. L'ADN se fixe à la surface de silice des billes grâce aux conditions chaotropiques, à l'isopropanol et à la haute stringence ionique du tampon de lyse et d'accrochage
4. Les billes sur lesquelles l'ADN s'est fixé sont magnétiquement séparées du reste de l'échantillon lysé
5. Les billes sont lavées plusieurs fois avec du tampon de lavage pour éliminer les protéines (nucléases), membranes, inhibiteurs de la PCR, et pour réduire enfin la concentration en sel.
6. Les billes sont magnétiquement séparées du tampon de lavage contenant les débris résiduels.

### **Précautions :**

- Particules MGP : La suspension de particules magnétiques doit être vortexée. Mélanger immédiatement avant usage afin d'avoir une suspension homogène.
- Protéinase K : Reconstituer chaque flacon en ajoutant 1,2 mL de tampon d'élution et bien mélanger. Une fois reconstitué, le produit est stable pendant 1 mois de 2 à 8°C ou 1 an entre -15 et -25°C.

Ne pas utiliser un tampon qui contient un précipité : Si un précipité est visible, placer le flacon à 37°C et mélanger de temps en temps jusqu'à dissolution complète du précipité.

### **Préparation des échantillons** (pour l'extraction simultanée de 32 échantillons maximum) :

- Allumer 2 bains secs : l'un à 65°C et l'autre à 95°C (15 à 30 min avant utilisation)
- Allumer l'appareil MagNA Pure (chauffage des blocs) et le système informatique
- Ajouter aux 100 µL de PBS 1X 130 µL de tampon de lyse et bien mélanger.
- Ajouter 20 µL de protéinase K et mélanger délicatement.
- Incuber pendant 45 min à 65°C. Mettre des cavaliers pour éviter que les tubes ne s'ouvrent.
- Incuber ensuite les échantillons à 95°C pendant 10 min.
- Centrifuger brièvement les tubes (centrifugeuse de pailasse) afin de collecter la totalité de l'échantillon au fond du tube et procéder au transfert des échantillons dans la cartouche MagNA Pure LC « Sample cartridge » (support plastique contenant 4x8 puits).

L'extraction et la purification de l'ADN sont réalisées par l'automate.

# ANNEXE 6

## Composition du bouillon de congélation

### Domaine d'utilisation:

Ce bouillon est utilisé pour la congélation des souches bactériennes à - 80°C

### Composition :

Extrait de viande de boeuf.....	3 g
Tryptone digestat pancréatique de caséine .....	5 g
Glycérol .....	150 g
Eau .....	qsp 1 l
pH .....	6,9 ± 0,2

Barème de stérilisation : 121°C / 15 min.

# ANNEXE 7



# Fluorimètre Qubit

## Quant-iT™ Assays Abbreviated Protocol

**IMPORTANT:** Ensure all assay reagents are at room temperature before you begin.

1. Set up your tubes: you'll need two tubes for the standards (three for the protein assay) and one tube for each of your samples.
2. Make the Quant-iT™ **Working Solution** by diluting the Quant-iT™ reagent 1:200 in Quant-iT™ buffer. 200  $\mu\text{L}$  of **Working Solution** are required for each sample and standard.
3. Prepare Assay Tubes according to the table below.

	Standard Assay Tubes	User Sample Assay Tubes
Volume of <b>Working Solution</b> (from step 2) to add	190 $\mu\text{L}$	180-199 $\mu\text{L}$
Volume of <b>Standard</b> (from kit) to add	10 $\mu\text{L}$	—
Volume of <b>User Sample</b> to add	—	1–20 $\mu\text{L}$
Total Volume in each Assay Tube	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

4. Vortex all tubes for 2–3 seconds.
5. Incubate the tubes for 2 minutes at room temperature (15 minutes for the Quant-iT™ protein assay).
6. Read tubes in Qubit™ fluorometer.
7. Multiply by the dilution factor (see Manual) to determine concentration of your original sample. Alternatively, choose **Calculate sample concentration** to have the Qubit™ fluorometer perform this multiplication for you.

\* Use only thin-wall, clear 0.5 mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit™ assay tubes (500, Invitrogen Cat. no. Q32856) or Axygen PCR-05-C tubes ( $\checkmark$ WR, part number 10011-830).

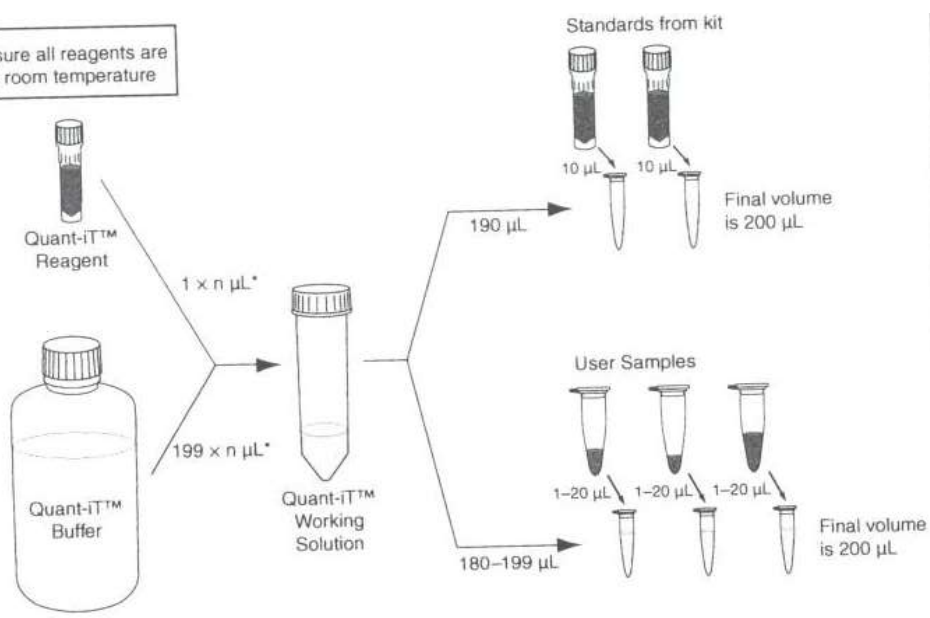
[probes.invitrogen.com/qubit](http://probes.invitrogen.com/qubit)

Molecular Probes™  
Invitrogen detection technologies

invitrogen™

[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

Ensure all reagents are at room temperature



\* where n = number of Standards plus number of Samples

©2007 Invitrogen Corporation. All rights reserved. This products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see Invitrogen catalog or www.invitrogen.com)



Vortex all assay tubes for 2-3 seconds

Incubate for 2 hr Quant

Read fluoro

NOTICE TECHNIQUE FABRICANT	visa	Rév:00
	Vaticé par S. Derzelle	Date: 09/04/03
	AFSSA LERQAP	NTF. PBMV. 61

# ANNEXE 8

# Protocole d'extraction de l'ADN d'un gel polyacrylamide selon le kit « Qiaex II Polyacrylamide Gel Extraction »

## QIAEX II Polyacrylamide Gel Extraction Protocol

- Notes:**
- The yellow color of Buffer QX1 indicates a pH  $\leq 7.5$ .
  - Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
  - A heating block or water bath at 50°C is required.
  - 3M sodium acetate, pH 5.0, may be necessary.
  - All centrifugation steps are at maximum speed ( $\approx 10,000 \times g$ ,  $\approx 13,000$  rpm) in a conventional, table-top microcentrifuge.
  - Prepare diffusion buffer: 0.5 M ammonium acetate; 10 mM magnesium acetate; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.1% SDS.
  - A disposable plastic column or a syringe barrel containing either a Whatman® GF/C filter or packed, siliconized glass wool will be required for each extraction.

1. **Excise the gel slice containing the DNA band with a clean, sharp scalpel.**  
Minimize the size of the gel slice by removing excess polyacrylamide.
2. **Weigh the gel slice. Add 1–2 volumes of diffusion buffer to 1 volume of gel (i.e., 100–200  $\mu$ l for each 100 mg of gel).**
3. **Incubate at 50°C for 30 min.**
4. **Microcentrifuge the sample for 1 min.**
5. **Carefully remove the supernatant using a pipet or a drawn-out Pasteur pipet. Pass the supernatant through a disposable plastic column or a syringe containing either a Whatman GF/C filter or packed, siliconized glass wool to remove any residual polyacrylamide.**
6. **Calculate the approximate volume of the recovered supernatant.**
7. **For DNA fragments <100 bp, add 6 volumes of Buffer QX1 to 1 volume of sample. Otherwise, add 3 volumes Buffer QX1. Check that the color of the mixture is yellow. If the color of the mixture is orange or purple, add 10  $\mu$ l 3M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color should turn to yellow.**  
  
The adsorption of DNA to QIAEX II particles is only efficient at pH  $\leq 7.5$ . Buffer QX1 now contains a pH indicator which is yellow at pH  $\leq 7.5$ , and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of optimal pH for DNA-binding.
8. **Resuspend QIAEX II by vortexing for 30 sec.**
9. **Add 10  $\mu$ l of QIAEX II and mix. Incubate at room temperature for 10 min. Vortex every 2 min to keep QIAEX II in suspension.**
10. **Centrifuge the sample for 30 sec and remove supernatant.**
11. **Wash the pellet twice with 500  $\mu$ l of Buffer PE.**
12. **Air-dry the pellet for 10–15 min or until the pellet becomes white.**  
Do not vacuum dry, as this may cause overdrying. Overdrying the QIAEX II pellet may result in decreased elution efficiency.
13. **To elute DNA, add 20  $\mu$ l of 10 mM Tris-Cl, pH 8.5, or H<sub>2</sub>O and resuspend the pellet by vortexing. Incubate for 5 min at room temperature.**  
Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH is within this range, and store DNA at  $-20^{\circ}\text{C}$  as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.
14. **Centrifuge for 30 sec. Carefully transfer the supernatant into a clean tube.**  
The supernatant now contains pure DNA.
15. **Optional: repeat steps 13 and 14 and combine the eluates.**  
A second elution step will increase the yield by approximately 10–15%.

# ANNEXE 9

# BACTERIAL PERSISTENCE AND TRANSIENT SURVIVAL ON OPEN SURFACES

Carpentier Brigitte<sup>1\*</sup>, Khamisse Elissa<sup>1,2</sup>, Firmesse Olivier<sup>1</sup>, Christeans Souad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), 23 avenue du Général de Gaulle, F-94700 Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup>Association pour le Développement de l'Institut de la Viande (ADIV), 10 rue Jacqueline Auriol, ZAC des Gravanches, 63100 Clermont Ferrand, France

\*e-mail: Brigitte.Carpentier@anses.fr

## Abstract

It is now well admitted that cleaning and disinfection (C&D) do not allow the removal of all micro-organisms from open surfaces even when very aggressive procedures are applied and even on very hygienic materials as stainless steel. We observed in a meat site on a stainless steel piece of equipment after C&D that one to 10 CFU/cm<sup>2</sup> were detected on agar medium while viable but not culturable cells (detected by ethidium monoazide real time qPCR) ranged from 10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> and total cells (detected by qPCR) ranged from 10<sup>3</sup> to 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>. When considering pure bacterial cultures, a subpopulation of bacteria adheres on surfaces and from this subpopulation a fraction resists to disinfection or shows high attachment strengths. However, those laboratory findings were obtained with low concentration of cleaning and disinfecting products without mechanical action as applied on processing surfaces. By contrast, when applying industrial procedure on materials experimentally contaminated, it is difficult to find surviving CFUs on surfaces.

Such conflicting observations allow raising several hypotheses to help understanding why cells are not eliminated from food processing surfaces in food industry premises or equipment. Here we will discuss two possible phenomena: persistence and transient survival.

**Key words:** Cleaning, disinfection, bacterial persistence, harborage sites.

## 1. Introduction

It is now well admitted that cleaning and disinfection (C&D) do not allow the removal of all micro-organisms from open surfaces (Gibson *et al.* [1], Mettler and Carpentier [2]).

Overall industrial C&D allows around 1 decimal reduction of the aerobic mesophilic culturable

bacteria (Gibson *et al.* [1]) and this raises the question of whether bacteria remaining after C&D are persistent or transient survivors. We will here first describe laboratory studies aiming at understanding the behavior of micro-organisms on surfaces. Field results giving some element to answer our question will then be presented.

## 2. Behavior of microorganisms on surfaces

### Population heterogeneity

When a bacterial suspension comes into contact with a surface, only some of the cells are able to adhere. For instance, after deposition of a bacterial suspension of *Listeria monocytogenes* on a glass slide the number of attached cells stopped increasing after 2.5 hours and then accounted for only 1% of the suspended cells (Sommer [3]). When an attached community of bacterial cells is submitted to C&D only a few of them are able to resist (Figure 1). This fraction of surviving cells is smaller when disinfectant concentration increases and is greater for old attached communities (Frank and Koffi [4]). Such fractions also exist in bacterial suspensions but are markedly smaller which is why attached cells are considered to be more resistant than suspended cells including cells suspended after detachment. This minority subpopulation consists of cells which are referred to as "persister cells" by Lewis [5]. Persister cells are phenotypic variants which appear frequently but in an unpredictable manner, which means a great variability between results from independent experiments for the number of cells surviving disinfection. Consequently there has to be a sufficiently high number of initial attached cells for there to be any chance of finding "persister cells" after disinfection when applied at the recommended concentrations (Marouani-Gadri *et al.* [6]). The initial number of cells, necessary to ensure any certainty of some cells surviving, varies greatly according to

the bacterial species and strains and depends on the attachment strength and intrinsic resistance to disinfection of the microbial strain considered. Heterogeneity of subpopulation is also observed when considering attachment strength of bacteria as illustrated by Figure 2. We showed that culturable cells surviving disinfection appear to be both highly resistant and highly "sticky" to surfaces (Midelet *et al.* [7]). All those results show that studying the behavior of a suspended bacterial population, as done for instance by the European suspension test to assess the efficacy of disinfectants, gives a view quite different from what is really happening on industrial surfaces.

### Experimental achievement of a bacterial persistence

When submitting a surface contaminated once with a bacterial culture to a daily chemical treatment with cleaning and disinfecting products and a daily soiling with organic matter, it is possible to make the bacterial strain persist on the surface (Marouani-Gadri *et al.* [6] and Peneau *et al.* [8]). Such studies have been conducted with C&D product(s) applied at concentration lower than those recommended and without mechanical action to model what happens in hard-to-reach places. As regards pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *L. monocytogene*, the microbial load first begins to decrease but after a few days in some conditions (sufficient initial bacterial load, sufficient temperature) bacterial counts does increase. This is the result of an increase in resistance to bactericidal concentration of disinfectant and of bacterial adaptation allowing growth to resume and to produce more cells than the amount removed by the chemical treatment applied (Carpentier and Cerf [9]).

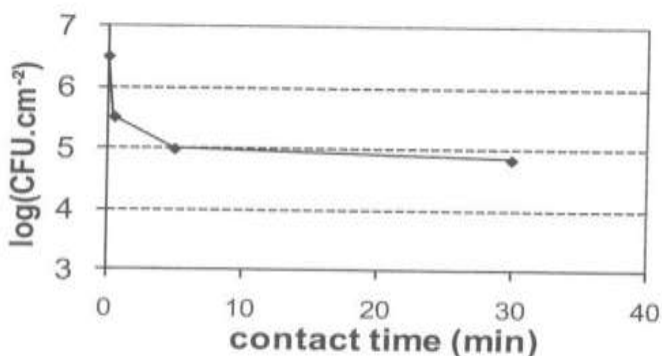


Figure 1. Survival of *Listeria monocytogenes* attached cells submitted to 0.001% didecyl-dimethyl-ammonium chloride (Carpentier and Chassaing, unpublished results)

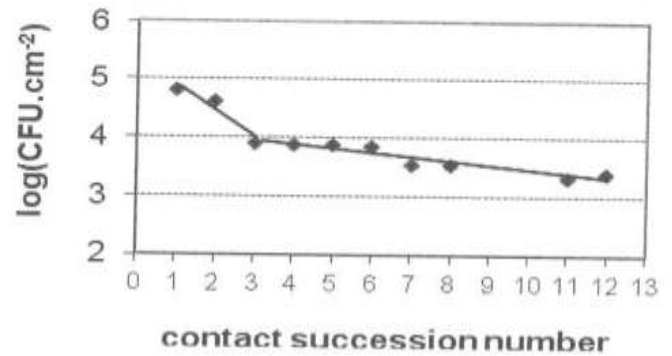


Figure 2. Detachment by contact with an agar medium of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm (Midelet *et al.* [7])

### Field study

Three surveys of the bacterial ecosystem of food contact surfaces in a cutting room of a bovine meat processing site were conducted in 2009 and 2010. After very aggressive C&D procedures, we counted 1 to 10 CFU/cm<sup>2</sup> on stainless steel and a mean of 400 CFU/cm<sup>2</sup> on a conveyor belt made of polyvinyl chloride. Three hundred and twenty isolates were identified showing a diversity of more than 50 genera and confirming the dominance, already described in the literature, of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* genera among culturable bacteria. Isolates from those two genera were then sub-typed by Rep-PCR to detect potentially persistent strains. Thirty six rep-PCR types were identified among the 41 *Pseudomonas* isolates but no types were found at more than one survey, suggesting that none of them were persistent in the processing plant. By contrast, among the 37 *Staphylococcus* isolates 18 rep-PCR types were identified. Three types were found in two surveys either at the second and third survey or at the first and second survey or at the first and third survey. This suggests that only the latter strain among those isolated persists on a long term basis in the processing plant. This study shows that dominant bacteria from the processing surfaces of the meat plant studied are not an "in house" flora as previously thought and that transient survival is there far more common than persistence.

### 3. Conclusions

Presence of bacteria after C&D is likely due to the presence of a low number of cells that are highly resistant to detachment and to disinfectants. However, when C&D are correctly applied, those cells are progressively eliminated and persistence does not occur frequently. Therefore we assume that the population that resides on surfaces is likely composed of strains that are constantly renewed.

#### 4. References

- [1] Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E. and Holah J.T. (1999). *Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms*. J. Appl. Microbiol., 87:41-8.
- [2] Mettler E., and Carpentier B. (1998). *Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises*. J. Food Prot., 61:57-65.
- [3] Sommer P. (1999). *Modification des équilibres microbiens au sein de biofilms colonisant les ateliers industriels fromagers*. Thèse d'Université. Université de Bourgogne.
- [4] Frank J.F. and Koffi R.A. (1990). *Surface-adherent growth of Listeria monocytogenes is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat*. Journal of Food Protection, 53:550-554.
- [5] Lewis K. (2005). *Persister cells and the riddle of biofilm survival*. Biochemistry (Mosc.), 70:267-74.
- [6] Marouani-Gadri N., Firmesse O., Chassaing D., Sandris-Nielsen D., Arneborg N., and Carpentier B. (2010). *Potential of Escherichia coli O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment*. International Journal of Food Microbiology, 144:96-103.
- [7] Midelet G., Kobilinsky A. and Carpentier B. (2006). *Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of Listeria monocytogenes from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food*. Appl. Environ Microbiol., 72:2313-21.
- [8] Peneau S., Chassaing D. and Carpentier B. (2007). *First Evidence of Division and Accumulation of Viable but Nonculturable Pseudomonas fluorescens Cells on Surfaces Subjected to Conditions Encountered at Meat Processing Premises*. Appl. Environ Microbiol., 73:2839-46.
- [9] Carpentier B. and Cerf O. (2011). *Review – Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises*. International Journal of Food Microbiology, 145:1-8.



ARTICLE SOUMIS A *INTERNATIONAL*  
*JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*

1 - Running title: Cleaning and disinfection at a beef processing plant

2

3 **Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and**  
4 **culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef**  
5 **processing plant**

6

7 Elissa Khamisse<sup>1,2</sup>, Olivier Firmesse<sup>1</sup>, Souad Christieans<sup>2</sup>, Danielle Chassaing<sup>1</sup> and Brigitte  
8 Carpentier<sup>1\*</sup>.

9 *<sup>1</sup>Laboratory of Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health &*  
10 *Safety (ANSES), 23 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France*

11

12 *<sup>2</sup> The French Technical Centre for Meat (ITAI-ADIV), ZAC des Gravanches, 10, rue Jacqueline Auriol*  
13 *63039 Clermont-Ferrand Cedex 02, France*

14

15 Keywords: cleaning and disinfection, viable but non-culturable, EMA-qPCR, meat  
16 processing, bacterial attachment strength

17

18

19

20 \* Corresponding author. Tel: +33 1 49 77 26 46; Fax: +33 1 49 77 46 66; e-mail address:

21 [brigitte.carpentier@anses.fr](mailto:brigitte.carpentier@anses.fr)

22

## 23 **ABSTRACT**

24 We assessed the impact of industrial cleaning and disinfection (C&D) on colony-forming  
25 units (CFUs), viable (culturable and viable but non-culturable) cells and on total cells (viable  
26 and dead cells). Bacterial loads on polyvinyl chloride (PVC) and stainless steel surfaces in a  
27 cutting room at a beef processing plant were determined before and after C&D by real-time  
28 PCR to quantify cells from successive swabs from surfaces with or without an ethidium  
29 monoazide pre-treatment and by CFU counts on tryptone soy agar. Agar contact plates were  
30 also applied after C&D for comparison. Before C&D, total cells reached 5.4 and 4.7 log  
31 cells/cm<sup>2</sup>, viable cells 4.0 and 4.4 log cells/cm<sup>2</sup> and CFUs 3.1 and 2.9 log CFU/cm<sup>2</sup> on PVC  
32 and stainless steel surfaces, respectively. Although C&D left surfaces visually clean, it did not  
33 lead to a significant reduction in total cells. Significant reductions were only observed on  
34 PVC for CFUs: 0.8 log and on stainless steel surfaces for viable cells and CFUs: 0.8 and 1.5  
35 log, respectively. Our results show that CFUs were both more easily detached and killed on  
36 stainless steel surfaces than on PVC surfaces. Other important results include the following  
37 observations: 1) a single swabbing detached only between 2 and 27% of the actual bacterial  
38 load; 2) after C&D, the difference between the actual culturable population and the one  
39 assessed by one agar contact plate was 1.9 and 2.7 log CFU/cm<sup>2</sup> on PVC and stainless steel  
40 surfaces, respectively.

## 41 **1 INTRODUCTION**

42 Cleaning and disinfection (C&D) are among the most important hazard control measures in  
43 the meat industry, it is thus of prime importance to assess their efficacy. However, this is a  
44 difficult task because C&D cannot remove all microbial cells present on open surfaces  
45 (Bagge-Ravn *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 1999; Mettler and Carpentier, 1998). Efficacy of  
46 C&D can be assessed by agar contact plating, a convenient and frequently used method that  
47 nevertheless underestimates CFU counts on surfaces (Patterson, 1971). Swabbing surfaces to  
48 detach microbial cells for quantification is more accurate, but does not remove all cells  
49 (Oulahal-Lagsir *et al.*, 2000; Richard, 1980). Efficiency of swabbing depends on the operator,  
50 the swabbing material, the microbial species and the history of the attached cells. Midelet and  
51 Carpentier (2002) showed that one swabbing detached 97% of the CFUs of a one-day  
52 *Pseudomonas putida* biofilm grown on stainless steel. In contrast, an experiment conducted  
53 on *Pseudomonas fluorescens* biofilms grown on polyvinyl chloride (PVC) showed that  
54 swabbing detached only 2% of the CFUs that had survived a chlorine treatment (Asséré *et al.*,  
55 2008). Another concern regarding the hygienic quality of food-contact surfaces is the  
56 presence of viable but non-culturable (VBNC) cells. The VBNC state may occur in stress

57 conditions, such as starvation and osmotic stress (Jorgensen *et al.*, 1994), temperature changes  
58 (Chen and Chang, 2010) and disinfection (Allegra *et al.*, 2008; Leriche and Carpentier, 1995),  
59 and numerous pathogenic bacteria can enter a VBNC state (Oliver, 2005). It has been  
60 suggested that the VBNC state is a survival strategy and various factors may promote  
61 resuscitation (Oliver, 2010); there is therefore a need for better knowledge of VBNC  
62 populations.

63 The aim of the present study was to assess the impact of industrial C&D not only on  
64 culturable cells, as classically done, but also on viable cells, which include both culturable and  
65 VBNC cells, and on total cells, i.e. viable and dead cells, using a method adapted from  
66 Veulemans *et al.* (1970). This method, whose principle has been described by Midelet *et al.*  
67 (2002), assesses the numbers of attached cells more accurately than a single swabbing. It  
68 consists in successively swabbing the same area using a new sterile gauze pad for each swab.  
69 Plotting the logarithm of the number of cells detached by each swab against the sequence  
70 number of the swab gives the number of microorganisms present on equipment surfaces.  
71 Furthermore, the slopes of these detachment curves can be used to assess the microorganism  
72 attachment strength (Eginton *et al.*, 1998). We chose to study the flat surfaces of two pieces of  
73 equipment from the same cutting room: a conveyor belt made of polyvinyl chloride (PVC)  
74 and skinning machines made of stainless steel. Conveyor belts are food-contact surfaces that  
75 can be heavily contaminated (Lindsay *et al.*, 1996). Stainless steel has been shown to be more  
76 easily disinfected than plastic conveyor belts (Krysinski *et al.*, 1992) and, since it is highly  
77 resistant to chemical and heat shock, is widely used in food processing equipment (Rossoni  
78 and Gaylarde, 2000).

79 Several alternatives have been proposed to enumerate viable bacteria, including culturable  
80 and VBNC bacteria. These methods, which require enumeration under a microscope or flow  
81 cytometry, include (1) the direct viable count (Kogure *et al.*, 1978) to assess the ability of  
82 cells to elongate in presence of an antibiotic that inhibits DNA gyrase; (2) the live/dead  
83 bacterial viability kit (Boulos *et al.*, 1999) based on the use of propidium iodide, a membrane  
84 integrity indicator; (3) the ability to reduce 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)  
85 (Jorgensen *et al.*, 1994); (4) and more recently, real-time PCR (qPCR) in combination with  
86 ethidium bromide monoazide (EMA) (Hein *et al.*, 2007; Nocker *et al.*, 2006; Rudi *et al.*,  
87 2005) or propidium monoazide (PMA) (Chang *et al.*, 2010; Chen and Chang, 2010). EMA  
88 and PMA penetrate bacterial cells with compromised membranes — i.e. thus considered dead  
89 cells — and covalently bind to double-stranded DNA upon exposure to intense visible light.  
90 DNA complexed with EMA cannot be detected and therefore only cells with intact

91 membranes, considered as viable cells (culturable or VBNC), can be amplified by PCR.  
92 However, enumeration methods differ in their cell count estimations, reflecting the different  
93 physiological states among viable cells (Roszak and Colwell, 1987; Yu and McFeters, 1994).  
94 However, although it would have been interesting to use different methods to assess viable  
95 counts, we choose EMA-qPCR since a large number of samples can be readily treated. To  
96 quantify either all bacterial cells by qPCR or all viable cells by EMA-qPCR, we used  
97 universal eubacteria primers that target conserved regions on 16S rRNA gene (Bach *et al.*,  
98 2002; Lyons *et al.*, 2000). Additionally, we sampled surfaces after C&D using agar contact  
99 plates to assess how much CFU counts are underestimated when compared to the multiple  
100 swabbing method.

## 101 **2 MATERIALS AND METHODS**

102 A meat cutting room at a beef-processing plant was visited in November 2009 and May 2010.  
103 This room undergoes a four-step cleaning and disinfection (C&D) regimen once a day. First,  
104 the surfaces are pre-washed by scraping and then washed with 45°C water using a medium-  
105 pressure jet. The second, foam-cleaning step involves the application of a chlorinated alkaline  
106 solution (Deptal MCL 3%, Hypred, Dinard, France) to the surfaces for 20 min. The surfaces  
107 are then rinsed with a medium-pressure water jet. The final step of disinfection includes the  
108 use of a glutaraldehyde and quaternary ammonium compound-based product (Deptil G4 2%,  
109 Hypred).

### 110 *2.1 Surface swabbing*

111 Surface samples were taken from skinning machines made of stainless steel and a conveyor  
112 belt made of polyvinyl chloride (PVC). The stainless steel surfaces were smooth, but there  
113 were many scratches visible on the PVC conveyor belt. In all cases, 566 cm<sup>2</sup> flat and  
114 continuous areas were sampled using a template. Sampled areas were swabbed with sterile  
115 gauze pads impregnated with ATL<sup>®</sup> polyvalent disinfectant neutraliser (containing per litre:  
116 3 g egg lecithin, 30 g tween 80, 1 g L – histidine, 7.8 g sodium thiosulfate [Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - 5H<sub>2</sub>O]  
117 and 100.8 g disodium phosphate [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 12H<sub>2</sub>O]) placed in a Stomacher bag (Humeau,  
118 La Chapelle-sur-Edre, France) and stored until analysis in an insulated cool box with ice  
119 packs. For the PVC conveyor belt, 15 successive swabs were taken on two areas using a new  
120 sterile gauze pad for each swab. For the stainless steel skinning machines, four areas were  
121 sampled with 10 successive swabs. Only the 10 first swabs taken on PVC were used to  
122 calculate the bacterial populations as explained below so that comparisons between PVC and  
123 stainless steel are made using the same methodology. More stainless steel surfaces than PVC  
124 surfaces were sampled because a preliminary sampling survey showed greater variability on

125 stainless steel. Surface swabbing was performed by the same operator, on distinct areas before  
126 and after C&D.

127 After sampling surfaces, Stomacher bags containing gauze pads were sealed, refrigerated and  
128 processed within 10 h of sample collection. Then, 25 ml of 1 g/L peptone water (VWR,  
129 Fontenay sous Bois, France) were added to the gauze pads. Samples were pummelled for 1  
130 min in a Stomacher Lab-Blender (AES Laboratoire, Combourg, France) before quantifying  
131 the bacterial populations.

## 132 2.2 Enumeration of colony-forming units (CFUs)

133 Bacterial suspensions were plated on tryptone soy agar (TSA; Oxoid, Dardilly, France) using  
134 a Spiral plater (Spiral System DS, Interscience, Saint Nom La Breteche, France). For swabs  
135 taken before C&D, plates were incubated for 6 days at 25°C. For swabs taken after C&D, a 6-  
136 day incubation time was not sufficient and incubation was thus carried out for a total of 14  
137 days. For these longer incubation times, plates were placed in a bag with sterile paper  
138 moistened with sterile water to avoid agar dehydration during incubation.

## 139 2.3 Assessment of total and viable populations

140 Duplicate 1 ml volumes of sample fluids were centrifuged at 15,000 × g for 3 min. The  
141 supernatant was carefully discarded and the cell pellet was stored at -25°C prior to subsequent  
142 laboratory analysis. The first 1 ml sample underwent EMA treatment no later than 48 h after  
143 freezing at -25°C (we previously checked on several *Staphylococcus* and *E. Coli* strains that  
144 bacterial quantification by EMA-qPCR was not changed after a freeze storage period of 8  
145 days); the second 1 ml sample was used to assess total cells.

### 146 2.3.1 EMA treatment and light irradiation

147 Ethidium monoazide (EMA, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was diluted in molecular  
148 water (Eppendorf, France) to a concentration of 5 mg/ml and stored at -25°C until use. Cell  
149 pellets were resuspended in sterile water and EMA was added to samples at a final  
150 concentration of 100 µg/ml (Rudi *et al.*, 2005). The samples were then incubated in the dark  
151 at room temperature for 5 min and exposed to a light source (a 650 W halogen lamp, Osram  
152 SLG 1000) for 2 min with their lids off. Prior to light exposure, the tubes were placed on ice  
153 to minimise any temperature increases in the samples. Finally, EMA-treated cells were  
154 centrifuged at 15,000 ×g for 3 min and the supernatant eliminated.

### 155 2.3.2 DNA extraction

156 DNA was extracted from EMA-treated and non-treated samples using the Magna Pure LC  
157 DNA Isolation Kit III (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the  
158 manufacturer's instructions.

### 159 2.3.3 Real-time PCR (qPCR)

160 Reactions were performed with a 96-well plate in a LightCycler 480 instrument (Roche  
161 Diagnostics). The primers F\_Bact1369 (5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3') and  
162 R\_Prok1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Suzuki *et al.*, 2000) were used to  
163 amplify the nearly full-length 16S ribosomal RNA gene. The qPCR mixture consisted of a  
164 total of 25 µl and included SYBR-Green® 2X Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 µM of  
165 each forward and reverse primer and 10 µl of the appropriate DNA dilution. Samples were  
166 run in duplicate wells and cycling conditions were as follows: initial denaturation for 10 min  
167 at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 1 min at 60°C.

### 168 2.3.4 Generation of qPCR standard curve with bacterial genomic DNA

169 Standard curves were generated by extracting genomic DNA from 33 species belonging to the  
170 dominant bacterial flora previously isolated on TSA from the same cutting room (Table 1).  
171 Each strain was cultured on TSA slants for 24 h at 25° C. The cultures were then suspended in  
172 5 ml of peptone water and the concentration of resulting suspensions was adjusted to  
173 approximately 10<sup>8</sup> CFU/ml using optical density measurements at 600 nm. The number of  
174 CFUs was determined after spreading on TSA and incubation at 25°C for 72 h. qPCR was  
175 performed on serial dilutions (1:10 to 1:10000) of genomic DNA from each species as  
176 described above. A proportionality relationship was produced by plotting the C<sub>t</sub> value against  
177 the logarithm CFU number (Lyons *et al.*, 2000). The regression line calculated from all the  
178 plots obtained was used as the standard reference line. This standard regression line coincided  
179 with the reference line of one of the strains, *Pseudomonas* sp. 09EMPF054, which was then  
180 used as a positive control in all PCR runs to quantify cells populations.

### 181 2.4 Assessment of attached bacterial populations and their attachment strengths

182 Detachment curves, generated by plotting the logarithm of detached cells against the swab  
183 sequence number, were obtained for total, viable and CFU populations (Figure 1). Although  
184 good fits to biphasic model were sometimes obtained by the curve-fitting tool GInaFiT  
185 version 1.5 available at <https://cit.kuleuven.be/biotec/> (Geeraerd *et al.*, 2005), this was not  
186 always true and we decided to treat all the curves as monophasic ones. The slope of each  
187 detachment curve was multiplied by -1 (k), and used to assess the bacterial population by  
188 applying the following equation adapted from Veulemans *et al.* (1970) and Midelet and  
189 Carpentier (2002):

$$\sum_{n=1}^{n \rightarrow \infty} N_n = \frac{N_1}{1 - 10^{-k}}$$

190 Where *n* is the swab sequence number, N<sub>n</sub> the number of cells detached on swab *n*.

191 Nineteen of the 70 detachment curves showed slightly positive slopes with a median value of  
192 0.0085. To assess bacterial populations using the Veulemans *et al.* (1970) equation, these  
193 slopes were substituted with the negative slope that was the closest to zero for each of the four  
194 studied situations (PVC before and after C&D, stainless steel before and after C&D). In two  
195 cases (stainless steel after C&D), CFUs were detected from only one swab of the 10  
196 successive swabs. In those two cases, it was therefore not possible to calculate the total  
197 number of detached CFUs using the Veulemans equation. As proposed by Egington *et al.*  
198 (1995),  $k$  was also used to assess attachment strengths: the higher  $k$ , the weaker the  
199 microorganism attachment strength to the inert surface.

#### 200 2.5 *Agar contact sampling*

201 During the second survey only, agar contact sampling was performed after C&D on areas  
202 adjacent to those of swabbed surfaces. Contact plates (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre,  
203 France) were filled with approximately 13 ml of TSA (Oxoid, Dardilly, France) containing  
204 10% (v/v) ATL<sup>®</sup> polyvalent neutraliser (Humeau) and were dried for 10 min under laminar  
205 flow. Agar contact plates were applied using a plastic frame perforated with six regularly  
206 spaced 265 cm<sup>2</sup> circular holes allowing the agar contact plate to fit into the frame. This  
207 procedure was used to be ensuring that sampling was done on the same surface area on each  
208 piece of equipment. The agar surface area in contact with the sampling surface was 20 cm<sup>2</sup>.  
209 Samples were taken as described in the ISO 18593 international standard. Two successive  
210 contact plates were applied with a 10 second interval on each area. Agar contact plates were  
211 incubated at 25°C for 6 and 14 days. For these longer incubation times, plates were placed in  
212 a bag with sterile paper moistened with sterile water to avoid agar dehydration during  
213 incubation.

#### 214 2.6 *Statistical analysis*

215 Data were compared using analyses of variance followed by multiple means comparisons,  
216 except for the differences of the log values of total and viable cells and of the log values of  
217 viable cells and CFUs because variances were significantly different according to a Levene  
218 test. In the latter case, we used a non-parametric Kruskal-Wallis tests to compare medians.  
219 Tests were performed with Statgraphics version 3.3 (Sigma Plus, Paris, France). Statistical  
220 significance was evaluated at a P value of  $\leq 0.05$ .

221



## 222 **3 RESULTS**

### 223 *3.1 Microbial load before and after C&D*

224 Before C&D, the total cell count reached 5.4 and 4.7 log cells/cm<sup>2</sup> (Figure 2a), viable cells,  
225 4.0 and 4.4 log cells/cm<sup>2</sup> (Figure 2b) and culturable cells, 3.1 and 2.9 log CFU/cm<sup>2</sup> (Figure  
226 2c) on PVC and stainless steel, respectively. On PVC, C&D did not significantly decrease the  
227 quantity of total cells, viable cells, and CFUs. On stainless steel, C&D significantly reduced  
228 CFUs (Figure 2c) and, to a lesser extent, viable cells (Figure 2b) ( $P \leq 0.01$ ), with a 1.6 log  
229 reduction of CFUs and 0.8 log reduction of viable cells.

230 Difference between total and viable cells and between viable cells and CFUs are the greatest  
231 on stainless steel after C&D (Table 2). C&D significantly affect these differences ( $P \leq 0.007$ )  
232 which reached respectively 1.9 after C&D versus 0.2 before C&D and 2.5 after C&D versus  
233 1.6 before C&D.

### 234 *3.2 Attachment strengths*

235 Attachment strengths assessed by the k value taken from the detachment curves are presented  
236 in Figure 3. On PVC, attachment strengths of total cells (Figure 3a), viable cells (Figure 3b)  
237 and CFUs (Figure 3c) did not significantly change after C&D. In contrast, on stainless steel,  
238 total cells and CFUs' attachment strengths were significantly lower ( $P \leq 0.05$ ) before C&D  
239 than after C&D. Similarly, total cells and CFUs detached by the first swab were higher before  
240 C&D than after C&D on stainless steel: 16% (Figure 3a) and 27% (Figure 3b), respectively.  
241 Finally, CFUs were significantly more easily detached than viable cells ( $P=0.008$ ).

### 242 *3.3 Agar contact plates after C&D*

243 Figure 4a shows two agar contact plates that were applied on PVC after C&D in the same  
244 place 10 s apart and incubated for 6 days. Colonies were visible on both plates, but were not  
245 found in the same locations. Similar observations were made on all other contact plates  
246 applied either on PVC or stainless steel, on which colonies were less numerous. Figure 4b  
247 shows the first six contiguous contact plates after incubation for 14 days. There were two  
248 types of colonies, large colonies already visible after a 6-day incubation (Figure 4a-1  
249 corresponds to top right photograph in Figure 4b) and the small colonies that developed later  
250 on. In contrast, no small colonies appeared on the agar contact plates applied on stainless steel  
251 after a 14-day incubation. On PVC, the mean of the 6-day counts was 1.5 log CFU/cm<sup>2</sup> lower  
252 than the mean of the 14-day counts. Mean counts taken from the Veulemans equation and  
253 means from the first contact plate, both determined after a 14-day incubation, showed  
254 differences of 1.9 and 2.7 log CFU/cm<sup>2</sup> on PVC and stainless steel, respectively. Figure 4 also

255 shows that colonies did not occur in lines which would have correspond to the numerous  
256 scratches visible on the conveyor belt

#### 257 **4 DISCUSSION**

258 In spite of a very aggressive C&D procedure that left surfaces visually perfectly clean, it did  
259 not lead to a significant decrease in total cells whatever the type of material considered.  
260 Stainless steel even showed a slight but non-significant increase in total cells after C&D (5.2  
261 log cells/cm<sup>2</sup>), reaching approximately the same level as on PVC (5.0 log cells/cm<sup>2</sup>). The  
262 results from PVC show only a very slight decrease, 0.4 log cells/cm<sup>2</sup>. This slight decrease  
263 along with the variability of our data precluded statistical significance of any differences that  
264 may actually exist. Such small decreases in total cell counts have also been observed by  
265 Firmesse et al. (unpublished results) with less stringent C&D procedures on a refrigerated  
266 serve-over counter. Although many scratches were visible on the PVC surfaces, the total  
267 counts on PVC and stainless steel after C&D were nevertheless similar. This, along with the  
268 fact that colonies did not occur in obvious lines on agar contact plates, suggests that cells  
269 located in the scratches were not necessarily protected against the aggressive C&D  
270 procedures.

271 Our results show that after C&D on PVC only, 14 day incubation of agar contact plates  
272 recovered 1.5 log more CFUs than a 6 day incubation, although a 5 day incubation at 25°C is  
273 recommended for aerobic bacterial counts in meat (Anonymous, 1992). This result highlights  
274 that precise methodology for enumerating CFUs should be included in criteria established to  
275 test C&D procedures and that the VBNC cell number can be overestimated if incubation  
276 times are too short.

277 The numbers of VBNC cells were high: viable cells were between 1.1 to 2.5 log greater than  
278 CFUs (Table 2). The VBNC state being a response to inimical treatment such as starvation or  
279 disinfection, it was therefore not surprising to detect more viable cells than CFUs. Alliot  
280 (1999) who used the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) method to  
281 count viable cells also observed viable cells in greater numbers than CFUs on surfaces  
282 sampled in cheese factories.

283 The highest differences between total and viable cells and between viable and culturable cells  
284 were observed on stainless steel after C&D showing that proportions of viable cells and  
285 culturable cells within an attached population are depending on both the material and the  
286 sampling moment (before or after C&D). The highest susceptibility of cells on stainless steel  
287 is in line with laboratory results showing a greater efficacy of disinfectants on stainless steel  
288 compared with other materials (Krysinski *et al.*, 1992; Van der Veen and Abee, 2011). The

289 data assessing attachment strength, k value and percentage of cells detached by the first swab,  
290 also showed lower attachment strength on stainless steel before C&D as already shown on  
291 CFUs in laboratory experiments with several bacterial species (Midelet and Carpentier, 2002).  
292 The higher susceptibility of culturable cells to C&D products and their lower attachment  
293 strength on stainless steel explain the extremely low CFU counts after C&D. However CFUs  
294 that had resisted C&D on stainless steel had very high attachment strength, which is again in  
295 line with laboratory results (Midelet *et al.*, 2006) where similar C&D products were used  
296 including a disinfectant containing glutaraldehyde which is a fixative agent.

297 Our results show that the actual culturable population after C&D was more than 100 times  
298 greater than that detected by agar contact plates. However, since colonies formed by two  
299 successive contact plates were not in the same location, it seems that culturable cells on  
300 surfaces are not localized in microcolonies. The higher counts achieved by swabbing could be  
301 explained by the shear forces applied when swabbing are more efficient than the detachment  
302 force exerted by the agar.

303 To conclude, this study demonstrates that C&D hardly affects large, non-culturable, attached  
304 bacterial populations, with equivalent counts on PVC and stainless steel. However, the two  
305 surface types differed with respect to CFUs and, to a lesser extent, viable cells. Bacterial  
306 attachment strengths of CFUs were the lowest on stainless steel before C&D and the  
307 proportion of viable cells in total cell counts and culturable cells in viable cell counts were the  
308 lowest on stainless steel after C&D. This result demonstrates that CFUs are both more easily  
309 detached and more easily killed on stainless steel than on PVC and explains the lower counts  
310 of viable cells and CFUs on stainless steel. As concluded by Firmesse *et al.* (unpublished  
311 results) the poor efficiency of C&D may appear worrying, but it is important to note that the  
312 data obtained here concern the dominant flora, capable of surviving C&D. The present results  
313 do not give any indication to what happens to pathogenic bacteria or other species that are  
314 deposited in small numbers and/or which do not have the potential to strongly attach and  
315 survive and are eliminated by C&D.

## 316 **ACKNOWLEDGMENTS**

317 This work was supported by funds from l'Etablissement National des Produits de  
318 l'Agriculture et de la Mer (FranceAgriMer) as part of the programme for technological  
319 development and from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and the Association de  
320 Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (UMT-TERESA). E. Khamisse is  
321 the recipient of a doctoral fellowship (CIFRE No.795 / 2008) co-financed by the French  
322 Technical Centre for Meat (ITAI-ADIV) and the Association Nationale de la Recherche

323 Technique. The authors are grateful to P. Beaubois for his assistance and to C. Engel-Gautier  
324 for the English correction.

## 325 REFERENCES

326 Allegra, S., Berger, F., Berthelot, P., Grattard, F., Pozzetto, B., Riffard, S. 2008. Use of flow  
327 cytometry to monitor *Legionella* viability. Applied and environmental microbiology  
328 74, 7813.

329 Alliot, M. 1999. Ecologie microbienne des sites industriels fromagers : identification,  
330 caractérisation des flores isolées et étude des facteurs régissant leur implantation. Ph.  
331 D., Institut national agronomique de Paris-Grignon, Paris, France.

332 Anonymous. 1992. NF V 04-506. Viandes et produits à base de viande- Dénombrements des  
333 micro-organismes, méthode par comptage des colonies obtenues à 25°C. .

334 Asséré, A., Oulahal, N., Carpentier, B. 2008. Comparative evaluation of methods for counting  
335 surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or  
336 drying. Journal of Applied Microbiology 104, 1692-1702.

337 Bach, H.J., Tomanova, J., Schloter, M., Munch, J. 2002. Enumeration of total bacteria and  
338 bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental  
339 samples by quantitative PCR mediated amplification. Journal of Microbiological  
340 Methods 49, 235-245.

341 Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L. 2003. The  
342 microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the  
343 microflora during processing and following cleaning and disinfection. International  
344 Journal of Food Microbiology 87, 239-250.

345 Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD®  
346 BacLight (TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of  
347 viable and total bacteria in drinking water. Journal of Microbiological Methods 37, 77-  
348 86.

349 Chang, B., Taguri, T., Sugiyama, K., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H. 2010.  
350 Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective  
351 detection of viable *Legionella* cells. Japanese Journal of Infectious Diseases 63, 119-  
352 123.

353 Chen, N.T., Chang, C.W. 2010. Rapid quantification of viable legionellae in water and  
354 biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. Journal of  
355 Applied Microbiology.

356 Eginton, P.J., Gibson, H., Holah, J., Handley, P.S., Gilbert, P. 1995. Quantification of the ease  
357 of removal of bacteria from surfaces. *Journal of Industrial Microbiology* 15, 305-310.

358 Eginton, P.J., Holah, J., Allison, D.G., Handley, P.S., Gilbert, P. 1998. Changes in the  
359 strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with  
360 disinfectants and cleansing agents. *Letters of Applied Microbiology* 27, 101-105.

361 Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess  
362 non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*  
363 102, 95-105.

364 Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., Holah, J.T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques  
365 used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of*  
366 *Applied Microbiology* 87, 41-48.

367 Hein, I., Schneeweiss, W., Stanek, C., Wagner, M. 2007. Ethidium monoazide and propidium  
368 monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal  
369 real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 71, 336-339.

370 Jorgensen, F., Nybroe, O., Knochel, S. 1994. Effects of starvation and osmotic stress on  
371 viability and heat resistance of *Pseudomonas fluorescens* AH9. *Journal of Applied*  
372 *Bacteriology* 77, 340-347.

373 Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. 1978. A tentative direct microscopic method for counting  
374 living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 415-420.

375 Krysinski, E.P., Brown, L.J., Marchisello, T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on  
376 *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food*  
377 *Protection* 55, 246-251.

378 Leriche, V., Carpentier, B. 1995. Viable but non culturable *Salmonella typhimurium* within  
379 single and binary species biofilms in response to chlorine treatment. *Journal of Food*  
380 *Protection* 58, 1186-1191.

381 Lindsay, D., Geornaras, I., Vonholy, A. 1996. Biofilms associated with poultry processing  
382 equipment. *Microbios* 86, 105-116.

383 Lyons, S.R., Griffen, A.L., Leys, E.J. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas*  
384 *gingivalis* and total bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2362.

385 Mettler, E., Carpentier, B. 1998. Variations over time of microbial load and physicochemical  
386 properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food*  
387 *Protection* 61, 57-65.

388 Midelet, G., Carpentier, B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria*  
389 *monocytogenes*, from various materials to beef. Applied and environmental  
390 microbiology 68, 4015.

391 Midelet, G., Kobilinsky, A., Carpentier, B. 2006. Construction and analysis of fractional  
392 multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria*  
393 *monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food.  
394 Applied and environmental microbiology 72, 2313.

395 Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K. 2006. Comparison of propidium monoazide with  
396 ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal  
397 of DNA from dead cells. Journal of Microbiological Methods 67, 310-320.

398 Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. Journal of Microbiology 43,  
399 93-100.

400 Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic  
401 bacteria. FEMS Microbiol Rev 34, 415-425.

402 Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., Blum, L.J. 2000. Ultrasonic methodology  
403 coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food  
404 processing equipment - validation and application to a dairy factory. J Appl Microbiol  
405 89, 433-441.

406 Patterson, J.T. 1971. Microbiological assessment of surfaces. Journal of Food Technology 6,  
407 63-72.

408 Richard, J. 1980. Observations on the value of a swab technique for determining the  
409 bacteriological state of milking equipment surfaces. Journal of Applied Bacteriology  
410 49.

411 Rossoni, E.M.M., Gaylarde, C.C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic  
412 acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using  
413 epifluorescence microscopy. International Journal of Food Microbiology 61, 81-85.

414 Roszak, D.B., Colwell, R.R. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct  
415 viable count. Applied and Environmental Microbiology 53, 2889-2893.

416 Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S.M., Holck, A.L. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR  
417 in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. Appl  
418 Environ Microbiol 71, 1018-1024.

419 Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA  
420 genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. Applied and  
421 environmental microbiology 66, 4605.

- 422 Van der Veen, S., Abee, T. 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and  
423 *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and  
424 peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology* 144, 421-431.
- 425 Veulemans, A., Jacqmain, E., Jacqmain, D. 1970. Etude d'une méthode simple pour la  
426 détermination du degré de pollution des surfaces et la comparaison du pouvoir  
427 désinfectant de divers produits d'entretien. *Revue des Fermentations et des Industries*  
428 *Alimentaires* 25, 58-65.
- 429 Yu, F., Philip, McFeters, G., A. 1994. Physiological responses of bacteria in biofilms to  
430 disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2462-2466.
- 431  
432

433 **FIGURE LEGENDS**

434 Figure 1: Example of detachment curves for PVC before cleaning and disinfection. Bacterial  
435 populations are expressed as total cells assessed by qPCR, viable cells assessed by EMA-  
436 qPCR, and CFUs.

437  
438 Figure 2: Bacterial populations in terms of total cells assessed by qPCR (a), viable cells  
439 assessed by EMA-qPCR (b) and CFUs (c) before and after cleaning and disinfection. Error  
440 bars represent individual standard deviations, n= 4 for PVC and n=8 for stainless steel. Means  
441 that do not share the same letter are significantly different.

442  
443 Figure 3: Assessment of attachment strength using the percentage of cells detached by the  
444 first swabbing and the k value which is the slope of the detachment curve multiplied by -1.  
445 The higher the value of k, the weaker the microorganism attachment strength to the surface.  
446 Total cells assessed by qPCR (a), viable cells assessed by EMA-qPCR (b) and CFUs (c).  
447 Error bars represent standard deviation, n= 4 for PVC and n=8 for stainless steel. Means of k  
448 values that do not share the same letter are significantly different. Comparisons of mean k  
449 values and mean percentages detached by the first swabbing showed the same significant  
450 differences except for viable cells on stainless steel which were not significantly different in  
451 contrast to k values.

452  
453 Figure 4: (a) Agar contact plate samplings performed on a PVC conveyor belt after cleaning  
454 and disinfection; (1): first agar contact plate, (1): second agar contact plate taken 10 seconds  
455 later at the same location as the first one. Plates were incubated for 6 days at 25°C. (b) Six  
456 contiguous agar contact plates after application on a PVC conveyor belt after cleaning and  
457 disinfection and incubation at 25°C for 14 days.



458 Table 1: Strains belonging to the dominant flora of the studied meat cutting room used to  
 459 establish the standard reference line for qPCR.

Genus	Strain
<i>Acinetobacter sp.</i>	09EMPF-9, 09EMPF-50
<i>Aeromonas sp.</i>	09EMPF-74
<i>Arthrobacter sp.</i>	09EMPF-10
<i>Brochothrix sp.</i>	09EMPF-21
<i>Carnobacterium sp.</i>	09EMPF-20
<i>Chryseobacterium sp.</i>	09EMPF-8, 09EMPF-24
<i>Corynebacterium sp.</i>	09EMPF-15, 09EMPF-68
<i>Dermacoccus sp.</i>	09EMPF-7
<i>Kocuria sp.</i>	09EMPF-28
<i>Massilia sp.</i>	09EMPF-48
<i>Microbacterium sp.</i>	09EMPF-19, 09EMPF-36
<i>Paracoccus sp.</i>	09EMPF-43
<i>Pseudomonas sp.</i>	09EMPF-40, 09EMPF-49, 09EMPF-54; 09EMPF-71, 09EMPF-87, 09EMPF-90
<i>Psychrobacter sp.</i>	09EMPF-14
<i>Rhodococcus sp.</i>	09EMPF-44
<i>Rothia sp.</i>	09EMPF-85
<i>Sejongia sp.</i>	09EMPF-75
<i>Serratia sp.</i>	09EMPF-64
<i>Sphingobacterium sp.</i>	09EMPF-23
<i>Staphylococcus sp.</i>	09EMPF-11, 09EMPF-88
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	09EMPF-76

460 09EMPF: 09 indicates the year of isolation (2009) and EMPF stands for the name of one of  
 461 the teams involved in the study “Ecophysiologie Microbienne des Procédés de Fabrication”.  
 462

463 Table 2: Median differences between log values of total cells assessed by qPCR and viable  
 464 cells assessed by EMA-qPCR and between log values of viable cells and CFUs. Medians  
 465 from a same row that do not share a same letter are significantly different.

	PVC		Stainless steel	
	Before C&D	After C&D	Before C&D	After C&D
Total cells – viable cells	1.4 (B)	0.8 (A)	0.2 (A)	1.9 (B)
Viable cells – CFUs	1.1 (A)	1.4 (A)	1.6 (A)	2.5 (B)

466

Figure 1

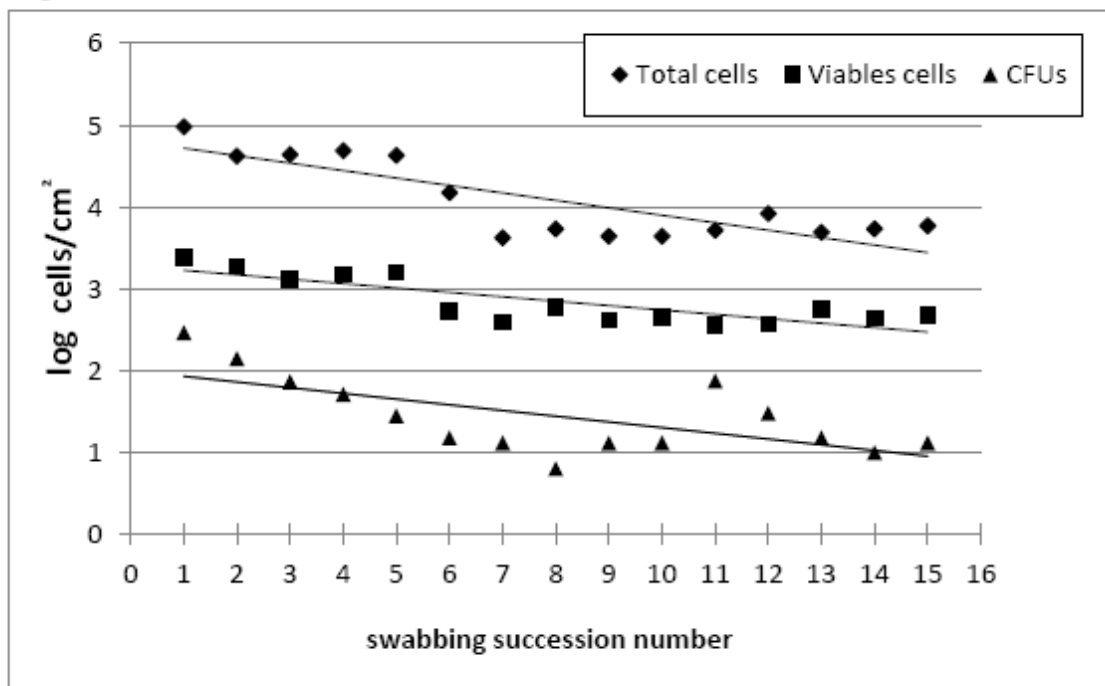


Figure 2

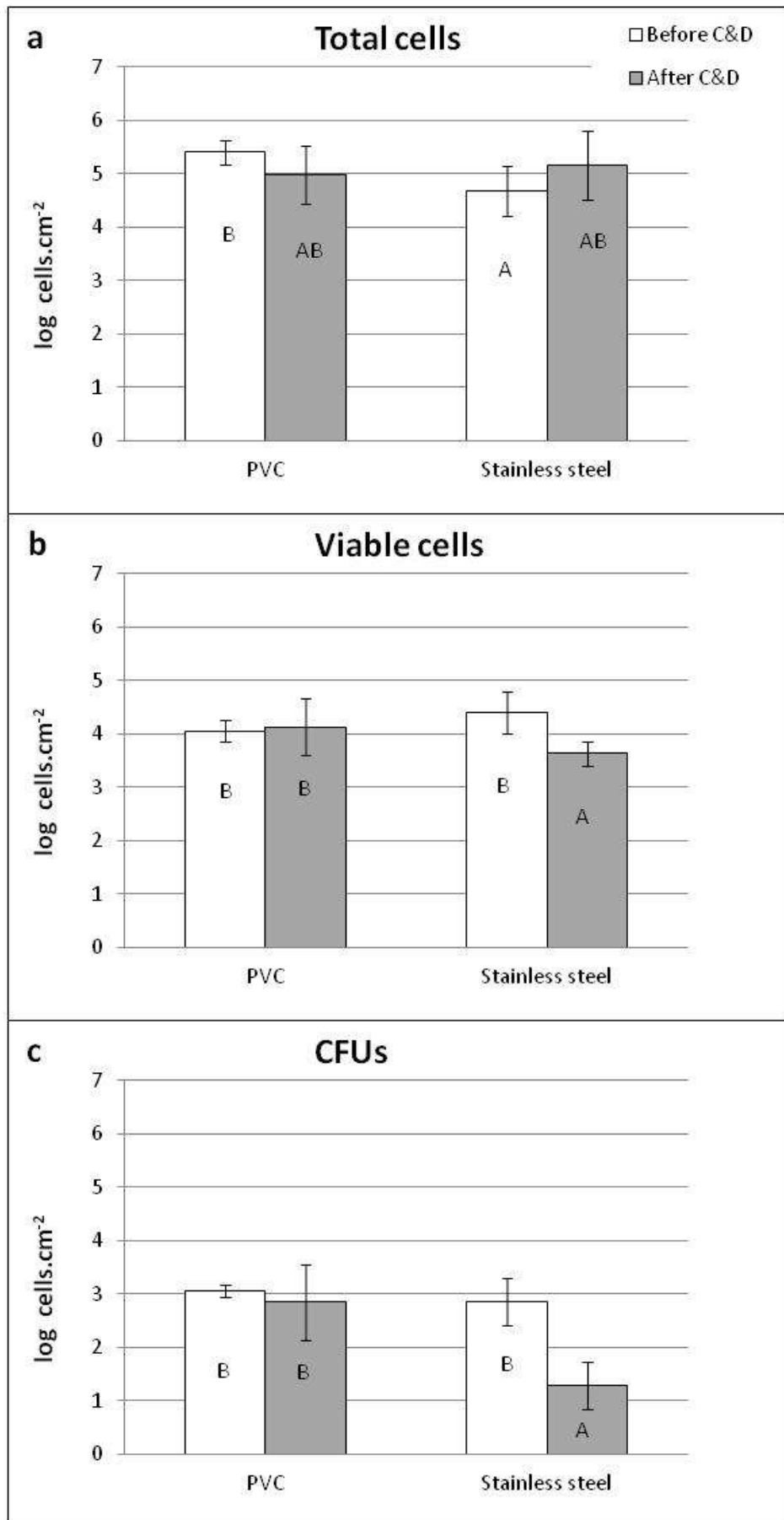


Figure 3

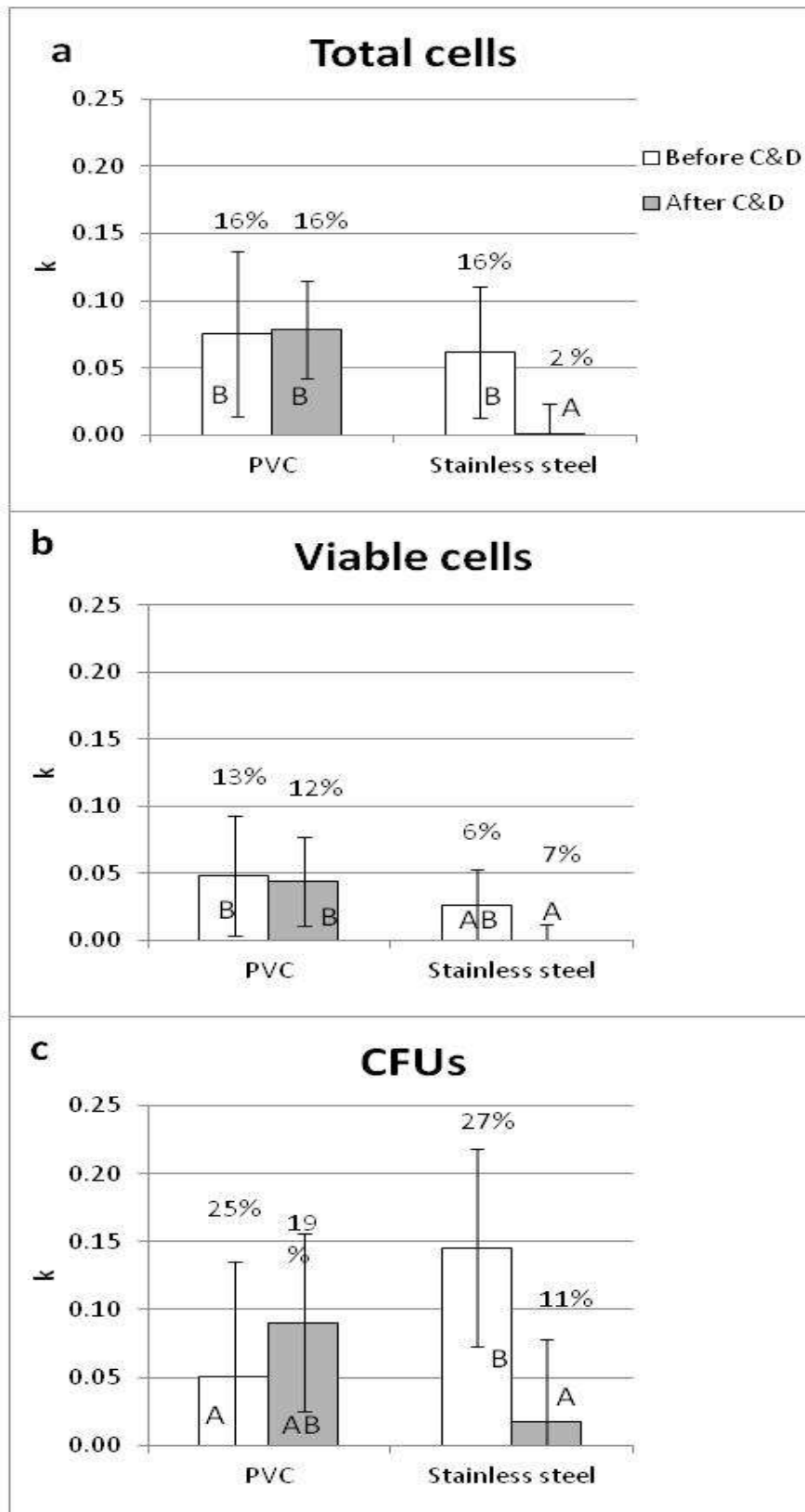


Figure 4

