



N° Ordre : 41839

UNIVERSITE LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse de Doctorat

Spécialité

Microbiologie

Présentée par

Thomas Brauge

ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES DE LA MATRICE
EXTRACELLULAIRE DES BIOFILMS DE
LISTERIA MONOCYTOGENES

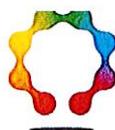
Directeur de thèse : Mme Graziella BOURDIN

Co-directeur : M. Thierry BENEZECH

Soutenu le 17 Décembre 2015

Devant le jury composé de :

Mme Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER	<i>Directeur de recherche, INRA, Jouy en Josas</i>	Rapporteur
M. Pascal PIVETEAU	<i>Maître de Conférences, Université de Bourgogne, Dijon</i>	Rapporteur
M. Alain CHARBIT	<i>Directeur de recherche, CNRS, Paris</i>	Examineur
M. Michel HEBRAUD	<i>Directeur de recherche, INRA, Clermont Ferrand</i>	Examineur
Mme Stéphanie LA CARBONA	<i>Chargée de projet, ACTALIA, Caen</i>	Examineur
Mme Christine FAILLE	<i>Directrice de recherche, INRA, Villeneuve d'Ascq</i>	Invitée
Mme Irina SADOVSKAYA	<i>Chargée d'étude, ULCO, Boulogne-sur-Mer</i>	Invitée



« PROJET MATLM »

Depuis 1990 (1993 pour le site de Boulogne/Mer), le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses a mis en place une démarche qualité. Il est doté d'une mission *Qualité* rattachée à la direction du laboratoire. Le laboratoire est accrédité par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO 17025 (portée 1-2246 pour le site d'Alfort et portée 1-5959 pour le site de Boulogne/Mer) pour un ensemble de programmes « Essais » correspondant à ses activités d'analyse de contaminants microbiologiques et physico-chimiques dans les aliments. Depuis 2001 (2012 pour le site de Boulogne/Mer), le laboratoire a entrepris une démarche de qualité en recherche et a suivi en cela les recommandations de la commission AFNOR sur l'assurance qualité en recherche (référentiel : NF X50-553 Juillet 2014-*Management des activités de recherche*). Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place qui s'applique aux travaux de thèse. Un manuel Qualité spécifique aux travaux de recherche auquel les unités accueillant des doctorants doivent se référer est en vigueur. Des audits internes sont réalisés régulièrement dans les unités par la mission Qualité qui reçoit pour cela l'appui de la mission *Soutien et Valorisation de la recherche*.

C'est dans ce contexte que le présent rapport qualité pour les travaux de thèse faisant l'objet de ce mémoire a été rédigé. Les audits et le rapport ci-dessous ne concernent que les travaux effectués à l'Anses, au laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort.

Auditeurs	Mission Qualité : C. Cecconi (<i>Resp. Qualité</i>) et A. Chausse (<i>adit</i>) Mission Soutien et valorisation de la recherche : S. Dragacci, <i>Dir. de recherche</i>
Audits Qualité	Avril 2013 – Avril 2014 – Novembre 2015
Unité d'accueil	Unité B3PA- <i>Bactériologie et Parasitologie des produits de la pêche et de l'aquaculture</i> (chef d'unité : G. Boudin) – Dpt Produits de la pêche et de l'aquaculture (A. Brisabois), ANSES-Laboratoire de sécurité des aliments (L. Laloux)
Date début de thèse	Janvier 2013
Acronyme Thèse	MATLM
Sujet de Thèse	Rôle de la matrice extracellulaire des biofilms mono-espèces et mixtes de <i>Listeria monocytogenes</i> dans la formation des biofilms et dans leur détachement. Application à la filière des produits de la pêche.
Direction de thèse	G. Bourdin (Anses, laboratoire Sécurité des aliments)
Ecole doctorale	SMRE-Lille Nord (Science de la matière, du rayonnement et de l'environnement)
Comité de pilotage	BPA, ULCO (I. Sadovskaya), PIHM, INRA (C. Faille et T. Benezech), INSERM (A. Charbit), ANSES (G. Bourdin)
Correspondant qualité de l'Unité	R. Qenu

Initiation à l'assurance qualité

Le doctorant a été formé au système d'assurance qualité par sa directrice de thèse et par la responsable Qualité du site de Boulogne sur Mer. Il s'est rapidement approprié la démarche qualité et a utilisé le manuel de la qualité en recherche du laboratoire et la documentation afférente, ce qui a été constaté lors d'audits internes.

Déroulement du projet de thèse

Le sujet de thèse a été présenté par le doctorant lors du premier audit. Plusieurs hypothèses de travail ont été clairement identifiées et exposées et les parties expérimentales ont été construites en cohérence avec ces objectifs et tracées de façon pertinente.

Le doctorant s'est particulièrement investi dans la mise sous assurance qualité de ses travaux de thèse. Les protocoles expérimentaux, l'enregistrement et le traitement des résultats, leur analyse et interprétation et enfin la discussion-conclusion, sont bien documentés. L'habilitation technique du doctorant a été réalisée en tant que de besoin et a fait l'objet d'un dossier.

La valorisation du projet de thèse fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées et d'une première publication acceptée où T. Brauge est premier auteur (Brauge T. *et al.* (2015). Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. FEMS Microbiol Letters (*In Press*).

Traçabilité de la démarche et des expérimentations

La traçabilité de la démarche de recherche ainsi que celle des expérimentations mises en œuvre a été examinée au cours de plusieurs audits et s'est révélée très bien tenue. La documentation qualité est convenablement utilisée : documents de définition et d'acceptation du projet, composition de l'équipe de recherche et du comité de pilotage et description détaillée des tâches effectuées. Des rapports d'avancement et des rapports de réunion (notamment du comité de pilotage) complètent la documentation qualité.

Concernant la publication, un dossier a été constitué permettant de conserver la traçabilité des résultats publiés en relation avec les dossiers des expérimentations, les courriers échangés avec les éditeurs et les réponses apportées aux reviewers.

Des actions correctives ont été proposées à l'issue des audits de traçabilité ; elles ont été convenablement traitées et tracées.

L'archivage de l'ensemble du dossier de recherche est effectué sur le réseau informatique de l'établissement.

EN CONCLUSION, LA MISSION QUALITE DU LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS ATTESTE QUE LES TRAVAUX DE THESE MENES PAR T. BRAUGE SE SONT DEROULES EN APPLIQUANT LES ELEMENTS DU SYSTEME QUALITE DU LABORATOIRE, CE QUI PERMET D'AVOIR CONFIANCE DANS LA CONDUITE DU PROJET DE THESE. TH. BRAUGE S'EST IMPLIQUE DE FAÇON RIGOREUSE ET APPLIQUEE DANS SA DEMARCHE QUALITE DEPUIS L'HYPOTHESE DE TRAVAIL JUSQU'A LA PUBLICATION DES RESULTATS. LA TRAÇABILITE DES EXPERIMENTATIONS A ETE ENREGISTREE DE FAÇON PERTINENTE ET MINUTIEUSE.

Fait à Maisons-Alfort, le 16 novembre 2015



G. Bourdin

Directrice de thèse

Anses-Laboratoire de sécurité des aliments



V. Laloux

Directeur du laboratoire

Anses-Laboratoire de sécurité des aliments

RESUME

L'objectif de ces travaux a été d'étudier le rôle des exopolysaccharides dans la formation des biofilms de *Listeria monocytogenes* et dans leur résistance face à des procédures de nettoyage rencontrées en entreprise dans des circuits fermés. Nous avons montré que l'exopolysaccharide majeur dans la matrice extracellulaire était l'acide téichoïque qui était de structure identique à l'acide téichoïque pariétal. De plus, nous avons identifié que 50% des 93 souches de sérotype 1/2a étudiées avaient une mutation non-sens ou silencieuse ou faux-sens sur le gène *lmo2550* ce qui pouvait entraîner la non-ramification de l'acide téichoïque avec le résidu N-Acétyleglucosamine (GlcNAc). Nous avons donc étudié des mutants de la souche de référence EGD-e qui avaient des gènes *lmo2549* ou *lmo2550* ou *lmo2537* ou *tagO1tagO2* inactivés ce qui a permis de mettre en évidence que l'absence de résidu GlcNAc sur les acides téichoïques avait modifié les propriétés de surface de *L. monocytogenes*, diminué l'adhésion à l'acier inoxydable et modifié l'architecture des biofilms de 48h. Par ailleurs, ils étaient plus sensibles à une procédure de nettoyage en circuit fermé avec un détachement plus important, une modification de l'architecture des biofilms et la présence uniquement de cellules viables non cultivables et mortes après passage du flux de soude versus la souche sauvage EGD-e. Le but de ces travaux était de mieux comprendre le rôle de la matrice extracellulaire dans la formation des biofilms de *L. monocytogenes* pour ensuite trouver le meilleur moyen de l'éradiquer dans l'environnement industriel.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF EXOPOLYSACCHARIDES FROM EXTRACELLULAR MATRIX OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* BIOFILMS

The objective of this work was to study the role of exopolysaccharides in the formation of *Listeria monocytogenes* biofilm and their resistance to cleaning procedure in industry. We showed that the exopolysaccharide in major extracellular matrix was teichoic acid, which was identical at the structure to the parietal teichoic acid. In addition, we identified that 50% of 93 strains of 1/2a serotype studied had a non-sense mutation or mis-sense or silent on the *lmo2550* gene that could lead to non-branching of the teichoic acid with the residue N-Acetylglucosamine (GlcNAc). We therefore examined mutants of EGD-e reference strain which had inactivated *lmo2549* or *lmo2550* or *lmo2537* or *tagO1tagO2* genes allowing highlighting the absence of the GlcNAc residue on teichoic acids. The mutation of these genes had changed the *L. monocytogenes* surface properties, decreased the adhesion to stainless steel and modified the architecture of 48h-biofilms. Furthermore, they were more susceptible to a circuit cleaning procedure with an important detachment, a change in the architecture of the biofilm and the presence of non-cultivable but viable cells and dead cells after passage of the caustic soda flow versus the wild-type EGD-e strain. The aim of this work was to better understand of the role of the extracellular matrix in the formation of *L. monocytogenes* biofilms and then find the procedure to eradicate it in the industrial environment.

Mots clefs: *Listeria monocytogenes*, biofilm, matrice extracellulaire, exopolysaccharides

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm, extracellular matrix, exopolysaccharides

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Laboratoire de Sécurité des Aliments

Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture

Boulevard du Bassin Napoléon - 62200 Boulogne sur mer

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Marie-Pierre Chapot-Chartier et M. Pascal Piveteau pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Mme Stephanie La Carbona, M. Alain Charbit et M. Michel Hebraud d'avoir accepté d'être examinateurs de ce manuscrit.

Ce travail a été réalisé à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, dans le laboratoire de sécurité des aliments de Boulogne sur Mer. Je remercie de ce fait Mme Anne Brisabois, M. Laurent Laloux et M. Pierre Malle pour m'avoir accueilli au sein de cette structure. La thèse constitue une expérience intense, passionnante. Cette « aventure » à l'image du temps du Nord fut emplie de grands rayons de soleil mais aussi parfois de petites averses pluvieuses. J'ai eu cependant la chance d'être entouré de quatre personnes, Graziella, Irina, Christine et Thierry qui m'ont permis de vivre pleinement ces 3 années. Ils m'ont appris à surfer sur les rayons solaires mais aussi à me dépatouiller et me sortir de la gadoue des jours pluvieux.

Les mots me manquent pour exprimer tout ma gratitude à Graziella Bourdin. Merci. Merci pour ton enthousiasme, ta gentillesse et ton avertissement. Que rêver de mieux qu'une responsable de thèse qui est là pour vous guider, mais qui vous fait surtout confiance et vous laisse libre de vos choix. Merci pour tout ce que tu m'as appris, scientifiquement comme humainement. Merci pour ton amitié.

Merci à mon co-directeur de thèse Thierry Benezech pour ses remarques pertinentes, ainsi que pour l'intérêt pour mes recherches et les nombreuses discussions que nous avons eues lors de mes comités.

Merci à mes deux supers co-encadrantes : Irina Sadovskaya, pour tes encouragements de tout instant et pour m'avoir enseigné l'obscur biochimie des sucres et Christine Faille pour son investissement sans faille dans mes projets et qui m'a toujours accueilli avec la plus grande gentillesse dans son laboratoire.

A vous 4 sincèrement, Merci.

Je voudrai aussi témoigner toute mon amitié à mes chers collègues de Laboratoire, pour votre leçon de courage; car il vous en a fallu certainement beaucoup pour me supporter durant ces 3 années mais aussi pour votre aide à la réalisation de cette thèse. Merci donc à Charlotte, Gaëlle, Guillaume, Marie-Ange, Mélanie, Odile, Régine, Sabine, Stéphanie, Sylvie, et Virginie.

Une mention spéciale à ceux avec qui j'ai pu travailler directement. Merci à Cindy bien sûr, d'avoir toujours accueilli mes commandes de MCDB 202 avec de grands sourires et de m'avoir donné ainsi de solides fondations pour réaliser ce travail de thèse. Clémence et Guylaine parce que vous êtes trop swag et aussi parce que les manip avec vous c'était swag.

Merci à l'équipe administrative, Corinne, Sophie et Karine avec qui je n'ai jamais rencontré ou même entendu parler de « Bug ». Merci pour tous ces ordres de missions, les commandes et j'en passe. Bref merci d'avoir géré la paperasse de ma thèse comme des chefs !

Merci également aux équipes de l'ULCO,

Merci à la souriante équipe BPA : Thierry Grard pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir confié des enseignements au sein de sa formation QPAH. Un grand merci également à Maryse et Perrine pour votre gentillesse et nos petites escapades gustatives ou sportives à l'occasion de déménagement. Merci à Pierrette, Philippe et Denis de m'avoir toujours accueilli avec sympathie.

Merci également à mes collègues de Tp, Valérie Lencel et Solène Croquelois.

Une pensée très chaleureuse pour Gilles et Annette, deux piliers de l'équipe processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux pour leur gentillesse et leur soutien technique lors des manipulations en microscopie électronique à balayage et à transmission.

Merci à mes stagiaires : Arnaud et Johan pour leur aide à la réalisation de ce travail ainsi que Jean Romain et Vainui à qui je souhaite une belle et grande carrière dans la recherche.

Je voudrai également témoigner toute mon amitié aux doctorants avec qui je partage mon bureau. Alexandre et Yuwalee, à qui je souhaite le meilleur et Estelle, Mamadou et Daline pour les pauses papotages tellement appréciables.

Plus personnellement, cette thèse est l'occasion pour moi de remercier toutes les personnes qui me sont chères.

Merci aux Meymacois, grâce à qui j'ai toujours passé des vacances d'anthologie.

Merci à mes amis Limougeaud : Fred, Seb, Sophie, la bande du Gite et JP sans qui mes premières années d'études n'aurait pas rencontré le succès qu'elles ont trouvées.

Merci à mes amis du Nord Pas De Calais, Clément, Damien, Elmer, les Kevin, La Huche, Stan, Louis et leurs copines ainsi que tous mes coéquipiers du rugby club boulonnais qui m'ont accueilli sur les terrains nordiques mieux que nulle part ailleurs. Merci pour tous ces merveilleux souvenirs que nous

avons construits ensemble.

Merci à mes amis de toujours Anne-so, Benoit, Clem, Laure et Vincent. Vous avez été présents dans tous les bons moments comme dans les mauvais, on a vécu un bon nombre d'aventures ensemble et j'espère que ça continuera jusqu'à nos vieux jours !!! Merci d'avoir été là pour moi, de me rappeler qu'il n'y a pas que la thèse dans la vie et que les amis sont indispensables pour tenir le coup !

Merci à la famille Bisserié et Quiertant pour vos encouragements de tout instant, ainsi que pour votre gentillesse, vos valeurs et vos qualités humaines à tous. Tous ces moments de chaleur et de gourmandise partagés avec vous ont souvent été salutaires pour moi.

Merci à mes grands-parents Poulou et Didou.

Je n'oublie pas ma belle maman Nelly, pour les escapades pêche/lecture de mon enfance et tes merveilleuses crêpes, ainsi que Tiff et Johan et leur courage incontestable pour fréquenter mes frères et sœur.

Venons-en donc à ma sœur, Marine et mes frères, David et Mathieu, je n'oublierai jamais les nombreux sévices que vous m'avez fait subir étant petits. C'est pourquoi tout naturellement je vous ai toujours pris en modèles. J'espère être à la hauteur des personnes formidables que vous êtes devenus. Avec vous trois je suis et je reste le plus fière des petits frères.

Merci à ma petite nièce, Charly, une petite boule de bonheur qui a su arriver à point nommé.

Je remercie également ma Fanny, pour ta patience, ton soutien et tes encouragements de chaque instant qui ont su me redonner confiance dans les moments les plus difficiles. Ma plus grande fierté est d'être avec toi. A toutes les choses que nous avons vécues et toutes celles qui nous reste à vivre...

Enfin je remercie mon papa. Merci d'avoir toujours cru en moi et de t'être souvent oublié pour pouvoir me porter au plus haut. Cette thèse c'est entièrement à toi que je la dois.

A mon aventurière de mère

TABLE DES MATIERES

PRESENTATION GENERALE.....	51
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	57
Chapitre 1. <i>Listeria monocytogenes</i>	57
1.1 Le genre <i>Listeria</i>	57
1.2 La listériose	61
1.2.1 La maladie et ses symptômes	61
1.2.2 Incidence de la listériose	63
1.2.3 Exemples d'épidémies récentes avec pour source de contamination l'environnement ou une contamination croisée	65
1.3 Caractéristiques microbiologiques et cellulaires de <i>Listeria monocytogenes</i>	71
1.3.1 Morphologie et conditions de culture.....	71
1.3.2 Description de la paroi cellulaire et plus particulièrement des polysaccharides	73
Chapitre 2. Les biofilms de <i>Listeria monocytogenes</i>	81
2.1 Historique et définition.....	81
2.2 Formation des biofilms.....	83
2.2.1 Conditionnement de la surface	83
2.2.2 Le transport des bactéries vers le support	85
2.2.3 Adhésion des bactéries au support	87
2.2.4 La maturation du biofilm.....	91

2.2.5	Détachement et dispersion des bactéries	93
2.3	La matrice extracellulaire	95
2.3.1.1	Protéines extracellulaires	97
2.3.1.2	ADN extracellulaire	103
2.3.1.3	Exopolysaccharides.....	107
2.4	Facteurs impliqués dans la formation des biofilms	113
2.4.1	Facteurs intrinsèques	113
2.4.2	Facteurs extrinsèques	117
2.5	Les biofilms en entreprise	119
2.6	Les méthodes de caractérisation des biofilms	129
2.6.1	Analyse de la biomasse totale	129
2.6.1.1	Les colorations	129
2.6.1.2	Les observations microscopiques	129
2.6.1.2.1	La microscopie optique	129
2.6.1.2.2	La microscopie électronique à balayage	133
2.6.1.2.3	La microscopie confocale à balayage laser.....	135
2.6.2	Analyse moléculaire des populations bactériennes : la PCR quantitative	137
2.6.3	Analyse biochimique des polysaccharides de la matrice extracellulaire	143
2.6.3.1	Extraction.....	143
2.6.3.2	Analyses.....	145
2.6.3.2.1	Analyse par la technique de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse... ..	145
2.6.3.2.2	Analyse par la technique de résonance magnétique nucléaire	147

TRAVAUX EXPERIMENTAUX	151
Chapitre 1. Caractérisation des exopolysaccharides présents dans la matrice extracellulaire et dans le milieu de culture des biofilms de <i>Listeria monocytogenes</i> versus les polysaccharides pariétaux.....	151
1.1 Contexte et objectif	151
1.2 Matériel et méthodes	155
1.2.1 Souches et conditions de culture	155
1.2.2 Formation et observation des biofilms	155
1.2.3 Préparation des polysaccharides de la paroi cellulaire, de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms de 48 h.....	159
1.2.4 Etude structurale des glucides	161
1.2.4.1 Analyse monosaccharidique	161
1.2.4.2 Analyse structurale.....	163
1.2.5 Séquençage des gènes <i>lmo2549</i> et <i>lmo2550</i>	165
1.2.6 Analyses statistiques	167
1.3 Résultats	167
1.3.1 Formation des biofilms.....	167
1.3.2 Identification des polysaccharides présents dans la matrice extracellulaire et dans le milieu de culture des biofilms versus les polysaccharides pariétaux.....	169
1.3.2.1 Caractérisation des exopolysaccharides des souches de sérotype 4b	169
1.3.2.2 Caractérisation des exopolysaccharides des souches de sérotype 1/2a	177

1.3.3	Séquençage des gènes <i>lmo2549</i> et <i>lmo2550</i> des quatre souches de <i>Listeria monocytogenes</i> de sérotype 1/2a étudiées	181
1.3.4	Fréquence de mutation des gènes <i>lmo2549</i> et <i>lmo2550</i> dans un panel de souches de <i>Listeria monocytogenes</i> de sérotype 1/2a	183
1.4	Discussion	187
1.5	Conclusion et perspectives	199
Chapitre 2. Etude du rôle de la ramification <i>N</i> -acétylglucosamine de l'acide téichoïque dans la formation et le détachement des biofilms de <i>Listeria monocytogenes</i> de sérotype 1/2a ...		
2.1	Contexte et objectif	201
2.2	Matériel et méthodes	207
2.2.1	Souches bactériennes et conditions de culture	207
2.2.2	Etude phénotypique des bactéries en culture planctonique.....	207
2.2.2.1	Etude de la composition des acides téichoïques pariétaux	207
2.2.2.2	Mesure du caractère hydrophobe/ hydrophile des surfaces bactériennes .	207
2.2.2.3	Mesure du potentiel électrostatique des surfaces bactériennes.....	209
2.2.2.4	Etude de la morphologie des cellules bactériennes par microscopie électronique en transmission.	209
2.2.2.5	Cinétique de la croissance bactérienne en culture planctonique.....	211
2.2.3	Etude de l'adhésion à la formation du biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i> sur acier inoxydable	211
2.2.3.1	Préparation des lames d'acier inoxydable.....	211
2.2.3.2	Mesure du caractère hydrophobe/ hydrophile de l'acier inoxydable.....	213

2.2.3.3	Etude structurale des polysaccharides de la paroi cellulaire, de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms de 48 h de <i>L. monocytogenes</i>	213
2.2.3.4	Protocole de l'adhésion à la formation des biofilms.....	215
2.2.3.5	Observations microscopiques de l'adhésion bactérienne à la formation des biofilms bactériens	217
2.2.3.6	Quantification des populations viables cultivables, viables et totales à l'étape d'adhésion (t = 3 h) et du biofilm de 48 h.....	219
2.2.3.6.1	Quantification de la population viable cultivable.....	221
2.2.3.6.2	Quantification des populations viables et totales par PMA-qPCR et qPCR	221
2.2.4	Quantification des composants de la matrice extracellulaire [Glucides extracellulaires, protéines extracellulaires et acides désoxyribonucléiques extracellulaires (ADNe)] des biofilms de 48 h.....	223
2.2.5	Résistance des biofilms à un décrochage mécanique couplé ou non à un traitement chimique.....	225
2.2.6	Analyses statistiques	227
2.3	Résultats	227
2.3.1	Confirmation du phénotype mutant.....	227
2.3.2	Caractérisation phénotypique des bactéries	229
2.3.2.1	Mesure du caractère hydrophobe/ hydrophile des surfaces cellulaires.....	229
2.3.2.2	Mesure du potentiel électrostatique	231
2.3.2.3	Morphologie des cellules bactériennes	231
2.3.2.4	Suivi de croissance bactérienne en culture planctonique.....	231

2.3.3	Etude de l'adhésion bactérienne à la formation du biofilm	233
2.3.3.1	Validation des nouvelles conditions de réalisation des biofilms de 48 h .	235
2.3.3.2	Observation par microscopie en épifluorescence des coupons contaminés.....	235
2.3.3.3	Quantification et observation des populations viables et mortes.....	239
2.3.4	Caractérisation des biofilms matures de 48 h.....	243
2.3.4.1	Etude de l'architecture des biofilms de 48 h par microscopie électronique à balayage.....	243
2.3.4.2	Observation des populations viables et mortes des biofilms de 48 h par microscopie optique	243
2.3.4.3	Dénombrement de la population viable et totale des biofilms de 48 h.....	245
2.3.4.4	Quantification des composants de la matrice extracellulaire.....	249
2.3.5	Résistance des biofilms de 48 h à des flux laminaires	249
2.3.5.1	Population résiduelle après un flux d'eau laminaire.....	249
2.3.5.2	Population résiduelle après un flux laminaire couplé à un traitement avec un détergent, la soude.....	255
2.4	Discussion	257
2.5	Conclusion.....	271
Chapitre 3. Etude de la capacité de formation de biofilms par des souches de <i>Listeria monocytogenes</i> de sérotype 1/2a affectées dans leurs voies de biosynthèse de l'acide téichoïque.....		
3.1	Introduction	273

3.2	Matériel et méthodes	277
3.2.1	Souches et conditions de culture	277
3.2.1.1	Pré-culture des mutants EGD- Δ <i>tagO1</i> , EGD- Δ <i>tagO2</i> et de la souche sauvage EGD-e.....	277
3.2.1.2	Pré-culture des mutants EGD- Δ <i>lmo2537/pLiv-lmo2537</i> et EGD- Δ <i>tagO1tagO2 ::pLIV2(tagO1)</i>	279
3.2.2	Etude des bactéries en culture planctonique	281
3.2.2.1	Quantification du ribitol pariétal.....	281
3.2.2.2	Caractérisations cellulaires des mutants	281
3.2.2.3	Cinétique de la croissance bactérienne en culture planctonique.....	281
3.2.3	Etude de la formation des biofilms et de leurs résistances à un flux laminaire	283
3.3	Analyses statistiques	283
3.4	Résultats	283
3.4.1	Caractérisations phénotypiques des bactéries	283
3.4.1.1	Quantification du ribitol pariétal.....	283
3.4.1.2	Mesure du caractère hydrophobe/hydrophile des surfaces bactériennes ..	285
3.4.1.3	Mesure du potentiel électrostatique	285
3.4.1.4	Morphologie des cellules bactériennes	287
3.4.2	Suivi de croissance bactérienne.....	287
3.4.3	Etude de l'adhésion bactérienne à la formation du biofilm	289
3.4.4	Caractérisation des biofilms matures de 48 h.....	295

3.4.4.1	Etude de l'architecture des biofilms de 48 h par microscopie optique en épifluorescence.....	295
3.4.4.2	Etude de l'architecture des biofilms de 48 h par microscopie électronique à balayage	297
3.4.4.3	Dénombrement de la population viable et de la population totale des biofilms de 48 h.....	299
3.4.4.4	Quantification de la matrice extracellulaire	303
3.4.5	Résistance des biofilms matures de 48 h à des flux laminares	303
3.4.5.1	Population résiduelle après un flux d'eau laminaire.....	303
3.4.5.2	Population résiduelle après un flux de soude à 0,05%.....	307
3.5	Discussion	311
3.6	Conclusion.....	319
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	321
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	335
	ANNEXES.....	385

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Epidémies nationales et internationales de listériose, 1981-2013.

Annexe 2 : Composition du milieu de culture MCDB 202 (Cryo bio System).

Annexe 3: Impact de la sonication du biofilm sur la viabilité des cellules de *L. monocytogenes*.

Annexe 4 : Composition du milieu de culture MCDB 202 (US Biological).

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN du kit DNeasy Blood & Tissue.

Annexe 6 : Affinité à l'hexadécane des mutants complémentés EGDe Δ *lmo2549*::pLIV2(*lmo2549*) et EGDe Δ *lmo2550*::pLIV2(*lmo2550*) et de la souche sauvage EGD-e.

Annexe 7 : Suivit de croissance par dénombrement sur milieu gélosé TSAYe (supplémenté ou non en Cm à 10 μ g/ml) les mutants complémentés EGDe Δ *lmo2549*::pLIV2(*lmo2549*) et EGDe Δ *lmo2550*::pLIV2(*lmo2550*) et de la souche sauvage EGD-e en culture planctoniques.

Annexe 8 : Observation par microscopie en épifluorescence après coloration au DAPI des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, Δ *lmo2549* et Δ *lmo2550* et la souche sauvage EGD-e.

Annexe 9 : Observation par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 48h formés par les mutants complémentés EGDe Δ *lmo2549*::pLIV2(*lmo2549*) et EGDe Δ *lmo2550*::pLIV2(*lmo2550*) et la souche sauvage EGD-e.

Annexe 10 : Quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) des biofilms de 48h formées par les mutants DSS1130 BFA2, Δ *lmo2549* et Δ *lmo2550* et la souche sauvage EGD-e.

Annexe 11 : Résistance des biofilms de 48h des mutants complémentés EGDe Δ *lmo2549*::pLIV2(*lmo2549*) et EGDe Δ *lmo2550*::pLIV2(*lmo2550*) et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 à un flux d'eau et de soude (0,05%) à un débit de 40 Pa

Annexe 12 : Mesure d'angle de contact à l'eau des surfaces d'acier inoxydable.

Annexe 13 : Quantification des populations totales, viable et viable cultivable des cellules adhérente à l'acier inoxydable après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202 des mutants DSS1130 BFA2, Δ *lmo2549*, Δ *lmo2550* et de la souche sauvage EGD-e.

Annexe 14 : Observation par microscopie en épifluorescence après coloration à l'orangé d'acridine de l'adhésion à la formation des biofilms de 48h par les mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ et la souche sauvage EGD-e.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Incidence de la listériose par million d'habitants en France métropolitaine de 1999 à 2013 (Institut de veille sanitaire, 2014).....	62
Figure 2 : Cellule de <i>L. monocytogenes</i> observée par microscopie électronique en transmission (Source : ANSES, Boulogne Sur Mer).	70
Figure 3 : Structure de la paroi des bactéries Gram positif (Swoboda, et al., 2010).....	72
Figure 4 : Structure des acides téichoïques pariétaux de <i>L. monocytogenes</i> selon le sérotype (Eugster et Loessner, 2014).....	74
Figure 5: Représentation schématique de la formation d'un biofilm (Stoodley, et al., 2002).....	82
Figure 6 : Adhésion de la souche de <i>L. monocytogenes</i> EGD-e après 30 min d'incubation à 37°C sur verre.....	102
Figure 7 : Observations microscopiques des biofilms formés par une souche mobile 10403S de <i>L. monocytogenes</i> et de son mutant inactivé dans la mobilité par mutation du gène <i>flaA</i>	116
Figure 8 : Observations par la technique MCBL de biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	136
Figure 9 : Mode d'action du monoazide de propidium (PMA) et du monoazide d'éthidium (EMA) lors de la qPCR.	142
Figure 10 : Population bactérienne des biofilms formés après 48h sur polystyrène à 37°C.....	166
Figure 11 : Observations par microscopie en épifluorescence en coloration DAPI des biofilms formés par les souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.	166
Figure 12 : Observations par microscopie en épifluorescence en coloration à l'orangé d'acridine des biofilms formés par les souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.....	166
Figure 13 : Observations par MEB des biofilms des souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.	168
Figure 14 : Observations par MEB des biofilms des souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.	168
Figure 15 : Profils d'éluion obtenus après passage sur la colonne Sephadex G-50 des extraits bruts de glucides contenus à partir du milieu de culture (Bleu) et de la matrice extracellulaire (Rouge) des biofilms de la souche ScottA	170

Figure 16 : Comparaison des profils GC-MS des polysaccharides provenant du milieu de culture, de la matrice extracellulaire et de la paroi de la souche ScottA de sérotype 4b.	170
Figure 17 : Comparaison des spectres ¹ H-RMN des polysaccharides provenant du milieu de culture, de la matrice extracellulaire et de la paroi de la souche ScottA de sérotype 4b	172
Figure 18 : Analyse ¹ H/ ¹ H TOCSY (A) et ¹ H/ ¹³ C HSQC (B) du polysaccharide isolé de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche ScottA..	172
Figure 19 : Profils d'éluion obtenus après passage sur la colonne Sephadex G-50 des extraits bruts de glucides contenus à partir du milieu de culture (Bleu) et de la matrice extracellulaire (Rouge) des biofilms de la souche EGD-e.	176
Figure 20 : Comparaison des profils GC-MS des polysaccharides provenant du milieu de culture (A), de la matrice extracellulaire (B) et de la paroi cellulaire (C) de la souche EGD-e de sérotype 1/2a.....	176
Figure 21 : Comparaison des spectres ¹ H-RMN des polysaccharides provenant du milieu de culture, de la matrice extracellulaire et de la paroi de la souche EGD-e de sérotype 1/2a.	176
Figure 22 : Analyse ¹ H/ ¹ H TOCSY (A) et ¹ H/ ¹³ C HSQC (B) du polysaccharide isolé de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche EGD-e.	178
Figure 23 : Comparaison des profils GC-MS des polysaccharides provenant de la matrice extracellulaire des biofilms de A) DSS1130 BFA2, B) EGD-e, C) DPF 234 HG2 et D) CL 297 AS1.....	178
Figure 24 : Comparaison des spectres ¹ H-RMN des polysaccharides provenant de la matrice extracellulaire des biofilms des souches A) DSS1130 BFA2, B) EGD-e, C) DPF 234 HG2 et D) CL 297 AS1.	180
Figure 25 : Comparaison des spectres ¹ H-RMN des polysaccharides provenant des parois bactériennes (A), de la matrice extracellulaire (B) et du milieu de culture (C) des biofilms de la souche DSS1130 BFA2.....	180
Figure 26 : Alignement des séquences du gène <i>lmo2550</i> de la souche EGD-e avec les 93 souches séquencées.	182
Figure 27 : Alignement des séquences du gène <i>lmo2550</i> de la souche EGD-e avec les 93 souches séquencées.	184
Figure 28: Représentation schématique du test MATS.....	208
Figure 29: Angle de contact d'un liquide avec un support utilisé comme index de mouillabilité.	212
Figure 30 : Calcul du nombre d'unité génome de <i>L. monocytogenes</i> contenu dans 100 µg/ml (1.10 ⁸ pg/ml) d'ADN génomique de <i>L. monocytogenes</i>	222

Figure 31 : Courbes standards obtenues avec les amorces NovF/NovR sur des dilutions d'ADN génomique de <i>L. monocytogenes</i> allant de 100 µg/ml à 0.0001 µg/ml.....	222
Figure 32 : Principe de la boucle d'essai expérimentale induisant les forces de décrochage sur les coupons d'acier inoxydable contaminés.	224
Figure 33 : Comparaison des profils GC-MS des acides téichoïques pariétaux provenant de la souche sauvage EGD-e (A), du mutant complétementé EGDe Δ <i>lmo2549</i> ::pLIV2(<i>lmo2549</i>) (B), du mutant complétementé EGDe Δ <i>lmo2550</i> ::pLIV2(<i>lmo2550</i>) (C), du mutant Δ <i>lmo2549</i> (D) et du mutant Δ <i>lmo2550</i> (E)	226
Figure 34 : Affinité à l'hexadécane des mutants DSS 1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et de la souche sauvage EGD-e.....	228
Figure 35 : Observations par microscopie électronique à transmission des mutants DSS 1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et de la souche sauvage EGD-e.	230
Figure 36 : Suivi de croissance par lecture d'absorbance (DO _{620nm}) des mutants Δ <i>lmo2549</i> , Δ <i>lmo2550</i> , DSS1130 BFA2 et de la souche sauvage EGD-e.	230
Figure 37 : Suivi de croissance sur 48h par dénombrement sur milieux gélosés TSAYe des mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et de la souche sauvage EGD-e	232
Figure 38 : Comparaison des spectres ¹ H-RMN des polysaccharides provenant de A) la matrice extracellulaire des biofilms de la souche sauvage EGD-e.	234
Figure 39 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration à l'orangé d'acridine de l'adhésion à la formation des biofilms de 48h par les mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e.....	236
Figure 40 : Suivi de l'adhésion à la formation des biofilms de 48h par les mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e.....	238
Figure 41 : Observations par microscopie électronique à balayage des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e.....	242
Figure 42 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e.....	244
Figure 43 : Quantification des populations totales, viable et viable cultivable des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e.....	244
Figure 44 : Résistance des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e	250
Figure 45 : Résistance des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, Δ <i>lmo2549</i> et Δ <i>lmo2550</i> et la souche sauvage EGD-e	254

Figure 46 : Conditions de culture de la souche sauvage EGD-e et des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$. ¹ : (+) Culture avec IPTG, ² : (-) : Culture sans IPTG.	276
Figure 47 : Affinité à l'hexadécane des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$	284
Figure 48 : Observations par microscopie électronique en transmission des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$	286
Figure 49 : Suivit de croissance des cultures planctonique des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1\Delta tagO2$ cultivés dans le milieu MCDB 202 avec (+) ou sans (-) IPTG	286
Figure 50 : Cinétique de formation des biofilms mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$	288
Figure 51 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	294
Figure 52 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration au DAPI (A) et à l'orangé d'acridine (B) des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	294
Figure 53 : Observations par microscopie électronique à balayage des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	298
Figure 54 : Quantification des populations totales, viables et viables cultivables des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	298
Figure 55 : Résistance des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	304
Figure 56 : Résistance des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	308

Tableaux

Tableau 1 : Antigènes somatiques et flagellaires utilisés dans le sérotypage de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
Tableau 2 : Quantification des composants des acides téichoïques de la paroi cellulaire selon le sérotype de <i>Listeria</i> (Fiedler, 1988).	74
Tableau 3: Gènes identifiés comme intervenant dans la voie de biosynthèse et la glycosylation des acides téichoïques pariétaux de <i>L. monocytogenes</i>	76
Tableau 4 : Souches , origines et sérotype des souches de <i>Listeria monocytogenes</i> étudiées	154
Tableau 5 : Origines, sérotype et mutations des 93 souches de <i>Listeria monocytogenes</i> étudiées.....	164

Tableau 6 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des résidus de l'acide téichoïque provenant de la souche ScottA. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et la valeur $^3J_{\text{H,H}}$ en Hz. Les valeurs en gras correspondent aux carbones substitués.....	174
Tableau 7 : Déplacements chimiques exprimés en ppm (δ) du proton et du carbone provenant de l'acide téichoïque isolé de la souche EGD-e.....	178
Tableau 8 : Souches de <i>L. monocytogenes</i> étudiées.....	206
Tableau 9 : Mobilité électrophorétique et potentiel zéta à pH 7 des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202 (n = 3).....	230
Tableau 10 : Quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) des biofilms de 48h formées par les mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e.	248
Tableau 11 : Souches bactériennes étudiées.	278
Tableau 12 : Conséquence de l'expression des gènes <i>lmo2537</i> et <i>tagO1 tagO2</i> sur la quantité d'acides téichoïques pariétaux après 3h et 48h d'incubation dans du milieu MCDB 202 à 30°C.....	282
Tableau 13 : Mobilité électrophorétique et potentiel zéta à pH 7 des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$	284
Tableau 14 : Quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$	302

ABREVIATIONS UTILISEES

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNe: Acide désoxyribonucléique extracellulaire

ATP: Adénosine tri-phosphate

BAP : Biofilm associated protein (proteine associé au biofilm)

BET: Bromure d'éthidium

Cm: Chloramphenicol

Ct: Threshold cycle ou cycle ceuil

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

Da: Dalton

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DO: Densité optique

EPS : Extracellular polymeric substance (Substance polymère extracellulaire)

Gal: Galactose

EMA : Ethidium Monoazide

Gal : Galactose

GC MS: Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

Glc: Glucose

GlcNAc: N-Acétylglucosamine

HF: Acide fluorhydrique

HPLC-MS: Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

HTM : Milieu Hsiang-Ning Tsai

Hz : Hertz

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Km: Kanamycine

ManNAc : N-Acetyl-D-mannosamine

MCBL: Microscopie confocale à balayage laser

MEB: Microscopie électronique à balayage

MET: Microscopie électronique en transmission

ml: millilitre

MWB : Modified Welshimer's Both (Milieu de culture pauvre)

mM: Millimolaire

OA: Orange d'acridine

Pa : Pascal

Pb : Paire de bases

PCR: Réaction en chaîne par polymérase

Pg : Picogramme

PMA: Monoazide de propidium

PMA-qPCR: qPCR précédé d'un traitement au PMA

PNAG : Poly-N-acetyl Glucosamine

pH: Potentiel hydrogène

qPCR: Réaction en chaîne par polymérase quantitative

Rha: Rhamnose

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RTqPCR : qPCR précédé d'une rétrotranscription des ARN

TFA: Acide trifluoroacétique

TSAYe: Milieu gélosé (agar) Trypticase soja avec extrait de levure

TSBYe: Bouillon de Trypticase soja avec extrait de levure

UFC: Unité formant colonie

UG: Unité génome

PRESENTATION GENERALE

Annuellement, le centre pour le contrôle et la prévention des maladies aux Etats-Unis (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) a estimé à 48 millions de malades, 128 000 hospitalisations et 3 000 morts dus à des maladies transmises par les aliments (Batz, et al., 2012). Le pourcentage de population souffrant chaque année d'une maladie transmise par les aliments est estimé à 30%. En France, par exemple, au cours de la période 1996-2005, les épidémies ont entraîné 7364 hospitalisations et 45 décès (Delmas, et al., 2006). Entre 2006 et 2008, 3 127 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été déclarés aux autorités sanitaires en France. Elles concernaient 33 404 malades dont 2 302 ont été hospitalisés et 15 sont décédés (Delmas, et al., 2010). Par conséquent, la contamination des aliments induit un coût très élevé, tant social qu'économique : aux USA, par exemple, les dépenses annuelles induites par les maladies dues aux principaux pathogènes sont estimées à 3500 millions de dollars US (1997) en dépenses médicales et pertes de productivité. Il est maintenant reconnu que les surfaces des ateliers et des équipements dans les agro-industries sont impliquées dans la contamination des aliments et *in fine* d'une quantité non négligeable des intoxications alimentaires. Selon Haeghebaert, et al. (2001) la contamination des équipements aurait été à l'origine d'environ 40% des TIAC en France entre 1996 et 1998. Plus récemment, il a été estimé que près de 25% des infections alimentaires sont induites au cours des procédures de transformation des aliments et il a également été décrit dans des épidémies récentes de listérioses au Canada en 2008 et aux Etats-Unis en 2011 que des problèmes de nettoyage et désinfection pouvaient être mis en cause avec une persistance de *Listeria monocytogenes* dans les industries agro-alimentaires. En effet, la présence de biofilms sur les surfaces affecte largement l'hygiène des surfaces

(Carpentier et Cerf, 1993, Leriche et Carpentier, 1995, Norwood et Gilmour, 1999, Lindsay, et al., 2002, Midelet-Bourdin, et al., 2006). Il a été estimé que *L. monocytogenes* par exemple, dont la principale voie de contamination est la voie alimentaire, causait plus de 2500 maladies par an aux Etats-Unis dont 500 cas mortels et 300 cas dont 80 cas mortels en France. Le nombre de cas humains de listérioses a par ailleurs augmenté de 59% ces 5 dernières années dans l'Union Européenne (European Food Safety Authority, 2007a) avec un taux élevé de mortalité (14,2%) (European Food Safety Authority, 2007b), surtout parmi les populations dites à risque (femmes enceintes, personnes immunodéprimées, personnes âgées) avec des symptômes cliniques de type méningite, bactériémie, encéphalite, listériose fœto-maternelle ou néonatale. De plus, *L. monocytogenes* est capable d'adhérer à diverses surfaces telles que le verre, l'acier inoxydable, le polystyrène ou encore le tétrafluoroéthylène (téflon) et de se développer par la suite en biofilm (Di Bonaventura, et al., 2008, Blatter, et al., 2010, Branger, 2012). La formation de biofilm contribue fortement à la résistance accrue des bactéries à des agressions environnementales (dessiccation, manque de nutriments...) et à des traitements rencontrés en entreprise (procédure de nettoyage-désinfection). Les biofilms sont donc à l'origine de la persistance de *L. monocytogenes* dans les environnements industriels pendant de longues périodes, ce qui pose de sérieux problèmes en termes de sécurité sanitaire des aliments puisque cela peut-être à l'origine de source(s) de contamination ou de recontamination d'aliments. Un des principaux facteurs conférant cette protection aux cellules bactériennes en biofilm est la présence d'une matrice gélatineuse, composée de protéines, d'ADNe et d'exopolysaccharides. Par sa simple présence, cette matrice gélatineuse, aussi appelée matrice extracellulaire, confère une protection passive des cellules bactériennes grâce à un simple effet barrière contre l'entrée des agents antimicrobiens, détergents et antibiotiques. Cette matrice extracellulaire confère également une protection active en

favorisant la communication cellulaire notamment via le quorum sensing. Il est admis que la matrice extracellulaire des biofilms de la majorité des espèces bactériennes est composée principalement de polysaccharides qui ont été identifiés pour plusieurs espèces des genres bactériens *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* (Flemming et Wingender, 2010). Les exopolysaccharides identifiés peuvent être de différentes nature, même au sein d'une même espèce bactérienne. Ce sont de longues molécules, linéaires ou ramifiées, avec une masse moléculaire allant de 500 Da à 200 kDa. Il n'y a pas d'études sur la composition et la structure des exopolysaccharides présents dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*.

L'objectif principal de ce travail de recherche a été de caractériser les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* et d'étudier leur rôle, de l'adhésion bactérienne à la formation et au détachement du biofilm sur de l'acier inoxydable.

Dans un premier temps, nous avons fait un état de l'art sur la problématique de *L. monocytogenes* dans les biofilms en appuyant sur la partie composition et rôle de la matrice extracellulaire.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms versus les polysaccharides pariétaux. Une fois la nature des exopolysaccharides identifiée, la capacité d'adhésion et de formation des biofilms par des mutants géniques exprimant des exopolysaccharides modifiés ou bloqués dans leurs voies de biosynthèse a été étudiée ainsi que leur résistance à l'application d'une action mécanique seule ou associée à une action chimique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. *Listeria monocytogenes*

1.1 Le genre *Listeria*

La découverte officielle de *Listeria* remonte à 1924, lorsqu' E.G.D. Murray, R.A. Webb et M.B.R. Swann isolent une bactérie responsable d'une septicémie affectant les lapins et les cobayes de leur laboratoire à Cambridge en Angleterre. Cette bactérie, encore jamais décrite, est baptisée *Bacterium monocytogenes* (Murray, et al., 1926). Les premiers cas de listérioses humaines ont été signalés en 1929 au Danemark (Nyfelt, 1929). Cependant, le premier isolement de cette bactérie date de 1921, en France, par Dumont et Cotoni à partir d'un patient atteint d'une méningite (Dumont et Cotoni, 1921). Suite à sa détection chez l'homme, les animaux, la nourriture et l'environnement, Pirie (1940) définit le genre *Listeria* et décrit la bactérie comme un bacille Gram positif, catalase positif. Dès 1973, les premières études d'hybridation ADN - ADN ont suggéré l'hétérogénéité génomique des souches regroupées sous la dénomination de *Listeria monocytogenes*. Rocourt, et al. (1983) furent les premiers à distinguer l'espèce *L. monocytogenes* des autres espèces de *Listeria* par des méthodes biochimiques puis par comparaison génétique. Le genre *Listeria* appartient au phylum des Firmicutes, proche du genre *Bacillus*. Elle fait partie de la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacilliales* et à la famille des *Listeriaceae*. Actuellement, 18 espèces de *Listeria* ont été identifiées : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. denitrificans*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis* (Wiedmann, 2002, Graves, et al., 2010, Leclercq, et al., 2010, Bertsch, et al., 2013, Lang Halter, et al., 2013), et plus récemment publiées, les espèces *L. floridensis*, *L. aquatica*,

Tableau 1 : Antigènes somatiques et flagellaires utilisés dans le sérotypage de *Listeria monocytogenes*.

Sérotype	Antigènes somatiques (O) ¹	Antigènes flagellaires (H)
1/2a	I, II, III	A, B
1/2b	I, II, III	A, B, C
1/2c	I, II, III	B, D
3a	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B
3b	II, III, IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II, III, IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	III, (V), VII, IX	A, B, C
4ab	III, V, VI, VII, IX, X	A, B, C
4b	III, V, VI	A, B, C
4c	III, V, VII	A, B, C
4d	III, (V), VI, VIII	A, B, C
4e	III, V, VI, (VIII), X	A, B, C
7	III, XII, XIII	A, B, C

¹ () : indique les facteurs qui ne sont pas systématiquement détectés

L. cornellensis, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae* et *L. newyorkensis* (den Bakker, et al., 2014, Weller, et al., 2015). Suite à des analyses moléculaires, une dix-neuvième espèce de *Listeria*, *L. murrayi*, a été rétrogradée au rang de sous-espèce de *L. grayii* (Boerlin, et al., 1992, Hof et Rocourt, 1992). Il existe également les sous-espèces *Listeria fleischmannii subsp. coloradonensis*, *Listeria fleischmannii subsp. fleischmannii*, *Listeria ivanovii subsp. londoniensis*.

L. ivanovii et *L. monocytogenes* sont les 2 seules espèces de *Listeria* pathogènes pour l'homme et les mammifères. Elles sont responsables d'une maladie appelée la listériose. *L. ivanovii* atteint principalement les ruminants (Vazquez-Boland, et al., 2001) mais fut également isolée à de rares reprises à partir d'humains infectés (Guillet, et al., 2010). La rareté des infections humaines causées par *L. ivanovii* peut résulter d'une pathogénicité faible pour les humains mais aussi de sa faible occurrence dans les sources environnementales ou animales. *L. monocytogenes* est pathogène pour les animaux et les humains, et est la principale responsable des cas de listérioses.

Une des premières méthodes permettant de caractériser et de discriminer les souches de *L. monocytogenes* lors d'épidémies a été le sérotypage par agglutination. Mise en place par Paterson (1940) puis modifiée par Seeliger et Hohne (1979), cette technique est basée sur des réactions Anticorps/ Antigènes. Les familles d'antigènes ciblés sont les antigènes somatiques (O) qui sont au nombre de 13 et les antigènes flagellaires (H) qui sont au nombre de 4. Il a été défini treize sérotypes de *L. monocytogenes* : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7 (Seeliger et Hohne, 1979, Kathariou, 2002) (Tableau 1)

1.2 La listériose

1.2.1 La maladie et ses symptômes

La listériose est une maladie rare mais grave avec un taux de mortalité entre 20 et 30%. Les signes cliniques de la listériose permettent une distinction en deux catégories, la listériose non-invasive et la listériose invasive.

La première citée, aussi appelée gastro-entérite fébrile à *Listeria*, concerne les cas présentant les symptômes de la gastro-entérite, tels que la diarrhée, des fièvres céphalées et myalgies, peu de temps (12 à 24 h) après l'ingestion des aliments infectés (Salamina, et al., 1996, Dalton, et al., 1997, Aureli, et al., 2000, Donovan, 2015) . Dans la majorité des cas, ce sont des personnes en bonne santé qui ont ingéré un aliment fortement contaminé. L'infection dure quelques jours puis *L. monocytogenes* est éliminée par les fèces.

Pour la listériose invasive, elle touche principalement une population dite à risque (femmes enceintes, fœtus, personnes âgées et personnes immunodéprimées). La listériose invasive intervient lorsque l'infection ne se limite pas au tissu intestinal et se propage à d'autres parties du corps telles que le placenta contenu dans l'utérus lors d'une grossesse, le système nerveux central ou le sang. Les symptômes sont plus graves comme des encéphalites, méningites, septicémies et fausses couches. De nombreuses restrictions sont conseillées aux femmes enceintes qui ont 12 fois plus de risque qu'une personne normale de développer une listériose après ingestion d'aliments contaminés. La mère ne sera pas gravement malade dans la majorité des cas mais la bactérie via la circulation sanguine peut coloniser le placenta. Le bébé peut alors mourir ou être atteint d'une listériose dès la naissance.

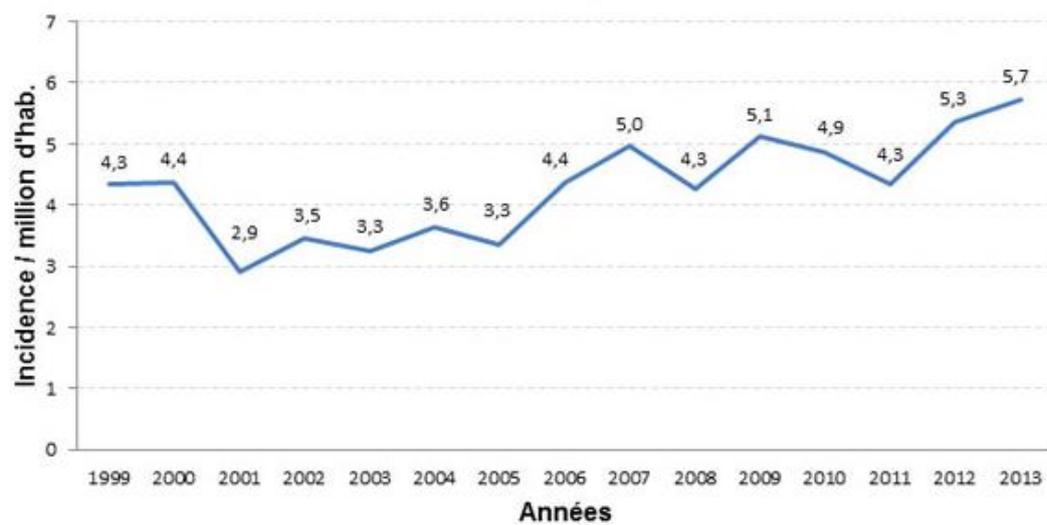


Figure 1 : Incidence de la listériose par million d'habitants en France métropolitaine de 1999 à 2013 (Institut de veille sanitaire, 2014).

La majorité des cas de listérioses humaines a été associée à des souches de sérotype 4b (Rocourt, et al., 2000, Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007), bien que des souches de sérotypes 1/2a et 1/2b aient aussi été isolées de patients (Nelson, et al., 2004).

1.2.2 Incidence de la listériose

Les maladies transmises par les aliments, y compris les listérioses, ont bien entendu un coût humain et économique conséquent. de Noordhout, et al. (2014) ont estimé que *L. monocytogenes* infectait 23 150 personnes avec 5463 morts d'entre eux (23,6%) au niveau mondial en 2010 sur la base d'une population mondiale de 6 860 035 412. Des aliments de différentes natures ont été impliqués dans plusieurs épidémies de listérioses depuis les années 1980 comme par exemple des produits de charcuterie, des fromages (Ericsson, et al., 1997, Brett, et al., 1998, Tham, et al., 2000). La listériose est une maladie à déclaration obligatoire dans plusieurs pays comme le Canada, la Belgique et la France.

En 2012, il y a une augmentation de 10,5 % des cas de listérioses (1642 cas) en Europe par rapport à 2011 et de 8,6% en 2013 (1763 cas avec 191 décès) (EFSA-ECDC, 2015). Aux Etats-Unis, le centre de prévention et de contrôle des maladies (Center for Diseases Control and Prevention ou CDC) a estimé que près de 1 600 maladies et 260 décès sont causés chaque année par *L. monocytogenes* (Scallan, et al., 2011). Les données d'incidence étaient de 0,26 par 100 000 personnes en 2013 aux Etats-Unis (Crim, et al., 2014) et de 0,41 cas pour 100 000 personnes en 2012 en Europe. En France, l'incidence de la listériose a beaucoup évolué au cours des années (Figure 1). Entre 1999 et 2005, l'incidence de la maladie est passée de 4,5 à 3,5 cas par million d'habitants. Depuis 2006, elle a augmenté pour atteindre 5,7 cas par million d'habitants en 2013. En 2013, 369 cas de listérioses et 64 décès sont survenus en France (létalité 17 %) (Tourdjman, et al., 2014). Cette augmentation d'incidence est surtout observée chez les sujets très âgés et ceux présentant des comorbidités,

et a également été constatée dans d'autres pays européens (Goulet, et al., 2008). Les raisons de cette augmentation ne sont pas clairement établies, mais elles semblent davantage liées à une augmentation de la population sensible qu'à une circulation accrue de produits contaminés. Les plans de surveillance et de contrôle de la contamination des denrées alimentaires par *L. monocytogenes* suggèrent en effet, d'après l'échantillonnage effectué, une amélioration constante de la qualité microbiologique des aliments depuis 1993 (Tourdjman, et al., 2014).

1.2.3 Exemples d'épidémies récentes avec pour source de contamination l'environnement ou une contamination croisée

Plus de 79 épidémies ont été rapportées dans la littérature à ce jour dont 12 en France (Annexe 1) Les produits incriminés dans les épidémies les plus récentes étaient de diverses natures comme par exemple de la charcuterie, des fromages et du melon Cantaloup.

En 2008, le Canada a connu deux importantes épidémies de listérioses. La première épidémie fut responsable de 57 cas de listérioses avec 23 décès. L'enquête épidémiologique, la traçabilité des produits et l'isolement des souches responsables de l'épidémie dans des prélèvements environnementaux et dans des échantillons d'aliments ont confirmé l'implication de produits de charcuterie fabriqués par une entreprise et vendus principalement à des institutions, et qui étaient à la source de l'épidémie. Durant une augmentation de l'activité de l'entreprise, la bactérie avait vraisemblablement établi un biofilm au sein de deux trancheuses à viande que les procédures classiques de nettoyage désinfection n'auraient pas suffi à éliminer (Currie, et al., 2015). La deuxième épidémie fut responsable de 41 cas de listérioses avec 2 décès (Gaulin, et al., 2012). Après enquête, il a été démontré qu'environ 40% des personnes avaient consommé des produits provenant de l'usine A. Dans cette entreprise, le procédé de pasteurisation des fromages n'était pas déficient ce qui suggérait que

la contamination devait être post-pasteurisation avec une source environnementale. Environ 55% des autres personnes avaient acheté les fromages dans des commerces qui recevaient des produits de cette entreprise. La manipulation et la coupe de ces fromages contaminés ont probablement contribué à la contamination d'autres fromages dans les différents commerces. Le phénomène de contamination croisée a vraisemblablement été très important dans cette épidémie.

En 2009, la contamination d'un fromage à partir de caillé acide produit en Autriche a été responsable d'une épidémie touchant l'Autriche mais aussi l'Allemagne et la République Tchèque, lieux d'exportation des fromages. Deux clones d'une souche de sérotype 1/2a ont été responsables de 34 cas avec 8 décès. Suite à cette épidémie, Fretz (2010a, 2010b) a souligné l'importance du typage moléculaire des souches isolées des patients. En effet cela permet l'identification rapide de la souche responsable et donc son origine. De plus, comme vu dans cette épidémie, la mondialisation permet l'exportation de denrées alimentaires dans le monde entier et met en avant la nécessité de collaborations internationales.

En 2011, une épidémie de listériose a frappé les Etats-Unis à travers plusieurs états où au moins 147 personnes ont été atteintes, au moins 33 personnes sont décédées et une femme enceinte a fait une fausse couche. Quatre souches de *L. monocytogenes* étaient associées à cette épidémie qui avait pour origine des melons cantaloups entiers provenant d'une seule ferme, la Jensen Farm. Les melons étaient entiers et contaminés à leur surface. Le consommateur contaminait la chair en tranchant le melon. Les enquêtes menées par le CDC ont permis de mettre en évidence plusieurs facteurs ayant entraîné la contamination des melons et de souligner le rôle des équipements dans la contamination. Les souches de *L. monocytogenes* ont été retrouvées sur des équipements sales et corrodés, achetés d'occasion et

précédemment utilisés pour des pommes de terre. De plus, de l'eau contaminée a été retrouvée sur le sol du lieu de conditionnement. Il a été établi que les employés marchaient dans cette eau et propageaient la contamination. Cette eau contaminée était aussi présente sur les tapis de convoyage des melons. Il a également été prouvé que le sol de la ferme était dépourvu de *L. monocytogenes* et donc que la contamination provenait bien du lieu de conditionnement. De plus, un camion de transport, pris d'une ferme de bétail, utilisé pour récupérer les melons cueillis, a été suspecté d'être à l'origine de l'arrivée de *Listeria* dans la ferme de Jensen (McCollum, et al., 2013).

Dans quatre états des Etats-Unis, 10 personnes ont été infectées avec plusieurs souches de *Listeria*. Les personnes malades dans la période 2010-2014 ont été identifiées grâce à une rétrospective de la base de données ADN de FoodNet qui avaient des profils identiques à ceux de prélèvements de crème glacée de l'entreprise Blue Bell Creameries (CDC, 2015).

Entre 2014 et 2015, une éclosion de listériose au Danemark a entraînée 47 cas de Listériose dont 17 décès. Il s'avère que le produit incriminé était de la viande de sandwichs « rullepølse ». La contamination proviendrait d'un équipement de découpe et d'autres équipements seraient impliqués car ils ont été en contact avec le produit.

Dans plusieurs épidémies, la persistance de souches de *L. monocytogenes* malgré des procédures de nettoyage désinfection a été montrée, ce qui suggère fortement la présence de biofilm bactérien.

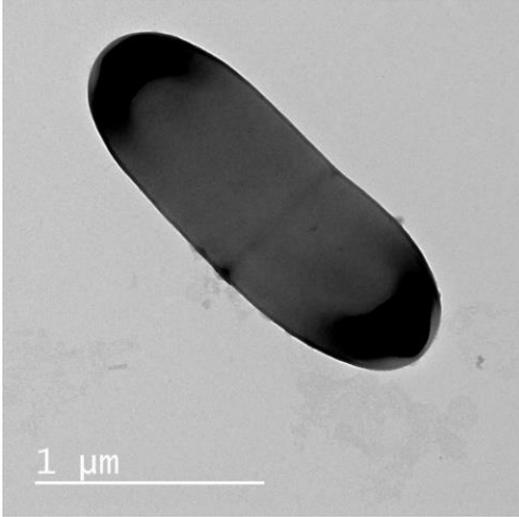


Figure 2 : Cellule de *L. monocytogenes* observée par microscopie électronique en transmission (Source : ANSES, Boulogne Sur Mer).

1.3 Caractéristiques microbiologiques et cellulaires de *Listeria monocytogenes*

1.3.1 Morphologie et conditions de culture

Listeria monocytogenes est décrite comme un petit bacille Gram positif, non capsulé, non sporulé, formant des bâtonnets aux bouts arrondis mesurant de 1 à 2 μm de long sur 0,4-0,5 μm de diamètre (Figure 2). Les bactéries sont mobiles entre 20 et 28°C par une flagellation péritriche formée de 4 à 6 flagelles par bactérie. La biosynthèse des flagelles est température dépendante et se produit à des températures inférieures ou égales à 30°C. A 37°C (température de l'hôte), la majorité des souches ne produisent pas de flagelles et sont donc immobiles (Nilsson, et al., 2011).

L. monocytogenes est une bactérie ubiquitaire saprophyte facultative qui peut vivre dans les sols et la végétation. Elle dispose d'une forte capacité d'adaptation et peut survivre ou se multiplier dans des conditions difficiles. Le pH optimal se situe aux alentours de 7 mais *Listeria* peut croître en présence d'un pH compris entre 4 et 9,6 (ANSES, 2011). Elle est halotolérante et peut survivre à des concentrations de 10% de NaCl. Certaines souches peuvent supporter jusque 20% de sel dans le milieu environnant. Enfin, la valeur optimale de l' a_w est de 0,99 avec une croissance possible jusque 0,92. Elle peut croître à des températures allant de -2°C à 45°C, avec un optimum de température compris entre 30 et 37°C.

Sur gélose nutritive, *L. monocytogenes* forme des colonies lisses de 0,5 à 1,5 μm , légèrement convexes, translucides, aux bords réguliers. Elle est également β -hémolytique sur gélose au sang. En trans-illumination oblique, les colonies présentent une coloration bleu-verte caractéristique. Dans certaines conditions de stress (acide, salin...)

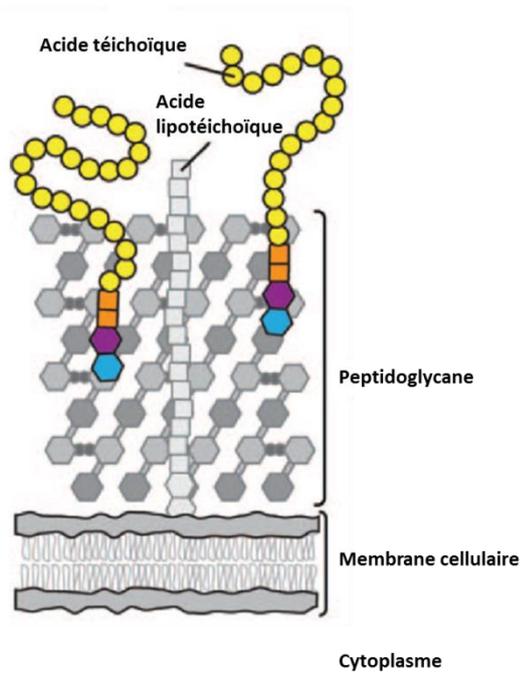


Figure 3 : Structure de la paroi des bactéries Gram positif (Swoboda, et al., 2010).

(Bereksi, et al., 2002, Hazeleger, et al., 2006, Giotis, et al., 2007) ou en mode de croissance sessile (Monk, et al., 2004), les cellules peuvent s'allonger jusqu'à atteindre une longueur de 55 μm (Bereksi, et al., 2002) et former des colonies dites rugueuses retrouvées également lorsque l'incubation des géloses est prolongée. Une troisième forme a également été décrite chez *L. monocytogenes*, appelée « L-form » et correspondant à des bactéries dépourvues de peptidoglycane et de paroi cellulaire. Dell'Era, et al. (2009) ont décrit des souches de *L. monocytogenes* présentant une morphologie de type L-form stable et non réversible.

1.3.2 Description de la paroi cellulaire et plus particulièrement des polysaccharides

L'une des principales différences entre les micro-organismes Gram négatif et ceux Gram positif est l'absence d'une membrane externe et d'un périplasme chez les Gram positif (Figure 3). Par conséquent la couche de peptidoglycane, présente chez les deux types de micro-organismes, est beaucoup plus épaisse chez les micro-organismes Gram positif. Cette épaisse couche de peptidoglycane stabilise la membrane cellulaire et fournit également de nombreux sites auxquels d'autres molécules de nature protéique ou glucidique peuvent être attachées. Une classe importante des glycopolymères de la paroi cellulaire est l'acide téichoïque. C'est un polymère anionique représentant 30 à 60 % de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif (Neuhaus et Baddiley, 2003) et il est fixé de manière covalente au peptidoglycane. Il se distingue de son homologue, les acides lipotéichoïques qui sont ancrés à la membrane plasmique et qui présentent une fonction lipidique (Figure 3).

Les deux types de polymères (acides téichoïques et acides lipotéichoïques) se composent d'une chaîne principale de poly (ribitol phosphate) ou de poly (glycérol phosphate) ancrée au peptidoglycane via une unité de liaison formée par un N-Acetylmannosamine lié en $\beta 1 \rightarrow 4$ avec un N-Acétyleglucosamine (ManNAc($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc) disaccharide avec 3 glycérols

Tableau 2 : Quantification des composants des acides téichoïques de la paroi cellulaire selon le sérotype de *Listeria* (Fiedler, 1988).

Strain	Serotype	Species	Ribitol, sugars, glucosamine, phosphorus nmol per mg of cell walls; molar ratios to ribitol					
			Ribitol	Rhamnose	Glucose	Galactose	Glucosamine	Phosphorus
ATCC 15313	½a	L. m.	793	1026	-	-	650	890
			1	1.3	-	-	0.8	1.1
SLCC 2755	½b	L. m.	1	1.2	-	-	0.7	1.2
SLCC 3954	½b	L. s.	1	1.1	-	-	0.6	1.4
NCTC 5348	½c	L. m.	1	1.2	-	-	0.7	1.2
SLCC 2373	3a	L. m.	1	-	-	-	0.9	1.4
SLCC 1694	3b	L. m.	1	-	-	-	1.0	1.4
SLCC 2479	3c	L. m.	1	-	-	-	0.7	1.3
SLCC 2374	4a	L. m.	1	-	-	1.1	0.6	1.1
NCTC 10527	4b	L. m.	1	-	1.0	1.1	0.9	-
NCTC 10528	4ab	L. m.	1	-	0.9	-	0.7	0.9
SLCC 2376	4c	L. m.	1	-	-	1.1	0.9	1.2
SLCC 2377	4d	L. m.	1	-	1.0	-	0.6	1.0
SLCC 2378	4e	L. m.	1	-	-	1.0	0.5	0.9
SLCC 2487	7	L. m.	1	-	-	-	-	0.9
NCTC 11288	6a	L. i.	1	-	-	1.1	1.0	1.0
SLCC 5334	6a	L. w.	1	-	-	1.2	0.9	1.1
NCTC 11289	6b	L. i.	1	-	1.1	-	0.9	1.4
ATCC 19119	5	L. iv.	1	-	0.8	-	0.7	0.8
ATCC 25401		L. mu.	1	-	-	-	0.2	1.2
ATCC 19129		L. g.	1	-	0.4	0.2	-	-

L. g.: *Listeria grayi*;
 L. i.: *Listeria innocua*;
 L. iv.: *Listeria ivanovii*;
 L. m.: *Listeria monocytogenes*;
 L. mu.: *Listeria murrayi*;
 L. w.: *Listeria welshimeri*

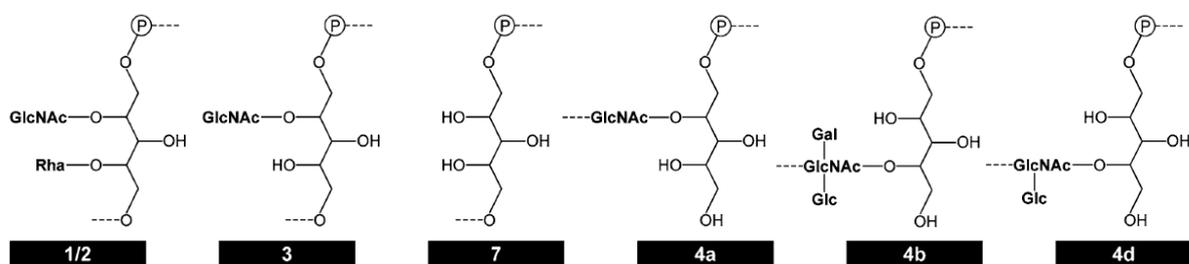


Figure 4 : Structure des acides téichoïques pariétaux de *L. monocytogenes* selon le sérotype (Eugster et Loessner, 2014)
 GlcNAc : N-acétylglucosamine, Rha : Rhamnose, Gal : Galactose, Glc : Glucose.

phosphates attachés au C4 hydroxyle du résidu ManNAc du peptidoglycane (Neuhaus et Baddiley, 2003, Swoboda, et al., 2010). Alors que les acides lipotéichoïques se composent d'un poly(glycérol phosphate), les acides téichoïques pariétaux de *L. monocytogenes* sont formés d'un poly(ribitol phosphate) pouvant être estérifié par des acides aminés ou glycosylé (Fiedler, 1988, Eugster et Loessner, 2012).

Les substitutions glycosydiques des acides téichoïques pariétaux ont été décrits dans les années 80-90 et sont variables selon le sérotype de *Listeria*. Les premières études ont décrit les compositions et les structures de souches de *L. monocytogenes* de sérotypes 1a, 3a, 4a, 4b, 4d, 4f, 6 et 7 (Kamisango, et al., 1983, Fiedler, et al., 1984, Fujii, et al., 1985, Kamisango, et al., 1985, Uchikawa, et al., 1986). En 1988, après une évolution importante de la classification des espèces et des sérotypes de *Listeria*, Fiedler (1988) a réalisé un travail récapitulatif en redéfinissant les compositions d'acides téichoïques identifiés en fonction des sérotypes et des espèces de *Listeria* nouvellement définies (Tableau 2). Aujourd'hui, la composition des acides téichoïques pariétaux des 13 sérotypes de *L. monocytogenes* est décrite mais des études structurales manquent encore pour les sérotypes 4ab, 4c et 4e (Figure 4).

Les acides téichoïques pariétaux des sérogroupe 1/2 (sérotypes 1/2a, 1/2b et 1/2c) et 3 (sérotypes 3a, 3b et 3c) sont substitués d'un *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et/ou d'un rhamnose (Rha) liés aux C2 et aux C4 des ribitols de la chaîne principale de poly (ribitol phosphate). Au contraire, pour les souches du sérogroupe 4, le GlcNAc n'est pas substitué à la chaîne de poly (ribitol phosphate) mais est directement incorporé dans les chaînes de poly (ribitol phosphate) et porte selon le sérotype (4a, 4b...) des substitués de galactose (Gal) et/ou de glucose (Glc). Les souches de sérotype 4a sont les seules à ne pas présenter de

Tableau 3: Gènes identifiés comme intervenant dans la voie de biosynthèse et la glycosylation des acides téichoïques pariétaux de *L. monocytogenes*.

Gènes	Fonctions géniques	Fonctions	Références
<i>lmo2537</i>	UDP-N-acétylglucosamine 2-épipimérase	Intervient dans l'unité de liaison entre l'acide téichoïque de type 1/2a et le peptidoglycane	(Dubail, et al., 2006)
<i>tagO1</i> (<i>lmo0959</i>) <i>tagO2</i> (<i>lmo2519</i>)	UDP-GlcNAc:undecaprenyl phosphate GlcNAc-1-phosphate transférases	Intervient dans l'unité de liaison entre l'acide téichoïque de type 1/2a et 4b et le peptidoglycane	(Eugster et Loessner, 2012)
<i>lmo2549</i> (<i>gtcA</i>)	Glycosyltransférase	Ramifie le GlcNAc sur les acides téichoïques pariétaux de type 1/2a Ramifie le Gal et le Glc sur les acides téichoïques pariétaux de type 4b	(Promadej, et al., 1999, Autret, et al., 2001, Cheng, et al., 2007, Eugster, et al., 2011)
<i>lmo2550</i> (<i>csbB</i>)	Glycosyltransférase	Ramifie le GlcNAc sur les acides téichoïques pariétaux de type 1/2a	(Eugster, et al., 2011)
<i>lmo1079</i>	Glycosyltransférase	Ramifie le GlcNAc sur les acides téichoïques pariétaux de type 1/2a	(Eugster, et al., 2011)
<i>lmo1080</i>	Rhamnosyltransférase	Ramifie le Rha sur les acides téichoïques pariétaux de type 1/2a	(Eugster, et al., 2015)
<i>rmlACBD</i> (<i>lmo1081–1084</i>)	Biosynthèse d'TDP-Lrhamnose	Ramifie le Rha sur les acides téichoïques pariétaux de type 1/2a	(Eugster, et al., 2015)
<i>gltA gltB</i>	Glycosyltransférase	Ramifie le Glc sur les acides téichoïques pariétaux de type 4b	(Lei, et al., 2001, Faith, et al., 2009)
<i>glcV</i>	Glycosyltransférase	ND ¹	(Spears, et al., 2008)
<i>tagB</i> (<i>lmo1088</i>)	Glycosyltransférase	ND	(Deng, et al., 2010)
<i>tagD</i> (<i>lmo1089</i>)	Glycérol-3-phosphate cytidyltransférase	ND	(Deng, et al., 2010)

¹ : Non déterminé

substitutions sur le GlcNAc. Les souches de sérotype 4d portent une seule substitution Glc, alors que les souches provenant du sérotype 4b sont porteuses des deux substitutions Glc et Gal.

Récemment, plusieurs études se sont intéressées aux voies de biosynthèse de ces acides téichoïques pariétaux qui ont été décrites chez les 2 principaux modèles Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Swoboda, et al., 2010). Concernant *L. monocytogenes*, aucune voie n'a été proposée. Seuls quelques gènes ont été décrits comme intervenant soit dans l'unité de liaison de la chaîne principale de poly (ribitol phosphate) au peptidoglycane, soit dans la glycosylation (Tableau 3). Le gène *gtcA* a été mis en évidence comme intervenant dans la ramification du Gal et du Glc sur le GlcNAc des acides téichoïques pariétaux des souches de sérotype 4b (Promadej, et al., 1999). Les gènes *lmo1079*, *lmo2549* et *lmo2550* sont apparus essentiels dans la glycosylation des acides téichoïques pariétaux avec le GlcNAc (Eugster, et al., 2011, Eugster, et al., 2015) et le gène *lmo1080* et l'opéron *rml* essentiels dans la ramification du Rha sur les acides téichoïques pariétaux pour les souches de sérotype 1/2a. Lors de leur identification, les gènes *lmo2549* et *lmo2550* ont été nommés respectivement *gtcA* et *csbB* (Autret, et al., 2001) du fait de leur homologie de séquence avec le gène *gtcA* provenant des souches de *L. monocytogenes* de sérotype 4b (Promadej, et al., 1999), et avec le gène *csbB* de *B. subtilis* (Huang et Helmann, 1998). L'inactivation simultanée des gènes *gltA* et *gltB* a permis de mettre en évidence que ces 2 glycosyltransférases intervenaient dans la ramification du Glc sur le GlcNAc des acides téichoïques pariétaux des souches de sérotype 4b (Lei, et al., 2001). Le gène *glcV* a été identifié comme codant une glycosyltransférase intervenant dans la glycosylation des acides téichoïques pariétaux des souches de sérotype 1/2a mais la fonction précise de ce gène n'a pas été déterminée. En ce qui concerne la mise en place de la chaîne principale des acides

téichoïques pariétaux, le gène *lmo2537* codant une UDP-N-acétylglucosamine 2 – épimérase a été mis en évidence comme intervenant dans la formation de l'UDP-N-acétylmannosamine à partir d'UDP-GlcNAc, un précurseur nécessaire à la synthèse de l'unité de liaison entre l'acide téichoïque pariétal et le peptidoglycane. L'inactivation de ce gène bloque la synthèse des acides téichoïques pariétaux dans la phase précoce. Il en est de même pour les gènes *tagO1* et *tagO2*. Le gène *tagO* chez *B. subtilis* et *S. aureus* a été caractérisé comme codant une UDP-N-acétylglucosamine:undécaprényl-P N-acétylglucosaminyl 1-P transférase, qui est un enzyme responsable pour catalyser la première étape de la synthèse de l'unité de liaison de l'acide téichoïque (Swoboda, et al., 2010).

Eugster et Loessner (2012) ont identifié les gènes clés impliqués dans la synthèse des acides téichoïques chez *L. monocytogenes* dans le but de leur permettre de construire des mutants déficients afin d'évaluer l'affinité au domaine de liaison cellulaire C-terminal du bactériophage et de comprendre le rôle des acides téichoïques pariétaux. Ils ont mis en évidence qu'il existait 2 homologues du gène *tagO* chez *L. monocytogenes* ainsi que dans plusieurs espèces de *Listeria* : le gène *tagO1* (*lmo0959*) et le gène *tagO2* (*lmo2519*). L'inactivation simultanée de ces 2 gènes est nécessaire pour inactiver la biosynthèse des acides téichoïques pariétaux dans les souches de sérotypes 1/2a et 4b.

Récemment, un polysaccharide insoluble pariétal (poly- β - (1,4) -N-acétylmannosamine décoré avec un α -1,6-Gal terminal) a été identifié dans des cultures planctoniques d'un mutant $\Delta pdeB/C/D$ de la souche EGD-e, inactivé pour les gènes *pdeB/C/D*, et surproduisant ce polysaccharide induit par le c-di-GMP (Chen, et al., 2014, Koseoglu, et al., 2015). Ce polysaccharide insoluble n'a pas été trouvé ni dans la souche sauvage EGD-e, ni dans le mutant $\Delta pdeB/C/D \Delta pssC$, utilisé comme contrôle négatif par les

auteurs. De plus, ce polysaccharide n'a jamais été décrit dans d'autres micro-organismes Gram positif ou Gram négatif.

La caractérisation des voies de biosynthèse des acides téichoïques dans différents modèles Gram positif et des travaux de mutagenèse dirigés ont permis d'attribuer de nombreuses fonctions aux acides téichoïques pariétaux notamment dans la division cellulaire, l'activité des autolysines, les propriétés physico chimiques de la surface cellulaire, la reconnaissance phagique et cellulaire, la sensibilité aux peptides antimicrobiens et l'homéostasie des cations (Weidenmaier et Peschel, 2008, Swoboda, et al., 2010, Holland, et al., 2011). Concernant *L. monocytogenes*, les acides téichoïques et leurs glycosylations sont apparus déterminants dans la reconnaissance phagique, la virulence ou pour la sensibilité aux peptides antimicrobiens (Dubail, et al., 2006, Eugster, et al., 2011, Eugster et Loessner, 2012, Carvalho, et al., 2015). Ils sont donc depuis peu classés comme facteurs de virulence de *L. monocytogenes* (Dubail, et al., 2006).

Chapitre 2. Les biofilms de *Listeria monocytogenes*

2.1 Historique et définition

La présence de bactéries adhérentes sur des surfaces est connue depuis maintenant de nombreuses années. Le terme de biofilm a été utilisé pour la première fois en 1943 par E. Zobell (1943). Il n'existe pas de réel consensus sur la définition du terme « biofilm » et il existe des différences suivant les auteurs. Nous avons retenu la définition de Sutherland (2001a) : « Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, autres...) fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice ». Van Leeuwenhoek, considéré comme l'un des fondateurs de la microscopie, fut le premier à observer des micro-organismes issus de grattages de sa propre surface dentaire

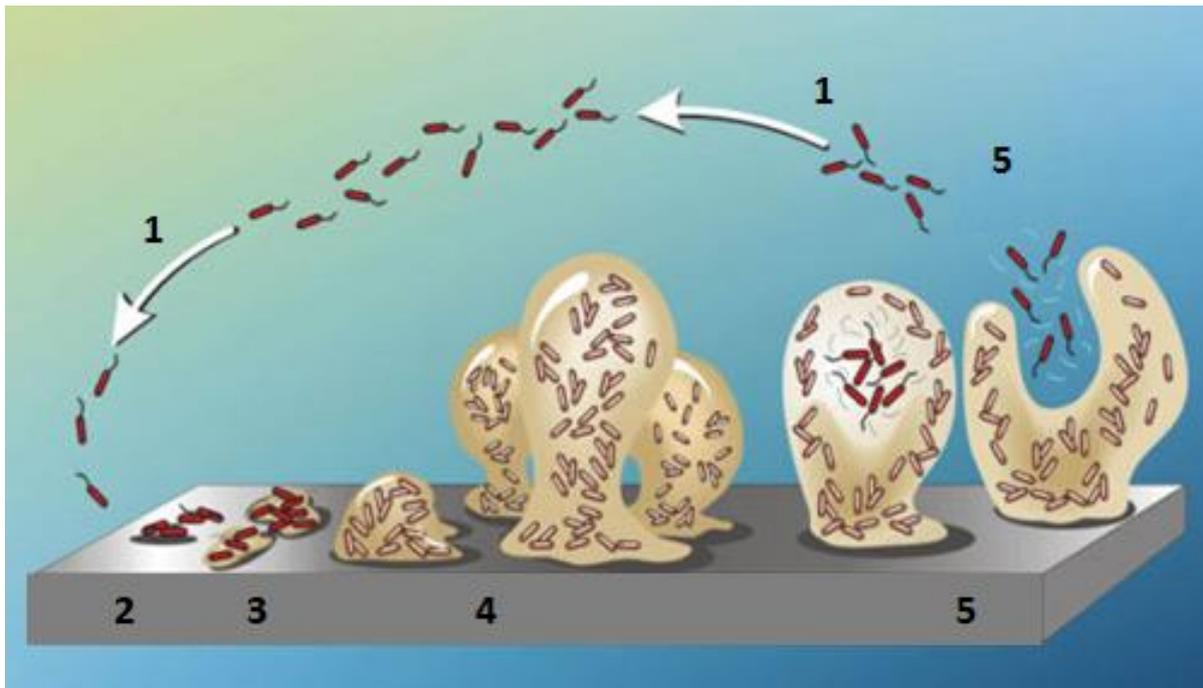


Figure 5: Représentation schématique de la formation d'un biofilm (Stoodley, et al., 2002). (1) transport des bactéries vers le support conditionné, (2) adhésion réversible des bactéries sur un film primaire, (3) adhésion irréversible et initiation de la sécrétion de matrice extracellulaire, (4) maturation du biofilm, (5) détachement et transport des bactéries vers le support.

dans les années 1670 (Larousse, 2015). Il est donc considéré comme la personne ayant découvert les biofilms. En 1940, Heukelekian et Heller mirent en évidence « l'effet bouteille » consistant en une croissance et une activité métabolique de micro-organismes marins renforcées par la présence d'une surface à laquelle les organismes peuvent s'attacher (Heukelekian et Heller, 1940). S'en sont suivies de nombreuses études sur les biofilms récemment répertoriées par Hoiby (2014).

2.2 Formation des biofilms

La formation d'un biofilm est influencée par un certain nombre de facteurs environnementaux comme la nature de la surface, le milieu et les micro-organismes. Il est admis que ces facteurs interviennent dans 5 processus successifs et cycliques amenant à la formation d'un biofilm dit « actif mature » (Figure 5) (Donlan, 2002):

- 1) le transport des bactéries vers leur support,
- 2) l'adhésion réversible des micro-organismes, caractérisée par des interactions non spécifiques où les cellules peuvent être facilement décrochées par un rinçage doux,
- 3) l'adhésion irréversible, caractérisée par des interactions spécifiques entre le support et la bactérie via les pili, les adhésines ou les exopolysaccharides,
- 4) la maturation du biofilm et la sécrétion de matrice extracellulaire,
- 5) le détachement des cellules.

2.2.1 Conditionnement de la surface

La formation d'un biofilm bactérien est généralement initiée lors de l'immersion d'un support dans un milieu aqueux (eau d'une rivière, condensation, jus de poissons...). Lors de l'immersion du support, des ions et des macro-molécules tels que des protéines, des lipides, des glucides et/ou des matières minérales vont être adsorbés spontanément sur la surface. Ce phénomène d'encrassement de la surface par des molécules permet la mise en place d'un film

appelé film primaire ou film conditionnant (Branger, 2012). Ce film conditionnant conduit à une modification des propriétés physico-chimiques de la surface d'origine (rugosité, polarité, caractère hydrophile/hydrophobe...), ce qui a pour conséquence de favoriser ou d'inhiber l'adhésion bactérienne (Stoodley, et al., 2002, Lorite, et al., 2011).

De plus, l'adsorption et l'accumulation de molécules organiques sur le support permettent une disponibilité en nutriment favorisant le chimiotaxisme et l'installation des micro-organismes sur la surface (Kumar et Anand, 1998, Garrett, et al., 2008).

2.2.2 *Le transport des bactéries vers le support*

La première étape de formation d'un biofilm est le transport des bactéries vers le support. Les bactéries peuvent soit provenir du milieu planctonique dans lequel baigne la surface, soit d'un biofilm présent dans l'environnement et qui est en phase de dispersion. Cette approche des bactéries sur la surface peut être divisée en 2 types : une approche dite « active » et une autre dite « passive » (Kumar et Anand, 1998).

L'approche active fait référence au mécanisme de mobilité des bactéries. Il est connu que la mobilité bactérienne augmente l'adhésion. Cette mobilité semble permettre aux bactéries de surmonter les forces électrostatiques de répulsion entre la surface bactérienne et le support ainsi que de se déplacer lors du chimiotaxisme (Percival, et al., 2011). Il a ainsi été mis en évidence chez *Bacillus cereus* qu'une mutation dans l'opéron responsable de la synthèse du flagelle empêchait l'adhésion des bactéries sur une surface en verre (Houry, et al., 2010).

L'approche passive, dépend plus du milieu dans lequel les bactéries évoluent (viscosité du milieu, force ionique) ainsi que le mouvement de ce dernier (écoulement, sédimentation flux brownien). La nature des surfaces joue aussi un rôle important, notamment le caractère hydrophile/hydrophobe (de la surface bactérienne et du support) mais aussi le pH et la température de la surface de contact (Kumar et Anand, 1998, Hori et Matsumoto, 2010).

2.2.3 *Adhésion des bactéries au support*

Suite à la phase de transport, l'étape d'adhésion « réversible » a lieu et elle est suivie d'une phase d'adhésion « irréversible ».

La phase d'adhésion dite « réversible » de contact des bactéries sur le support implique que les cellules bactériennes se trouvent à une distance de moins de 50 nm par rapport à la surface (Percival, et al., 2011). Cette étape est caractérisée par une adsorption de faible intensité des cellules bactériennes par le support faisant intervenir des forces de type Van der Waals, électrostatiques (souvent répulsives car la plupart des bactéries et des surfaces inertes sont chargées négativement), hydrophobes/hydrophiles pouvant conduire à une attraction ou à une répulsion (Carpentier et Cerf, 1993).

Trois théories ont été proposées pour décrire ce phénomène:

- La première théorie est celle de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) qui ne prend en compte que les forces de Lifshitz-Van der Waals (attractive) et les forces électrostatiques de Coulomb (attractive ou répulsive) (Marshall, et al., 1971, Chen et Strevett, 2003, Jacobs, et al., 2007).

Il est possible de distinguer deux types d'adhésion :

→ L'adhésion réversible où seules les forces de Van der Waals agissent ce qui permet à la bactérie d'être détachée facilement du support par des mouvements browniens,

→ L'adhésion irréversible où les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques, les substances polymériques extracellulaires (EPS) et les appendices bactériens agissent ensemble pour que la bactérie franchisse une zone de répulsion et puisse atteindre une distance de 2 à 1 nm de la surface.

Cette théorie ne prend pas en compte les interactions intermoléculaires pouvant se mettre en place entre la surface bactérienne et le support. En effet, à faible distance (2 nm), d'autres types d'interactions interviennent comme des liaisons hydrogènes. Cette théorie ne peut donc pas décrire le comportement d'un micro-organisme à proximité immédiate d'une surface, notamment dans un milieu aqueux, où les interactions hydrophiles et hydrophobes sont susceptibles d'être très importantes (Jacobs, et al., 2007, Hori et Matsumoto, 2010).

- La deuxième théorie est celle du mouillage, une approche thermodynamique qui prend en compte les interactions acido – basiques en plus des forces décrites dans la théorie DLVO. Les interactions acido-basiques sont dues aux caractères électron-donneurs et électron-accepteurs des espèces polaires en solution (Van Oss, et al., 1986, Morra et Cassinelli, 1997).

- La troisième théorie est celle de DLVO étendue (XDLVO) qui complète les modèles précédents en prenant en compte les interactions acide-bases de Lewis (Van Oss, et al., 1986, Hermansson, 1999, Grasso, et al., 2002). En effet, dans un milieu aqueux, les interactions acide-bases de Lewis (ou accepteur / donneur d'électrons) peuvent être attractives (attractions hydrophobes) ou répulsives (répulsions hydrophiles). Dans l'eau, ces forces sont responsables de toutes les interactions polaires, non-électrostatiques et non-covalentes. Bien qu'elle soit

plus rigoureuse, cette théorie ne constitue qu'une ébauche d'explication du processus complexe d'adhésion (Jacobs, et al., 2007).

Durant l'adhésion réversible, les bactéries sont encore facilement détachables par les mouvements browniens comme par exemple des forces de cisaillement induites par le milieu environnant. C'est d'ailleurs ce dernier paramètre qui permet de différencier la phase d'adhésion réversible de la phase d'adhésion irréversible.

En phase d'adhésion irréversible, les forces nécessaires pour le détachement des cellules doivent être beaucoup plus importantes (grattage, ultrasons, force de cisaillement) (Kumar et Anand, 1998, Palmer, et al., 2007). Dans cette phase, l'encrage des bactéries se met en place sur de courtes distances (1 à 1,5 nm). Cette notion d' « irréversibilité » est liée aux multiples points d'interaction conduisant à une liaison de forte énergie. L'hydrophobicité de surface, les appendices protéiques comme les pilis, les flagelles, ou les fimbriaes, et la composition et la proportion des EPS, influencent à la fois la vitesse et l'importance de l'adhésion microbienne (Garrett, et al., 2008, Percival, et al., 2011). Le passage entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible serait très rapide (de la seconde à la minute) (Compere, 1999, Palmer, et al., 2007).

2.2.4 La maturation du biofilm

Une fois que les bactéries ont adhéré solidement au support, elles vont accélérer leur division cellulaire pour développer le biofilm et lui donner son architecture. Cette augmentation de la masse bactérienne va être accompagnée d'une production plus intense d'EPS et notamment d'exopolysaccharides qui vont interagir avec des molécules organiques

et inorganiques du milieu environnant pour former la matrice extracellulaire (Dunne, 2002, Branger, 2012).

La capacité des biofilms bactériens à croître reste limitée par la disponibilité et la bonne diffusion des nutriments à travers cette matrice extracellulaire (Lawrence, et al., 1991, Dunne, 2002, Roux et Ghigo, 2006). D'autres facteurs peuvent contrôler la maturation du biofilm notamment le pH interne, la disponibilité en oxygène, la disponibilité en source carbonée, et l'osmolarité (Carpentier et Cerf, 1993).

2.2.5 *Détachement et dispersion des bactéries*

Après un certain temps, le vieillissement, un stress environnemental ou une carence nutritive provoquent une déstructuration du biofilm durant laquelle les couches externes du biofilm se détachent pour libérer les micro-organismes dans le milieu environnant (Dunne, 2002, Gjermansen, et al., 2005). La dispersion de ces micro-organismes peut être passive et/ou active. Le détachement passif implique le milieu environnant et les forces que ce dernier peut appliquer sur le biofilm provoquant la dispersion des micro-organismes (mouvements browniens, forces de cisaillement...). Le détachement actif implique directement les micro-organismes. Sous l'action du quorum sensing, des populations bactériennes vont exprimer, surexprimer ou réprimer des gènes facilitant la dispersion. Des bactéries vont ainsi produire des agents (protéase, DNase...) leur permettant de consommer la matrice extracellulaire qui les entourent afin de se procurer une source d'énergie et se séparer du biofilm (Stoodley, et al., 2002). C'est le cas de *S. aureus* qui, via le quorum sensing, régule l'expression d'une protéase facilitant la dispersion des bactéries. Il en est de même pour *Escherichia coli* K12 produisant la protéine régulatrice CsrA (Carbon storage regulator A) servant d'activateur de la dispersion des biofilms (Jackson, et al., 2002). Une fois libérées, les bactéries vont activer de

nouveaux gènes pour faciliter la colonisation d'un environnement moins hostile. Cela a été mis en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa* avec l'induction des gènes impliqués dans la synthèse des flagelles (Sauer, et al., 2004).

2.3 La matrice extracellulaire

Une fois l'adhésion au support faite, les bactéries commencent à sécréter une matrice adhésive et protectrice appelée matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire constitue une véritable barrière de protection pour les cellules bactériennes. En raison de l'environnement dans lequel se développe le biofilm, il est difficile de généraliser sur sa composition et son activité métabolique. Comme le montre Wimpenny et Wimpenny (2000), la nature de la matrice extracellulaire dépend de 2 facteurs : un facteur intrinsèque, dépendant du bagage génétique de l'espèce bactérienne, et un facteur extrinsèque dépendant de l'environnement dans lequel se forme et évolue le biofilm.

Le composant majoritaire de la matrice extracellulaire est l'eau qui peut représenter jusqu'à 97% du poids humide d'un biofilm (Schmitt et Flemming, 1999, Roux et Ghigo, 2006). En plus de l'eau, la matrice extracellulaire est constituée d'une association complexe de molécules : principalement des polymères mais aussi des nutriments, des métabolites, des produits de lyse cellulaire et tout autre débris provenant du milieu environnant. Les polymères présents dans la matrice extracellulaire sont aussi appelés EPS. Les EPS jouent un rôle essentiel dans l'architecture du biofilm. Ils sont responsables de la fixation du biofilm à la surface mais aussi de la cohésion de ce dernier. La nature des EPS peut considérablement varier selon les micro-organismes et l'environnement dans lequel se développe le biofilm. A l'origine, le terme « EPS » désignait exclusivement les polysaccharides extracellulaires

(exopolysaccharides), mais suite à la mise en évidence que d'autres composés étaient présents comme les protéines, les acides nucléiques, les lipides et d'autres biopolymères, la définition de ce terme s'est élargie à toutes ces molécules présentes dans la matrice extracellulaire (Kumar et Anand, 1998, Sutherland, 2001b, Hori et Matsumoto, 2010). Peu d'informations existent sur la composition de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*. Suite à une étude réalisée sur 6 souches de *L. monocytogenes*, Combrouse, et al. (2013) ont mis en évidence que les quantités d'EPS variaient selon les souches étudiées et le milieu de culture utilisé (pauvre ou riche). Une tendance est toutefois ressortie où les EPS seraient majoritairement de nature protéique et que la teneur en polysaccharides était généralement inférieure à la teneur en ADNe.

2.3.1.1 Protéines extracellulaires

La matrice extracellulaire peut dans certains cas contenir des quantités de protéines pouvant dépasser la teneur en polysaccharide sur le plan massique (Frølund, et al., 1996, Conrad, et al., 2003).

Il existe plusieurs familles de protéines retrouvées dans la matrice extracellulaire et impliquées dans la formation des biofilms bactériens :

- Les enzymes : Plusieurs enzymes ont été détectées dans les biofilms, dont beaucoup sont impliquées dans la dégradation des EPS ce qui a deux utilités. D'une part, un apport nutritif puisque la dégradation de polymères en plus petites molécules assimilables par les bactéries sont utilisables comme source d'énergie. D'autre part, en dégradant les EPS structuraux, ces enzymes facilitent le processus de détachement et de dissémination du biofilm et des bactéries. Allison, et al. (1998) ont montré que dans un biofilm de *P. fluorescens*, la carence en nutriment entraînait la sécrétion

d'une exopolysaccharide lyase dégradant la matrice du biofilm et facilitant donc la dispersion des bactéries.

○ Les protéines structurales :

- Les lectines font partie des protéines n'ayant pas d'activité enzymatique dans la matrice extracellulaire mais ayant une importance dans les interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire ou entre les cellules. Par exemple, *P. aeruginosa* produit 2 lectines LecA et LecB qui sont essentielles à la formation des biofilms (Thormann, et al., 2005). La présence de ces 2 composés dans la matrice extracellulaire a été confirmée par microscopie à fluorescence. LecB, qui est spécifique à la L-fucose, a été mise en évidence comme favorisant les interactions cellule/cellule.

- Les protéines associées au biofilm, Bap (biofilm associated protein) ont été mises en évidence comme essentielles dans la formation des biofilms de plusieurs espèces bactériennes comme par exemple *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella enterica* (Latasa, et al., 2006). Ces protéines sont généralement de grande taille (de 1800 à 8800 acides aminés) et interviennent dans l'adhésion bactérienne. Les protéines Bap sont présentes sur la surface cellulaire mais peuvent aussi être sécrétées dans le milieu. Ainsi, l'hypothèse est que les protéines Bap permettent de maintenir les cellules au sein du biofilm (Lasa et Penades, 2006).

- Les appendices protéiques comme les pilis, les flagelles, ou les fimbriaes sont également considérés comme des éléments structuraux du biofilm du fait de leurs interactions avec les divers EPS de la matrice extracellulaire. Par exemple, il a été mis en évidence que des pilis de type IV purifiés à partir de cellules de *P. aeruginosa* ont été capable de fixer de l'ADNe provenant de plasmides et de sperme de saumon, leur attribuant ainsi un potentiel rôle dans la fixation de l'ADNe des biofilms de *P. aeruginosa* essentiel dans l'architecture du biofilm (van Schaik, et al., 2005). De plus, certaines études transcriptomiques ont mis en évidence une surexpression des gènes codant les fimbriaes et les pilis dans des biofilms comparés à des cultures planctoniques, ce qui accentue l'idée que ces éléments sont bien des composants de la matrice extracellulaire (Sand et Gehrke, 2006, Van Houdt et Michiels, 2010).

La fonction des protéines extracellulaires dans les biofilms de *L. monocytogenes* a principalement été mise en évidence par l'utilisation de peptidases (ou protéases ou enzymes protéolytiques). Smoot et Pierson (1998) furent les premiers à étudier les protéines de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*. Après l'ajout de trypsine à 0,01% dans un bouillon de culture, ces derniers observèrent une réduction de 99,9% des bactéries adhérentes sur acier inoxydable et sur caoutchouc après écouvillonnage des surfaces et dénombrement sur milieux gélosés. Des colorations réalisées avec du cristal violet ont permis de mettre en évidence que des cellules de *L. monocytogenes* traitées préalablement à des concentrations sublétales en serratiopeptidase (SPEP), une métalloprotéase extracellulaire produite par *Serratia marcescens*, étaient incapables de former des biofilms de 24 h à 37°C dans un milieu riche bouillon cœur-cerveille sur polystyrène malgré une croissance non affectée (Longhi, et al., 2008). La protéinase K a également été décrite comme une enzyme

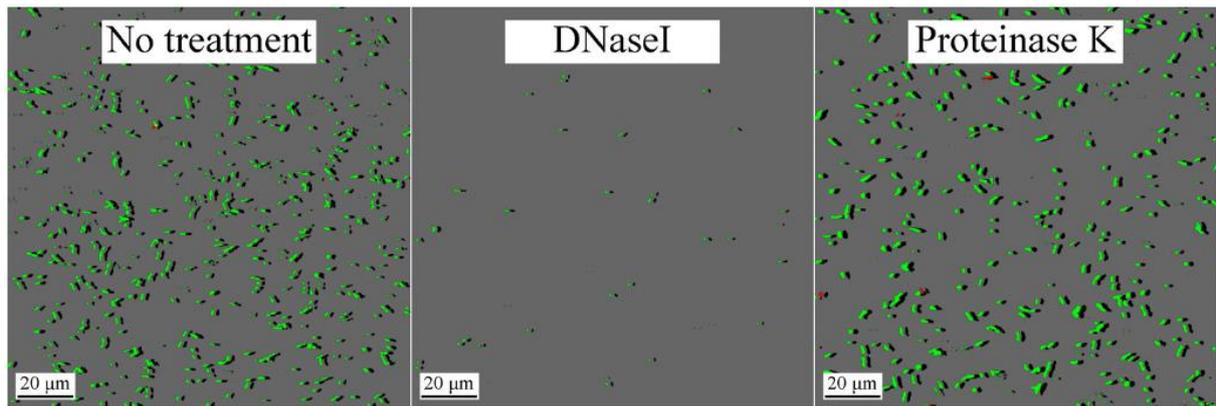


Figure 6 : Adhésion de la souche de *L. monocytogenes* EGD-e après 30 min d'incubation à 37°C sur verre. Les observations permettent de visualiser les cellules adhérentes de *L. monocytogenes* en présence de tampon phosphate salin (No traitement), et en présence de Tampon phosphate salin supplémenté en enzyme (DNase I ou protéinase K) (Harmsen, et al., 2010).

efficace pour la déstructuration des biofilms de *L. monocytogenes* provenant d'isolats cliniques (Franciosa, et al., 2009). Dans ces travaux, des mesures réalisées après coloration au cristal violet ont permis de mettre en évidence qu'un traitement à partir de protéinase K à 1 mg/ml durant 3 h à 37°C permettait de disperser 84 à 98% des biofilms de *L. monocytogenes* cultivés sur 40h à 32°C. Plus récemment, il a été mis en évidence que de la protéinase K appliquée à 1,6 µg/ml a permis de disperser totalement des biofilms de 3 jours formés par la souche de référence de *L. monocytogenes* EGD-e sur polystyrène ainsi que sur 568 autres souches de *L. monocytogenes* après 60 min d'action (Nguyen et Burrows, 2014). Sur des traitements de plus courte durée (5 min), l'enzyme a également été efficace puisque à partir d'une concentration finale de 25 µg/ml, les biofilms étaient totalement dispersés. Dans des conditions identiques, des résultats similaires ont été obtenus sur des biofilms cultivés sur acier inoxydable et traités à une concentration finale de 200 µg/ml de protéinase K (Nguyen et Burrows, 2014).

Par contre, Harmsen, et al. (2010) n'ont pas montré d'effet significatif de la protéinase K sur des biofilms formés sur verre de la souche de référence *L. monocytogenes* EGD-e (Figure 6). Ces différences peuvent s'expliquer par la nature de la surface qui varie entre les différentes études.

2.3.1.2 ADN extracellulaire

Tout comme les exopolysaccharides et les protéines, l'ADN extracellulaire (ADNe) est également un constituant de la matrice extracellulaire des biofilms bactériens. Par exemple, des traitements à la désoxyribonucléase (DNase) ont permis de mettre en évidence que les biofilms de *P. aeruginosa* possédaient des quantités importantes d'ADNe essentielles à l'intégrité du biofilm (Whitchurch, et al., 2002, Matsukawa et Greenberg, 2004, Tabak, et al., 2007). La libération d'ADN génomique issue de la lyse cellulaire semble être l'hypothèse

la plus probable sur l'origine de l'ADNe présent dans la matrice extracellulaire des biofilms. Cela a été mis en évidence chez *Enterococcus faecalis*, où de l'ADN chromosomique est libéré à la suite de l'autolyse d'une partie de la population cellulaire du biofilm (Thomas, et al., 2008). A l'heure actuelle, malgré de nombreuses hypothèses, aucune publication n'a mis en évidence l'excrétion active d'ADNe dans les biofilms bactériens.

La présence de l'ADNe dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* a notamment été mise en évidence par des traitements à la DNase. En effet, après coloration au cristal violet des biofilms, Nguyen et Burrows (2014) ont mis en évidence que des biofilms de *L. monocytogenes* de 3 jours, traités pendant 1 h avec des concentrations supérieures à 6,3 µg/ml de DNase I, entraînaient une dispersion de 60 à 70% des biofilms par rapport à ceux non traités. Des résultats similaires ont été obtenus par Harmsen, et al. (2010) qui ont testé des concentrations plus élevées en DNaseI (100µg/ml) sur 41 souches de *L. monocytogenes* (Figure 6). Dans leurs travaux, les biofilms ont été traités à différents temps (0, 9, 24 et 48 h) puis colorés avec du cristal violet après 51 h d'incubation. L'addition de DNase I dans les premières heures (de 0 à 24 h) a entraîné une réduction de l'adhésion bactérienne et de la formation des biofilms.

Plus récemment, Guilbaud, et al. (2015) ont observé par microscopie confocale des biofilms de *L. monocytogenes* colorés avec du Live/Dead® Bac Light™. L'architecture des biofilms était en nid d'abeille et contenait une quantité importante d'ADNe dans leur matrice extracellulaire. L'origine de cet ADNe n'a toutefois pas été identifiée mais la lyse cellulaire ou la libération de petites vésicules comme cela a été observé pour d'autres espèces bactériennes pourraient être une explication (Whitchurch, et al., 2002). La présence de cet

ADNe pourrait avoir un double objectif, d'une part nourrir la communauté bactérienne du biofilm et d'autre part assurer la structure du biofilm (Guilbaud, et al., 2015) .

2.3.1.3 *Exopolysaccharides*

Les exopolysaccharides sont un des composants de la matrice extracellulaire et ils sont majoritaires dans les biofilms de plusieurs espèces bactériennes. Ce sont de longues molécules, linéaires ou ramifiées, avec une masse moléculaire allant de 500 Da à 200 kDa. Des technique microscopiques, en utilisant des lectines couplées à un fluorochrome , ainsi que des analyses biochimiques ont permis de mettre en évidence la présence importante de polysaccharides dans la matrice extracellulaire de biofilm de diverses origines (marine, sols, système d'eau...) (Flemming et Wingender, 2010).

Les exopolysaccharides peuvent être de différentes natures, même au sein d'une même espèce. Par exemple, il a été mis en évidence que plusieurs souches de *Streptococcus thermophilus* exprimaient des exopolysaccharides en quantité, composition et masses moléculaires différentes (Vaningelgem, et al., 2004). Il en est de même pour *E. coli* où il a été mis en évidence qu'en plus de Poly-N-acetyl Glucosamine (PNAG) et de cellulose, certaines souches comme la souche de référence *E. coli* K-12, pouvaient exprimer un troisième type d'exopolysaccharide appelé acide colanique (Stevenson, et al., 1996). Une autre espèce capable de synthétiser plusieurs types d'exopolysaccharides dans sa matrice extracellulaire est *P. aeruginosa*. Cette espèce est une référence dans l'étude des biofilms et est capable de produire au moins trois exopolysaccharides distincts qui contribuent au développement du biofilm et à la pathogénicité de la bactérie: l'alginate, le Pel et le Psl (Ryder, et al., 2007).

Pour d'autres espèces bactériennes, l'analyse des exopolysaccharides issus de la matrice extracellulaire n'a révélé qu'un seul type de polysaccharide. C'est le cas pour les espèces de

Vibrio cholerae avec l'expression de VPS (Vibrio polysaccharide) (Fong et Yildiz, 2007, Yildiz, et al., 2014) ou de *Streptococcus mutans* avec l'expression de glucane (Koo, et al., 2010).

L'existence d'exopolysaccharide(s) spécifique(s) au mode de vie en biofilm n'a actuellement jamais été mise en évidence. Le problème étant d'obtenir suffisamment d'exopolysaccharides issus de la matrice extracellulaire d'un biofilm. Il a toutefois été rapporté chez certaines espèces qu'un exopolysaccharide pouvait être surproduit en culture biofilm comparée à une culture planctonique. C'est le cas pour *P. aeruginosa* où une surproduction d'alginate est visible, favorisant la formation de biofilms mucoïdes qui sont plus résistants que les cellules planctoniques à la chimiothérapie et aux défenses de l'hôte (Withers, et al., 2014).

La synthèse d'exopolysaccharides est très répandue parmi les micro-organismes et joue un rôle important dans la formation et l'architecture des biofilms. Ma, et al. (2009) ont ainsi mis en évidence qu'une dégradation du Psl, un exopolysaccharide majeur de la matrice extracellulaire des biofilms de *P. aeruginosa*, entraînait une déstructuration de la matrice extracellulaire et du biofilm. Il a également été mis en évidence que des bactéries bloquées dans la synthèse d'exopolysaccharides étaient incapables de former des biofilms. Chez *Staphylococcus epidermidis*, la mutation du gène *tagO*, intervenant dans la voie de biosynthèse des acides téichoïques, conduisait à une forte diminution de la capacité de formation des biofilms statiques réalisés sur une nuit à 37°C dans un bouillon cœur-cerveille (Holland, et al., 2011). Des observations similaires ont été faites avec des biofilms statiques de *S. aureus* cultivés durant 24 h à 37°C dans un bouillon tryptone soja supplémenté avec du glucose (Vergara-Irigaray, et al., 2008). Cependant, certaines études suggèrent que les

exopolysaccharides ne sont pas toujours essentiels pour la formation des biofilms. Toledo-Arana, et al. (2005) ont ainsi mis en évidence que l'absence de PNAG dans la matrice des biofilms de *S. aureus* était compensée par l'expression de protéine Bap.

La capacité de *L. monocytogenes* à produire des exopolysaccharides a longtemps fait l'objet de controverse. Une preuve indirecte de la production d'exopolysaccharides par diverses souches de *Listeria* a été démontrée dans plusieurs études utilisant diverses techniques, comme par exemple la coloration au rouge de Congo (Tiensuu, et al., 2013, Chen, et al., 2014), l'utilisation de lectines (Hefford, et al., 2005), l'utilisation d'anticorps spécifiques (Cywes-Bentley, et al., 2013), la coloration phénolique/acide sulfurique (Combrouse, et al., 2013) ou encore le calcofluor à 0,05% (Bonsaglia, et al., 2014). Certaines études ont réalisé une quantification plus ou moins précise des polysaccharides dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* par coloration au rouge de ruthénium (Borucki, et al., 2003, Zameer, et al., 2010b). Cependant, cette méthode présente des limites de sensibilité (Nilsson, et al., 2011) et de spécificité puisque le rouge de ruthénium ne se fixe pas exclusivement aux carbohydrates extracellulaires mais aussi aux carbohydrates pariétaux (comme le peptidoglycane ou les acides téichoïques) (Borucki, et al., 2003, Renier, et al., 2011). Cette méthode n'est donc pas assez sélective pour l'étude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms. Suite à une quantification réalisée par dosage colorimétrique des sucres totaux par la méthode de DuBois, et al. (1956), Chae, et al. (2006) ont corrélé que les souches de *L. monocytogenes* à capacité élevée à former des biofilms produisaient des quantités importantes de glucides dans la matrice extracellulaire.

Actuellement, l'identification des polysaccharides présents dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* n'a pas été étudiée.

2.4 Facteurs impliqués dans la formation des biofilms

Les bactéries initieraient la formation d'un biofilm en réponse à un stress environnemental comme l'indisponibilité en oxygène ou en nutriment mais aussi face à des variations de température. La formation des biofilms est influencée par deux catégories de facteurs : des facteurs intrinsèques, faisant référence aux propriétés génétiques de la bactérie, et des facteurs extrinsèques, faisant référence à des facteurs environnementaux, notamment la nature de la surface, le milieu de culture ou la température de croissance du biofilm.

2.4.1 Facteurs intrinsèques

Une multitude de facteurs intrinsèques et notamment moléculaires ont été identifiés comme intervenant dans la formation des biofilms de *L. monocytogenes* : les protéines Bap (Jordan, et al., 2008) , le quorum sensing (Challan Belval, et al., 2006, Sela, et al., 2006, Rieu, et al., 2007, Garmyn, et al., 2009, Riedel, et al., 2009) ou encore les facteurs de virulence (Lemon, et al., 2010, Zhou, et al., 2011, Salazar, et al., 2013). Cependant, la phylogénie reste un facteur prépondérant pour expliquer les capacités diverses des souches de *L. monocytogenes* à former des biofilms. Les souches provenant des lignées I sont plus fréquemment isolées de cas cliniques comparées aux souches de lignées II qui sont plus souvent retrouvées dans l'environnement industriel (Milillo et Wiedmann, 2009). Plusieurs études ont été conduites en comparant la capacité à former des biofilms par des souches de *L. monocytogenes* de différents sérotypes. Il en est ressorti des résultats contradictoires. En effet, Borucki, et al. (2003) et Lunden, et al. (2003) ont affirmé que les souches de lignée II avaient une meilleure capacité à former des biofilms par rapport aux souches de lignée I.

Au contraire, (Djordjevic, et al., 2002, Takahashi, et al., 2009, Combrouse, et al., 2013) ont rejeté cette hypothèse en mettant en évidence le contraire, avec une meilleure capacité de formation des biofilms par les souches provenant de la ligné I par rapport aux souches de la ligné II. D'autres études ont mis en évidence que les souches ne différaient pas dans leur capacité à former des biofilms, quelle que soit la lignée (Milanov, et al., 2009) ni dans l'architecture de ces derniers (Guilbaud, et al., 2015).

Les flagelles sont également un des facteurs moléculaires reconnus comme intervenant dans la formation des biofilms de *L. monocytogenes*. Ils présenteraient un rôle prépondérant lors de l'adhésion bactérienne car ils permettraient de surmonter les répulsions électrostatiques émanant de la surface à coloniser (Herald et Zottola, 1988). Des études ont rapporté que des souches de *L. monocytogenes* affectées dans leur mobilité avaient une capacité réduite à former des biofilms statiques. Gueriri, et al. (2008) ont ainsi mis en évidence par des colorations au cristal violet qu'une mutation du gène *degU*, intervenant dans la synthèse du flagelle, provoquait une incapacité de la souche de *L. monocytogenes* EGD-e à former des biofilms de 40h à 25°C dans un milieu pauvre Modified Welshimer's both (MWB) sur polystyrène, confirmant ainsi des observations faites par le passé (Vatanyoopaisarn, et al., 2000, Tresse, et al., 2006, Lemon, et al., 2007). Par contre, après avoir confirmé ces observations avec des mutants de la souche 10403S inactivée dans plusieurs gènes responsables de la synthèse du flagelle (*cheA*, *fliF*, *fliI* et *motA*), Todhanakasem et Young (2008) ont décrit par des observations microscopiques que l'absence ou la paralysie du flagelle pouvait également entraîner la formation d'un « hyper biofilm » en condition dynamique (avec renouvellement du milieu de culture). Récemment, (Guilbaud, et al., 2015) ont mis en évidence qu'en condition statique, l'absence de flagelle n'empêchait pas la formation de biofilm par *L. monocytogenes* mais aboutissait à une architecture désordonnée,

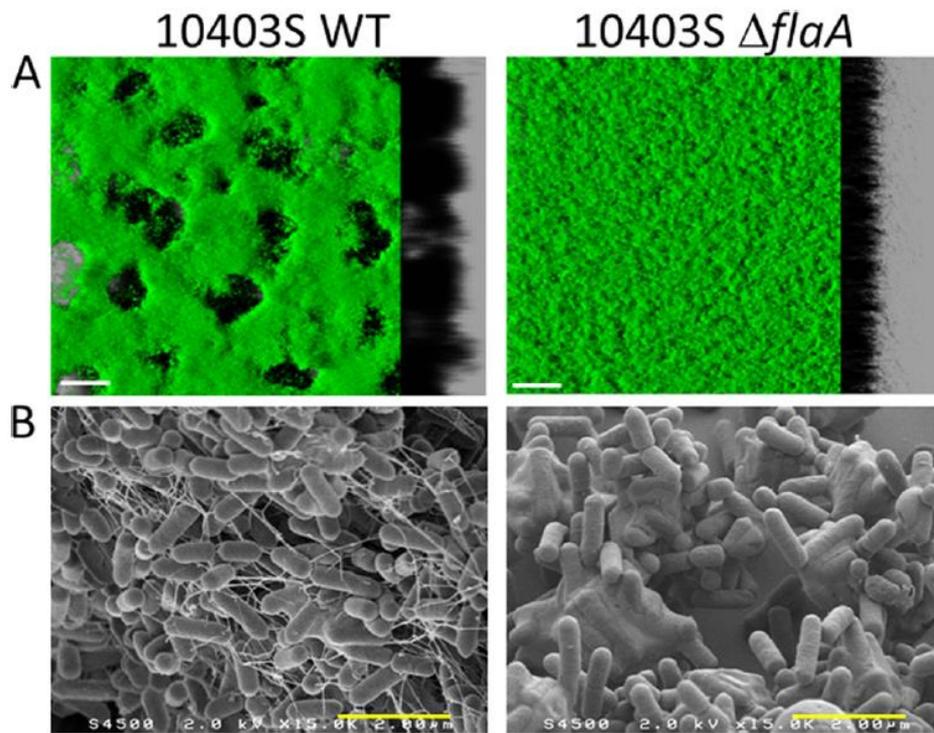


Figure 7 : Observations microscopiques des biofilms formés par une souche mobile 10403S de *L. monocytogenes* et de son mutant inactivé dans la mobilité par mutation du gène *flaA* (A) Observation réalisée par microscopie confocale à balayage laser .(B) Observation réalisée par microscopie électronique à balayage. Les barres d'échelles blanches correspondent à 30 μ m et les jaunes à 2 μ m.

suggérant donc que le flagelle jouerait un rôle dans l'architecture complexe des biofilms de *L. monocytogenes* en nid d'abeille (Figure 7).

2.4.2 Facteurs extrinsèques

Plusieurs facteurs extrinsèques tels que la nature du matériau, les variations de température, le pH ou l'apport en nutriment du milieu de culture se sont révélés être impliqués dans la formation des biofilms par *L. monocytogenes* (Donlan, 2002, Møretrø et Langsrud, 2004).

Une étude récente réalisée par Ochiai, et al. (2014) a mis en évidence que la température était le facteur le plus important influant sur la production de biofilm. Dans ces travaux, la formation de biofilms par des souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2 b d'origines diverses a été évaluée après coloration des biofilms de 48 h au cristal violet. La biomasse des biofilms était nettement plus importante à 37°C qu'à 30°C quelle que soit l'origine des souches étudiées. Kadam, et al. (2013) avaient également conclu que la formation des biofilms par *L. monocytogenes* était optimale à 37°C lors d'une étude réalisée sur 143 souches de *L. monocytogenes* cultivées en microplaque dans quatre milieux de culture différents (riches, modérés ou pauvres en nutriment) et à quatre températures (12°C, 20°C, 30°C et 37°C). Durant ces travaux, l'utilisation du milieu pauvre Hsiang-Ning Tsai (HTM) a également été identifiée comme un facteur favorisant la formation des biofilms par *L. monocytogenes*. Ces observations étaient en accord avec les résultats obtenus par Combrouse, et al. (2013) qui avaient également mis en évidence par des colorations au cristal violet une plus forte production de biofilms par des souches de *L. monocytogenes* des lignées I et II à 37°C plutôt qu'à 22°C et une capacité accrue de formation des biofilms dans le milieu pauvre MCDB 202 plutôt que dans le milieu riche, tryptone soja supplémenté avec de l'extrait de

levure. Des résultats similaires ont également été obtenus avec l'utilisation du milieu pauvre MWB (Djordjevic, et al., 2002, Moltz, 2005).

Un des facteurs influençant également l'adhésion et la capacité de formation des biofilms par *L. monocytogenes* est la nature du matériau. En effet, il a été mis en évidence que cette bactérie pouvait coloniser plus de 17 matériaux hydrophobes ou hydrophiles dont notamment des métaux, des caoutchoucs et des polymères (Beresford, et al., 2001, Møretrø et Langsrud, 2004). Dans une étude réalisée sur 32 souches d'origines diverses, Bonsaglia, et al. (2014) ont mis en évidence que *L. monocytogenes* adhère mieux aux surfaces hydrophiles (type acier inoxydable) qu'aux surfaces hydrophobes (type polystyrène). En effet, après 24 h à 20°C, 93,8% et 81,3% des souches testées formaient des biofilms respectivement sur de l'acier inoxydable et sur du verre, contre 6,2% sur du polystyrène.

2.5 Les biofilms en entreprise

Les biofilms peuvent être divisés en deux catégories : les positifs, lorsque ces derniers sont bénéfiques à leur environnement ou ont une utilité technologique, et les biofilms négatifs lorsqu'ils présentent des aspects nuisibles. L'industrie agro-alimentaire est un environnement propice au développement de ces deux types de biofilms dès qu'il y a un certain taux d'humidité dans l'air et que nous ne sommes pas dans des conditions stériles. En effet, les biofilms positifs sont régulièrement utilisés dans les processus de fabrication ou de transformation d'aliments (affinage de fromages, charcuterie...) alors que les biofilms négatifs, dont la présence est accidentelle, peuvent faire leur apparition suite à l'entrée de bactéries pathogènes dans l'usine (manque d'hygiène, matières premières, opérateurs...). Lors de la phase de colonisation, chaque partie de l'usine peut être susceptible d'accueillir un biofilm négatif: les équipements fermés tel qu'un circuit de pasteurisation dans l'industrie laitière ou les équipements ouverts comme les tapis de convoyeurs ou les sols. Par leur physiologie, les biofilms bactériens sont plus difficiles à éliminer des surfaces et peuvent

devenir résistants aux opérations de nettoyage-désinfection par rapport aux cellules planctoniques. La formation de biofilms permet donc aux bactéries pathogènes de persister au sein des ateliers agro-alimentaires et favorise les transferts bactériens vers les produits alimentaires (Pan, et al., 2009). La notion de bactéries persistantes est un concept mal défini. La communauté scientifique ne semble toutefois pas être d'accord sur la définition de souches transitoires et de souches persistantes (Carpentier et Cerf, 2011). Nous retiendrons la définition de Lunden, et al. (2003) qui est qu'une souche persistante est une souche retrouvée durant plusieurs mois ou année au sein d'un même site. De nombreuses études ont montré la persistance de *L. monocytogenes* dans les environnements industriels. Lappi, et al. (2004) ont par exemple montré que des souches de *Listeria* avaient persisté pendant 2 ans dans 3 entreprises de poisson fumé et que ces souches devaient être responsables de la contamination des produits finis, la matière première apparaissant rarement responsable de cette contamination. Une observation similaire a été faite par d'autres auteurs dans différentes industries agro-alimentaires (Holah, et al., 2004). Il a aussi été démontré que ces souches persistantes étaient à l'origine de la recontamination d'aliments, tels que le poisson fumé (Boerlin, et al., 1997, Loncarevic, et al., 1998, Hoffman, et al., 2003, Wulff, et al., 2006). Dans plusieurs entreprises, les procédures de nettoyage-désinfection ont été mises en cause. Pourtant, vue la faible aptitude des souches de *L. monocytogenes* à coloniser les surfaces, cette persistance de souches au sein d'ateliers implique la présence de biofilms mixtes. L'existence de souches résidentes (installées de façon permanente) de *L. monocytogenes* dans les ateliers a par exemple été démontrée par différents auteurs (Lappi, et al., 2004, Beaufort, et al., 2007, Midelet-Bourdin, et al., 2007).

Récemment, la présence d'une souche de *L. monocytogenes* persistante dans une usine agro-alimentaire au niveau d'un tapis de convoyage transportant des salades a été responsable

de 32 cas de listérioses en Suisse (Stephan, et al., 2015). Les pulsotypes obtenus par champs pulsé ont mis en évidence que cette souche persistante avait le même profil moléculaire que la souche responsable de l'épidémie. Cette persistance pourrait ainsi être liée à des différences entre les souches en terme de production de biofilm ou de capacité d'adaptation au stress provoqué par les basses températures rencontrées en industrie agro-alimentaire (Di Bonaventura, et al., 2008, Blatter, et al., 2010).

La réglementation européenne (règlement 178/2002 et l'ensemble des textes du paquet Hygiène) préconise entre autres la mise en œuvre des bonnes pratiques hygiéniques. Les opérations de nettoyage et désinfection font partie de ces bonnes pratiques. À cette législation européenne s'ajoutent les normes (ISO 22000) et différents référentiels privés (British Retail Consortium ou BRC, International Food Standard ou IFS...). Des techniques diverses existent dans la lutte contre les biofilms en entreprise. Le nettoyage et la désinfection sont des prérequis (ISO 22000) indispensables mais qui ne suffisent pas à eux seuls à éradiquer les biofilms bactériens contenant de potentiels pathogènes alimentaires. Cependant, par sa simple présence, la matrice extracellulaire protège passivement les cellules bactériennes en reproduisant une simple barrière physique contre l'entrée des agents antimicrobiens, détergents et antibiotiques. Il est donc essentiel pour les professionnels de coupler ces traitements chimiques à une action mécanique. Dans un premier temps, ils emploient un nettoyant qui va permettre d'éliminer les souillures minérales, organiques et microbiennes présentes sur les surfaces et qui sont des facteurs favorisant le développement bactérien. La présence de matière organique peut aussi réduire l'efficacité des désinfectants par piégeage des molécules actives qui sont utilisées dans un second temps. Le problème de l'élimination des biofilms bactériens est à prendre différemment selon que l'on se trouve sur une surface ouverte (tapis convoyeurs, sols...) ou en circuit fermé (tuyauterie, pompe...).

Sur les surfaces ouvertes, les biofilms peuvent être éliminés par des traitements chimiques couplés avec l'application d'une action mécanique telle que le brossage, le raclage ou dans le cas de dépôts difficiles à retirer (par exemple sur échangeur de chaleur), des balles d'éponges en caoutchouc (Russell et Russell, 1995).

Les circuits fermés ne sont pas accessibles pour une intervention humaine au contraire des surfaces ouvertes. Ils doivent subir un Nettoyage En Place (N.E.P.) qui consiste à faire circuler un flux d'eau ou de produits nettoyant-désinfectant couplés à la chaleur. L'application de flux hydrodynamiques appliquée par la circulation d'un liquide turbulent ou laminaire permet d'arracher les souillures organiques et microbiennes. Les industriels doivent être très attentifs à la conception hygiénique des équipements présents dans leur atelier pour limiter l'encrassement et pour favoriser le nettoyage des surfaces. Ils peuvent s'appuyer sur les normes européennes de conception hygiénique qui sont régies par la Directive 2006/42/EC. Deux exigences sont reprises dans cette directive qui porte sur les matériaux de fabrication et sur la géométrie des équipements.

La nature du nettoyant a un rôle important dans l'élimination des souillures. Ils doivent être choisis en fonction de la nature des souillures à éliminer et en tenant compte de critères comme par exemple l'action dispersive, la mouillabilité des surfaces (Khamisse, 2012). Les familles principales de détergents sont :

- les produits alcalins et alcalins chlorés : produits très actifs sur les souillures organiques avec une des molécules les plus utilisées qui est la soude caustique. Elle va détruire les souillures organiques par saponification des graisses et la solubilisation des protéines. Par contre, ils peuvent être corrosifs pour les surfaces et ne pas être facile à rincer.

- les produits acides : produits pour éliminer le tartre avec des molécules comme l'acide phosphorique et l'acide citrique. Par contre, en fonction de leur nature, ils peuvent être plus ou moins corrosifs.

Il y a également des produits tensio-actifs, des agents anti-précipitants et des enzymes qui peuvent être employés pour nettoyer les surfaces industriels. En plus de la nature du détergent, il faut également tenir compte d'autres facteurs comme la température, le temps d'action et le débit de circulation du flux de détergent (Sylla, 2011).

Certaines études reproduisent ces flux en laboratoire dans un circuit fermé. Ainsi, Faille, et al. (2013) ont mis en évidence qu'un flux d'une solution de soude NaOH à 0,5% à une contrainte de 40 Pa permettait de décrocher jusqu'à 99% des spores de *Bacillus* adhérents à de l'acier inoxydable.

Concernant *L. monocytogenes*, il y a peu d'études qui existent sur les forces nécessaires pour éliminer cette bactérie des surfaces contaminées. Perni, et al. (2007) ont montré par l'utilisation des cellules à écoulement radial circulaire que des cellules de *L. monocytogenes* après 24 h d'adhésion à 30°C à l'acier inoxydable 316L pouvaient être éliminées par un flux d'eau appliqué entre 52 et 101 Pa. Plus récemment, Giao et Keevil (2013) ont mis en évidence, également par l'utilisation des cellules à écoulement radial circulaire que des biofilms de 24 h formés par la souche de *L. monocytogenes* NCTC 13372 (sérotype 1/2c) à 22°C sur de l'acier inoxydable AISI 316 L et soumis à un flux laminaire d'eau de $1,62 \cdot 10^{-6}$ m³/s de 10 min étaient décrochés pratiquement en totalité.

2.6 Les méthodes de caractérisation des biofilms

2.6.1 Analyse de la biomasse totale

2.6.1.1 Les colorations

Plusieurs colorants peuvent être utilisés pour visualiser la biomasse totale des biofilms bactériens et chacun est spécifique à des composants du biofilm. Concernant *L. monocytogenes*, l'utilisation des colorants comme le rouge de ruthénium (Borucki, et al., 2003, Zameer, et al., 2010a) ou le rouge de Congo (Chen, et al., 2014, Koseoglu, et al., 2015) sont tous deux utilisés pour leur affinité pour les polysaccharides. Depuis plusieurs années, des tests réalisés en microplaque sont utilisés en laboratoire afin de faire un screening rapide des souches productrices de biofilm. Les tests les plus courants utilisent le cristal violet qui permet de quantifier le biofilm par mesure de la densité optique à 570 nm. Le cristal violet, à l'origine, a été utilisé pour la coloration de Gram (Casanova, 1992). Les molécules de cristal violet possèdent un ion ammonium et 3 groupements aromatiques ce qui leur permettent de se lier au squelette de l'ADN et ainsi de colorer les bactéries et la matrice extracellulaire du biofilm (Adkins et Burmeister, 1996). Cependant, l'utilisation des colorants reste délicate du fait de leur manque de spécificité. Un manque de spécificité vis-à-vis de la viabilité bactérienne mais aussi un manque de spécificité entre les composants de la matrice extracellulaire et les composants pariétaux. Ainsi, le cristal violet colore l'ensemble du biofilm : bactéries mortes, viables et la matrice extracellulaire (Gamble et Muriana, 2007).

2.6.1.2 Les observations microscopiques

2.6.1.2.1 La microscopie optique

En pratique, la microscopie optique est la technique la plus largement utilisée pour l'observation des biofilms, car elle permet de visualiser des échantillons se situant entre 1 et 100µm. Malgré ces limites de résolution, la microscopie optique permet d'obtenir des images

dans cet ordre de grandeur, suffisamment précises et riches en information. Un autre avantage de la microscopie optique tient à ses grandes possibilités de combinaison avec d'autres méthodes comme la polarisation, la fluorescence, le contraste de phase, la réflexion, le contraste d'interférences ; toutes étant des méthodes basées sur les diverses propriétés physiques de la lumière et son interaction avec la matière.

La microscopie couplée à la fluorescence est un outil largement utilisé dans l'étude des biofilms bactériens. Un microscope optique équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux colorants les plus utilisés qui sont le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), l'orangé d'acridine (OA) et le Live/Dead® Bac Light™.

Le DAPI appartient au groupe des colorants indols et se lie préférentiellement avec les bases A-T où il se loge dans le petit sillon de l'ADN. Il est donc spécifique à la coloration de l'ADN double brin. Le complexe ADN-DAPI excité en lumière UV à une longueur d'onde de 358 nm émet une lumière bleue pour des longueurs d'ondes supérieures à 380 nm.

L'OA, est une molécule tricyclique hétéro-aromatique pouvant pénétrer passivement à l'intérieur des cellules pour se fixer aux acides nucléiques (ADN et ARN) selon des processus d'intercalation et de liaisons électrostatiques. Il est rapporté qu'en fonction des liaisons soit à de l'ADN simple brin, double brin ou à de l'ARN, l'OA émet des longueurs d'ondes différentes.

La coloration différentielle avec le kit Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability est basée sur l'intégrité de la membrane bactérienne. Ce kit de coloration est composé de deux marqueurs d'acides nucléiques, le Syto 9 et l'iodure de propidium (IP). Le Syto 9 est de petite

masse moléculaire et a pour particularité de pénétrer dans toutes les cellules mortes ou vivantes et de se fixer à l'ADN. Il émet une fluorescence verte avec un spectre d'émission à 545 nm. Le deuxième fluorochrome utilisé est l'IP de masse moléculaire beaucoup plus grosse. Il pénètre dans les cellules dont la membrane est suffisamment endommagée, exclut le Syto 9 et émet une fluorescence rouge (spectre d'émission à 635 nm).

La microscopie optique, notamment en épifluorescence, est largement utilisée pour une première observation des biofilms bactériens en 2D. Cependant, afin d'apprécier finement l'architecture des biofilms, cette technique doit être couplée à des techniques microscopiques plus puissantes comme la microscopie électronique à balayage ou la microscopie confocale à balayage laser.

2.6.1.2.2 La microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images tridimensionnelles en haute résolution de la surface d'un échantillon (CMEBA, 2015). La vision en relief du MEB permet une bonne observation des biofilms grâce à sa profondeur de champ, nettement plus élevée que celle des microscopes optiques. Cette technique est très utilisée pour l'observation des biofilms de *L. monocytogenes* (Di Bonaventura, et al., 2008, Nilsson, et al., 2011, Casarin, et al., 2014). Le MEB n'est pas utilisé pour quantifier l'adhésion des bactéries mais pour les visualiser ainsi que les EPS. Cette technique est réalisée en plusieurs étapes : la fixation, la déshydratation et la métallisation par recouvrement de l'échantillon d'une couche conductrice puis enfin la visualisation de l'échantillon sous vide. Les traitements et particulièrement le séchage peuvent abimer les biofilms et particulièrement les EPS (Kachlany, et al., 2001, Priester, et al., 2007, Guilbaud, et al., 2015). En effet, cette technique déshydrate le biofilm par un gradient de solvants (alcool, acétone ou xylène) avant toute observation ce qui peut apporter un artefact car les EPS sont composés d'environ 95%

d'eau. Afin de pallier à ce problème, des auteurs ont mis en avant l'utilisation du colorant rouge de ruthénium afin d'améliorer la résolution de l'image pour visualiser les EPS (Priester, et al., 2007). Le rouge de ruthénium se lie aux EPS hautement anioniques de la matrice par des forces d'attractions électrostatiques non spécifiques ou ioniques (Fassel et Edmiston, 1999). Hood et Zottola (1995) ont démontré que la surface de *P. fragi* avait une résolution plus importante avec le rouge de ruthénium dans la préparation. Actuellement, seul Combrouse, et al. (2013) ont utilisé le rouge de ruthénium afin d'observer la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* de 48 h formés sur polystyrène.

L'utilisation de la technique de MEB a permis de mettre en évidence des architectures variées selon les souches de *L. monocytogenes* étudiées et les conditions expérimentales utilisées (support, température de culture...). Ainsi des observations par MEB des biofilms de *L. monocytogenes* cultivés en condition statique ont permis de mettre en évidence des structures tridimensionnelles en forme de champignon (Costerton, et al., 1995), alors que d'autres avaient des agrégats (Borucki, et al., 2003, Di Bonaventura, et al., 2008) ou étaient constituées d'un tapis cellulaire monocouche (Nilsson, et al., 2011).

2.6.1.2.3 La microscopie confocale à balayage laser

Le principe de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) est de pratiquer des coupes optiques virtuelles de très faible profondeur de champ (400 nm) appelées « sections optiques ». Lorsque ces coupes réalisées à différentes profondeurs de l'échantillon sont rassemblées, la structure tridimensionnelle de l'échantillon est reconstituée. A la différence de la MEB, cette technique est non invasive et non destructrice.

La technique de MCBL peut être utilisée en lien avec la fluorescence comme par exemple pour observer des systèmes dynamiques au sein de cellules ou tissus vivants.

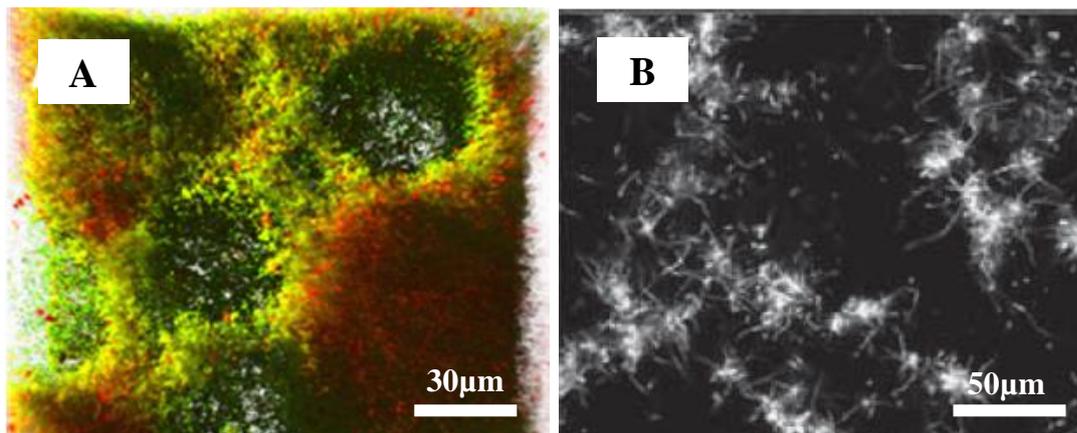


Figure 8 : Observations par la technique MCBL de biofilms de *L. monocytogenes* : A) Architecture en « nid d'abeilles » d'un biofilm coloré au Live/Dead® Bac Light™ et formé en condition statique durant 48h à 25°C sur verre (Guilbaud, et al., 2015) B) Architecture en « bille entourée par un réseau de chaînes tricotées » d'un biofilm formé en condition dynamique durant 16h à 25°C sur verre (Rieu, et al., 2008).

L'avantage de cette technique est de pouvoir observer la structure native du biofilm et de pouvoir la coupler avec des techniques de fluorescence comme par exemple avec l'utilisation des fluorochromes du kit Live/Dead® Bac Light™ permettant de discriminer les cellules mortes des vivantes et ainsi voir leur proportion et leur localisation au sein du biofilm. Le MCBL permet d'obtenir une vue 3D de l'architecture du biofilm ce qui apporte beaucoup à la compréhension du biofilm.

Récemment, une analyse effectuée sur 96 souches de *L. monocytogenes* par la technique de MCBL a permis de caractériser une architecture de biofilm majoritairement en forme de « nid d'abeille » lorsque les biofilms étaient cultivés dans le bouillon tryptone soja sur polystyrène et sur verre durant 48 h à 25°C (Guilbaud, et al., 2015) (Figure 8A). Parmi les 96 souches analysées, la souche ScottA avait déjà été caractérisée comme formant une telle architecture lorsque les biofilms étaient cultivés dans ce même milieu sur polystyrène durant 3 h, 6 h et 24 h à 35°C (Marsh, et al., 2003).

En condition dynamique (sous flux de milieu nutritif), une structure particulière a été décrite en forme de « bille entourée par un réseau de chaînes tricotées » (Figure 8B) (Rieu, et al., 2008).

2.6.2 Analyse moléculaire des populations bactériennes : la PCR quantitative

En parallèle de l'observation des biofilms, il est important de quantifier la concentration des populations bactériennes. La technique classique de dénombrement bactérien repose sur l'ensemencement d'un milieu gélosé et le dénombrement des bactéries viables cultivables. Cependant, l'absence de colonies sur le milieu gélosé n'est pas synonyme d'absence de bactéries ou de mort cellulaire. En effet, il est important de dissocier la viabilité de la cultivabilité. Certaines bactéries non-cultivables peuvent présenter des caractéristiques

comparables aux cellules vivantes tel que le maintien d'une activité métabolique et d'une intégrité membranaire et elles restent potentiellement pathogènes dans des conditions favorables (Oliver, 2005). Ces bactéries se retrouvent dans un état dit viable non cultivable (VNC) résultant d'un mécanisme de survie survenant généralement lors d'un stress, et impliquant la capacité de reprendre la croissance lors du retour dans des conditions optimales (Besnard, et al., 2000, Fittipaldi, et al., 2011).

Pour pallier à cette problématique, la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) s'est rapidement imposée comme un moyen de détection rapide, efficace et fiable. Pour quantifier un micro-organisme à l'aide de méthodes basées sur l'ADN, il est nécessaire que la quantité d'ADN génomique soit corrélée avec la biomasse. Cependant, les produits d'amplification PCR point-final ne permettent pas de lier la quantité finale de séquences obtenues à la quantité initiale d'ADN génomique dans l'échantillon. Une quantification efficace de l'ADN peut être effectuée grâce à la méthode par PCR quantitative (Juste, et al., 2008).

La technique de PCR quantitative (qPCR) est basée sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. La détermination de la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, permet de suivre la réaction PCR pendant sa phase exponentielle. En effet, durant cette phase, l'augmentation de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale d'ADN de l'échantillon cible. Au bout d'un certain nombre de cycles de la réaction, la fluorescence mesurée dépasse le bruit de fond. C'est ce nombre de cycles donnés, appelé cycle seuil (cycle threshold, Ct) qui est utilisé comme unité.

Il existe deux principales technologies de fluorescence pour la quantification des produits PCR : les agents se liant à l'ADN double brin (exemple le SYBR® Green I) et les sondes fluorescentes (exemple les sondes Taqman®). Les molécules de SYBR® Green I s'intercalent entre les bases nucléiques de l'ADN double brin durant les étapes d'hybridation et d'élongation d'un cycle de PCR. Elles vont émettre un signal fluorescent après excitation par des rayonnements ultraviolets. Le choix des amorces est primordial dans ce système car l'inconvénient est que les molécules de SYBR® Green I s'intercalent dans toutes les molécules d'ADN double brin qu'elles soient spécifiques ou non aux séquences cibles. En ce qui concerne les sondes Taqman®, c'est un fragment d'ADN monobrin portant un ou deux groupements fluorophores. 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'autre extrémité. L'hydrolyse de la sonde fluorescente durant l'étape de polymérisation va libérer le reporter de l'environnement du quencher ce qui permet l'émission d'une fluorescence.

La quantification absolue par qPCR a pour principe de comparer les valeurs de Ct obtenues pour un échantillon avec une gamme étalon construite avec des concentrations connues du gène cible (Juste, et al., 2008, Postollec, et al., 2011). Une des limites de la qPCR est la détection et l'amplification de l'ADN des cellules vivantes et mortes, ce qui peut entraîner une surestimation de la quantité de bactéries présentes (Wolffs, et al., 2005, Zhang, et al., 2015b). Pour pallier ce problème, il est possible d'utiliser des composés, tel que le monoazide de propidium (PMA™) ou le monoazide d'éthidium (EMA™) avant l'extraction de l'ADN bactérien. Ces deux molécules ont la capacité de pénétrer dans les cellules dont la membrane cytoplasmique est endommagée. Elles vont se lier de manière covalente à l'ADN des cellules mortes après une exposition forte à une source lumineuse et ainsi empêcher

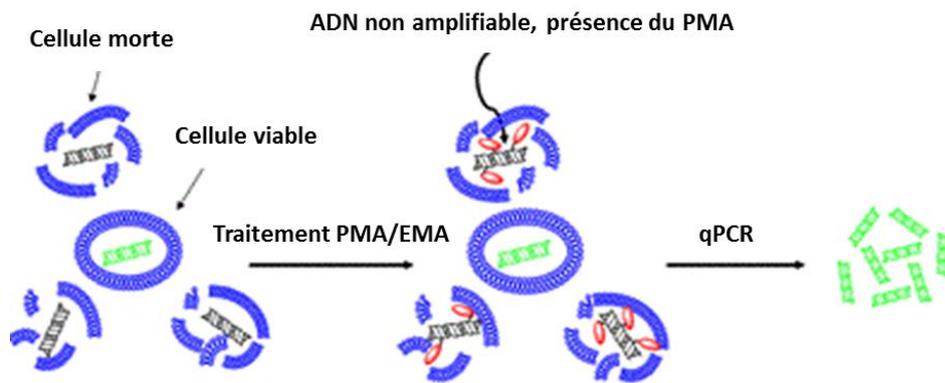


Figure 9 : Mode d'action du monoazide de propidium (PMA) et du monoazide d'éthidium (EMA) lors de la qPCR.

l'amplification de l'ADN. Les cellules viables étant imperméables aux colorants, leur ADN se retrouve protégé du colorant et donc libre d'être amplifié et détecté par qPCR (Nocker et Camper, 2009, Fittipaldi, et al., 2011) (Figure 9). En 2006, Nocker et al. ont observé par microscopie en épifluorescence qu'à la différence du PMA, l'EMA pénètre dans les cellules viables de *L. monocytogenes*. De plus, Pan et Breidt (2007) mirent en évidence un effet toxique de l'EMA sur *L. monocytogenes* préconisant ainsi l'utilisation du PMA pour la détection des cellules viables de *L. monocytogenes*. Depuis, la technique PMA-qPCR a été employée pour la détection de *L. monocytogenes* dans les matrices alimentaires (Elizaquível, et al., 2012, Tamburini, et al., 2013, Zhang, et al., 2015a) ou dans les biofilms monoclonaux (Pan et Breidt, 2007).

2.6.3 Analyse biochimique des polysaccharides de la matrice extracellulaire

2.6.3.1 Extraction

Les objectifs principaux de l'étape d'extraction des exopolysaccharides sont d'en récupérer la plus grande quantité sans en modifier la composition et sans lyser les cellules bactériennes.

La nature des exopolysaccharides récoltés dépend fortement de la méthode d'extraction utilisée. Il faut prendre en compte que la composition des exopolysaccharides provenant de la matrice extracellulaire est spécifique de chaque souche bactérienne et que même au sein d'une même espèce, les exopolysaccharides peuvent présenter des caractéristiques différentes de polarité ou de caractère hydrophobe/hydrophile. Chaque type d'exopolysaccharides requiert donc une méthode d'extraction qui lui est propre dans un but d'optimisation de la quantité obtenue. Les études portant sur la matrice extracellulaire des biofilms bactériens comportent un problème supplémentaire : la séparation de la matrice

extracellulaire des cellules bactériennes. Ceci présente une difficulté puisque cette étape de séparation doit rester suffisamment douce pour ne pas endommager les cellules et ainsi contaminer les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire avec des polysaccharides pariétaux. Des tests permettent de détecter une lyse cellulaire lors des extractions, par exemple le dosage de l'enzyme intracellulaire glucose-6-phosphate déshydrogénase ou le dosage de l'ATP (McSwain, et al., 2005, Wu et Xi, 2009). Ces deux molécules étant intracellulaires, leur présence significative dans les échantillons d'exopolysaccharides révélerait une contamination par des polysaccharides pariétaux. L'ADN, quant à lui, ne peut pas être un bon témoin de lyse puisqu'il peut être présent naturellement dans la matrice extracellulaire. Des méthodes plus directes, comme l'observation au microscope ou l'utilisation du kit Live/Dead® Bac Light™, sont aussi de bons moyens de contrôle.

2.6.3.2 *Analyses*

Il existe plusieurs techniques permettant une analyse compositionnelle et structurale des polysaccharides (GC-MS, HPLC-MS, ESI-MS, RMN...). Nous allons développer ici les techniques qui ont été utilisées lors de ces travaux.

2.6.3.2.1 Analyse par la technique de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) de l'hydrolysat d'un polysaccharide permet de déterminer sa composition mono-saccharidique, mais requiert une dérivatisation des monosaccharides formés. En effet, la technique GC-MS ne permet pas d'analyser directement les mono- ou polysaccharides en raison de leurs groupements hydroxyles qui les rendent peu volatiles. Les dérivatisations les plus fréquemment utilisées sont l'acétylation et la silylation. Une fois les composés rendus volatiles par les substituants (acétyles), ces derniers peuvent être analysés par la technique de GC-MS (Medeiros et Simoneit, 2007, Ruiz-Matute, et al., 2011). L'échantillon est placé dans

l'injecteur. La chromatographie en phase gazeuse (GC) sert à scinder le mélange de monosaccharide rendu volatile pour en faire des composants individuels au moyen d'une colonne capillaire à température contrôlée. La spectrométrie de masse (MS) sert à identifier les diverses composantes dans leur spectre de masse. Chaque composant a un spectre de masse unique, ou quasi unique, que l'on peut comparer avec des bases de données de spectre de masse, ce qui permet de les identifier. Grâce à l'utilisation d'étalon interne (comme l'inositol), il est également possible de procéder à la quantification de composé. La GC-MS a beaucoup été utilisée pour la caractérisation des substitutions glycosidiques de l'acide téichoïque de *L. monocytogenes* (Fiedler, et al., 1984).

2.6.3.2.2 Analyse par la technique de résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) désigne une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple ^1H , ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P , ^{129}Xe ...), placé dans un champ magnétique.

La RMN est un outil indispensable pour l'étude structurale des biomolécules, et notamment des molécules glucidiques. Les expériences RMN à une ou deux dimensions sont basées sur les propriétés des noyaux des isotopes des atomes présents dans les composés organiques naturels, tels que ^1H (isotope le plus abondant d'hydrogène), ^{13}C , et ^{31}P .

Par exemple, les spectres COSY mononucléaire ^1H - ^1H donnent accès aux corrélations entre protons trans-axiaux. L'ensemble des spectres COSY, TOCSY et HSQC ^1H - ^{13}C hétéronucléaires permettent d'établir la nature des unités monosaccharidiques, en s'appuyant sur les données de la littérature (déplacement chimique (δ) et constante de couplage (J)) (Poinsot, et al., 2012). Les spectres NOESY, où les atomes ^1H corrélient avec ceux qui leur sont proches dans l'espace, aident à établir le mode de liaison entre les unités

monosacchariques au sein du polysaccharide. La méthodologie d'interprétation des spectres RMN des glucides complexes est décrite par Maes (2009). Ce sont dans les années 80 que Fujii, et al. (1985) et Uchikawa, et al. (1986) utilisèrent pour la première fois la RMN sur l'espèce *L. monocytogenes* afin de caractériser les différentes structures de l'acide téichoïque selon le sérotype des bactéries. Depuis, la technique RMN a été utilisée pour de nombreuses autres études sur les acides téichoïques de *L. monocytogenes* (Eugster et Loessner, 2011, 2014).

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Chapitre 1. Caractérisation des exopolysaccharides présents dans la matrice extracellulaire et dans le milieu de culture des biofilms de *Listeria monocytogenes* versus les polysaccharides pariétaux

1.1 Contexte et objectif

Un biofilm est une communauté de micro-organismes adhérant à une surface et entourée par une matrice extracellulaire (Sutherland, 2001a) qui est constituée d'un mélange complexe de polysaccharides, de protéines, d'ADN et d'autres substances polymériques. Il a été caractérisé plus de 30 exopolysaccharides provenant de matrices extracellulaires de biofilms formés par différentes espèces bactériennes (Gram positif ou Gram négatif) (Flemming et Wingender, 2010). Un des exopolysaccharides le plus décrit est le poly-N-acétylglucosamine (PNAG) produit notamment par *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* et *Escherichia coli* (Mack, et al., 1996, Wang, et al., 2004, O'Gara, 2007). D'autres espèces bactériennes produisent quant à eux plusieurs exopolysaccharides comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa* qui en produit trois et qui peuvent intervenir dans le développement du biofilm (Ryder, et al., 2007)

Par contre, pour *Listeria monocytogenes*, aucune étude n'a caractérisé la composition ou la structure des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms. Quelques

études utilisant des techniques colorimétriques ont montré la présence de carbohydrates extracellulaires. Deng, et al. (2010) ont rapporté qu'aucun des gènes connus pour être impliqués dans la biosynthèse et le transport des exopolysaccharides n'a été détecté dans le séquençage du génome de 26 souches de *L. monocytogenes* de trois lignées différentes. Ces travaux ne sont pas en accord avec ceux de Chen, et al. (2014) qui ont décrit un polysaccharide c-di-GMP induit qui était synthétisé par l'opéron *pssA-E* dans *L. monocytogenes*.

Pour répondre à la question de savoir s'il y a un ou plusieurs exopolysaccharides présents dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*, nous avons sélectionné 6 souches étudiées précédemment et qui avaient une grande capacité à former des biofilms de 48 h à une température de 37°C sur une surface en polystyrène (Combrouse, et al., 2013).

Dans un premier temps, nous avons confirmé la présence de matrice extracellulaire par microscopie électronique à balayage (MEB) sur des biofilms de 48 h réalisés sur des surfaces en polystyrène à 37°C.

Dans un second temps, nous avons isolé et purifié les polysaccharides de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms de 48 h puis nous avons identifié leur structure par chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse (GC-MS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) ¹³C et ¹H. La composition des exopolysaccharides identifiés a été comparée à celle des polysaccharides pariétaux. Un polysaccharide présentant un défaut de glycosylation a été identifié dans une souche provenant du sérotype 1/2a. Une

Tableau 4 : Souches, origines et sérotypes des souches de *Listeria monocytogenes* étudiées

Souches	Origine de l'échantillon	Sérotypes	Références
CL297 AS1	Saumon fumé	1/2a	(Midelet-Bourdin, et al., 2007, Tresse, et al., 2007)
DPF 234 HG2	Hareng cru		(Midelet-Bourdin, et al., 2007, Tresse, et al., 2007)
DSS 1130 BFA2	Hareng fumé		(Midelet-Bourdin, et al., 2007, Tresse, et al., 2007)
EGD-e	Epidémie		(Glaser, et al., 2001)
LmA	Produit laitier	4b	(Carpentier et Chassaing, 2004)
ScottA	Epidémie	4b	Tresse et al. (2007)

analyse moléculaire a permis d'identifier une mutation génique responsable de ce phénotype original.

1.2 Matériel et méthodes

1.2.1 Souches et conditions de culture

Six souches de *L. monocytogenes* ont été étudiées: Scott A et LmA (sérotypage 4b) et DPF 234 HG2, CL 297 AS1, DSS 1130 BFA2 et EGD-e (sérotypage 1/2a) (Tableau 4). Les cellules bactériennes ont été conservées dans du bouillon cœur-cerveau (BCC, AES, Combourg, France) supplémenté avec du glycérol (18% v/v) à -20°C. Les cultures ont été maintenues à 4°C pendant un maximum d'un mois sur gélose trypticase soja avec de l'extrait de levure (TSAYe, Oxoid, Dardilly, France) en pente. Les pré-cultures ont été réalisées à partir de ces cultures réfrigérées qui ont été transférées dans 5 ml de bouillon de soja Trypticase avec extrait de levure (TSBYe, Oxoid) à 37°C pendant 24 h. Cette suspension a été ensuite transférée dans 35 ml de bouillon TSBYe puis incubée à 37°C pendant 24 h. Les inoculums ont été ajustés à 10^7 UFC/ ml dans le milieu MCDB 202 (CryoBioSystem, L'Aigle, France, Annexe 2) (Hébraud et Guzzo, 2000) en se basant sur une DO_{620nm} de 0,15 concordant à 10^8 UFC/ ml.

1.2.2 Formation et observation des biofilms

Dix millilitres d'inoculum ajustés à 10^7 UFC/ ml ont été déposés dans des boîtes de Pétri en polystyrène traitées culture de 60 mm de diamètre (Grosseron, Saint Herblain, France) et incubées pendant 48 h à 37°C. Ensuite, le milieu de culture a été retiré et les biofilms étaient rincés successivement trois fois avec 5 ml d'eau distillée stérilisée. Chaque biofilm était écouvillonné en frottant la surface avec un premier écouvillon sec qui était ensuite agité dans un tube Eppendorf contenant 1 ml d'eau distillée stérilisée. Ce même

écouvillon était passé une seconde fois sur la surface puis il était cassé dans le tube Eppendorf. Cette manipulation était réalisée une seconde fois avec un nouvel écouvillon. Le tube Eppendorf était ensuite agité au vortex pendant 20 secondes. Les dénombrements étaient réalisés sur des géloses TSAYe à l'aide d'un ensemenceur spirale (Spiral DS System; Interscience, Saint Nom La Bretèche, France). Les géloses étaient incubées à 37°C pendant 24 h. En parallèle, des biofilms étaient colorés par immersion avec 10 ml de Diamidino 4',6'-phénylindole – 2 Dichlorohydrate (DAPI, Merck, Darmstadt, Allemagne) ou d'orangé d'acridine (OA, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) et incubés à l'obscurité pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, ils étaient rincés avec 25 ml d'eau distillée stérilisée puis observés par microscopie en épifluorescence (Imager.Z1, Zeiss, Marly-le-Roi, France) relié à une caméra CCD (Axiocam - MRm, Zeiss) et un système d'acquisition d'image numérique. Le complexe ADN-DAPI excité en lumière UV à une longueur d'onde de 358 nm émet une lumière bleue pour des longueurs d'onde supérieures à 380 nm. Concernant l'orangé d'acridine que nous avons utilisé (Acridine orange hemi (zinc chlora salt, Sigma, Saint Louis, USA) il est indiqué que les complexes OA/ADN doivent être excités à 480 nm pour une émission à 510 nm alors que le complexe OA/ARN doit être excité à des longueurs d'onde de 440 à 470 nm pour une émission également à 510 nm. Le filtre que nous avons utilisé est un jeu de filtre 09 (Zeiss, Marly-le-Roi, France), d'excitation de 460 à 490 nm et d'émission à 510 nm. Nos colorations à l'orange d'acridine nous ont donc permis d'observer l'ensemble des acides nucléiques des biofilms (ADN+ARN).

L'architecture des biofilms a également été observée par microscope électronique à balayage (MEB). Le biofilm était fixé chimiquement pendant 20 minutes dans 0,02 M de tampon cacodylate avec du glutaraldéhyde à 3% (v / v). Les biofilms étaient ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol de 70% (v / v), 80% (v / v), 90% (v / v) et 100%

(v / v) pendant 10 min chacun. Les biofilms étaient ensuite séchés par la technique du point critique puis métallisés à l'or-palladium pendant 1,5 minute. Ils étaient ensuite observés par MEB (Jeol, JSM-35 CF, Japon) à l'INRA de Villeneuve d'Ascq. Toutes les analyses d'image ont été effectuées avec le logiciel ImageJ 1.22d (Schneider, et al., 2012).

1.2.3 Préparation des polysaccharides de la paroi cellulaire, de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms de 48 h

Afin d'obtenir de grandes quantités de matrice extracellulaire, les biofilms ont été cultivés dans dix boîtes de Pétri en polystyrène traitées culture de 150 mm de diamètre (Grosseron, Saint Herblain, France) contenant 60 ml de culture ajustée à 10^7 UFC/ ml dans du milieu MCDB 202. Après 48 h d'incubation à 37°C, le milieu de culture était récupéré dans un flacon stérile. Le biofilm était lavé successivement trois fois avec 5 ml d'eau distillée stérilisée. L'eau utilisée pour les lavages était ajoutée dans le flacon contenant le milieu de culture. Le flacon contenant le milieu de culture et les eaux de lavage a été centrifugé à 6000g pendant 10 min. Le surnageant était conservé pour la préparation des polysaccharides du milieu de culture, et le culot cellulaire pour la préparation des polysaccharides pariétaux.

Ensuite, les biofilms étaient décrochés manuellement (doigt recouvert d'un gant stérile) et rincés avec 4 ml d'eau distillée stérilisée qui étaient placés dans un tube Falcon (Combrouse, et al., 2013). La matrice extracellulaire du biofilm a été détachée des cellules bactériennes par sonication sur glace du tube Falcon (IKA Labortechniksonicator, Staufen, Allemagne) pendant 3 x 30 s, à des cycles de 50%, à une intensité de 0,5 comme décrit par Sadovskaya et al. (2005). Après centrifugation du tube Falcon soniqué à température ambiante (10 000 g, 10 min), le culot cellulaire était conservé alors que le surnageant contenant la matrice extracellulaire était déprotéinisé par addition d'acide trichloracétique

(TCA) à une concentration finale de 5%, puis dialysé (tube de dialyse Visking, Dutscher, Brumath, France) et concentré par lyophilisation. Une extraction au phénol/ chloroforme était ensuite réalisée afin d'effectuer une déprotéinisation complète de l'extrait de la matrice extracellulaire (Sadovskaya, et al., 2004). L'extrait déprotéinisé était ensuite fractionné sur une colonne Sephadex G-50 (1 x 40 cm) en éluant avec de l'acide acétique (0,1%). Les fractions étaient dosées par la méthode colorimétrique de Dubois pour déterminer la présence de sucres neutres (DuBois, et al., 1956). Les fractions de polysaccharides de haut poids moléculaire (volume mort) provenant de la matrice extracellulaire ont été groupées et lyophilisées.

En parallèle, le milieu de culture a été déprotéinisé, dialysé, lyophilisé et fractionné sur une colonne G-50 Sephadex comme décrit ci-dessus pour la préparation des polysaccharides de la matrice extracellulaire.

Les culots cellulaires préparés précédemment ont été remis en suspension dans du TCA à 5% et ont été placés sous agitation pendant 48 h à 4°C. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (10000 g, 10 min) et le surnageant a été dialysé et lyophilisé. Les polysaccharides pariétaux ont été purifiés sur la colonne Sephadex G-50.

1.2.4 *Etude structurale des glucides*

1.2.4.1 *Analyse monosaccharidique*

Le ribitol et les monosaccharides ont été identifiés par la technique GC-MS en tant que alditol acétates. De 0,2 à 1 mg des polysaccharides lyophilisés ont été traités avec 50 µl d'acide hydrofluorique (HF) à 4°C pendant 48 h afin d'hydrolyser les liaisons phosphodiester. L'acide hydrofluorique a ensuite été évaporé sous azote et le résidu a été

hydrolysé avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) 4 M à 110°C pendant 3 h. L'acide a été évaporé sous azote. Une réduction a ensuite été effectuée par traitement avec du tétrahydroborate de sodium (NaBH₄). Le réactif a été décomposé en utilisant 1 ml d'un mélange 1/10 (v/v) d'acide acétique AcOH et de méthanol MeOH qui a ensuite été évaporé sous azote. L'échantillon a ensuite été traité avec 1 ml du mélange AcOH/MeOH (v/v), puis évaporé à l'azote, de nouveau traité avec du MeOH puis évaporé sous azote. L'échantillon a ensuite été acétylé en présence de 400 µl d'anhydride acétique C₄H₆O₃ et 400 µl de pyridine C₅H₅N pendant 1 h à 100°C puis séché sous azote (Sadovskaya, 2014). Les analyses GC-MS ont été effectuées sur un système Trace ULTRA GC (Thermo Scientific) équipé d'une colonne capillaire NMTR-5MS (30 m x 0,25 mm) en utilisant un gradient de température de 170°C (3 min) → 250°C à 5°C / min et avec un détecteur DSQ II MS.

1.2.4.2 *Analyse structurale*

Les analyses par la technique de RMN ont été effectuées par la plate-forme PAGés en sous-traitance (USTL, Lille 1, France) sur un spectromètre Bruker AVANCE[®] III 900 MHz équipé d'une sonde de gradient de 3 mm (Vinogradov, et al., 2013). Toutes les expériences ont été effectuées sur 0,5 à 5 mg de polysaccharides dans 0,5 ml de D₂O à 25°C avec un contrôle interne d'acétone (2,225 ppm pour ¹H et 31,45 ppm pour ¹³C) à l'aide des séquences standards d'impulsions COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy, temps de mélange de 120 ms), NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy) (temps de mélange de 400 ms), gHSQC (gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence, 2,225 ppm pour ¹H et 31,45 ppm pour ¹³C). Le temps d'acquisition AQ a été maintenu de 0,8 à 1 s pour les corrélations H-H et à 0,13 s pour la HSQC, 256 incréments ont été acquis pour t1. Les spectres ont été analysés en utilisant le logiciel Topspin 2 (Bruker Biospin[®]).

Tableau 5 : Origine, sérotype et mutation des 93 souches de *Listeria monocytogenes* étudiées

Souche	Origine de l'échantillon	Sérotype	Référence	Groupe de souches avec la même séquence génique de <i>lmo2550</i>
A26 P3	Environmental	1/2a	Cette étude	A
A3 P3m	Saumon cru	1/2a		
A31 P1	Environmental	1/2a		
B106 OF19	Saumon cru	1/2a		
B136 P2F	Saumon fumé	1/2a		
B674 P1	Thon fumé	1/2a		
B7202 O1	Saumon fumé	1/2a		
B7482 O1	Perche cru	1/2a		
B82 P2	Saumon cru	1/2a		
C2806 O	Hareng fumé	1/2a		
C3143 O1	Saumon fumé	1/2a		
C3299 O1	Saumon cru	1/2a		
C3615 PS	Hareng fumé	1/2a		
C4579 OS	Flétan cru	1/2a		
C4627 OS	Flétan cru	1/2a		
C5086 T1	Environmental	1/2a		
C5128 P	Saumon fumé	1/2a		
C5142 DNT	Saumon cru	1/2a		
C5316 DNT4	Hareng fumé	1/2a		
C5391 OT	Hareng fumé	1/2a		
C5400 PT	Saumon fumé	1/2a		
C58 O1	Saumon fumé	1/2a		
C838 P1	Hareng fumé	1/2a		
CL110P2T48	Environmental	1/2a		
CL219S2	Environmental	1/2a		
CL229L1	Environmental	1/2a		
CL297AS1	Saumon fumé	1/2a		
CP520 APS1	Saumon fumé	1/2a		
D125 DNT1	Filet of sole	1/2a		
D1355 PT1	Saumon fumé	1/2a		
D2022 PS2	Hareng cru	1/2a		
DA1103p1	Environmental	1/2a		
DA146 q	Saumon fumé	1/2a		
DA1559a2	Saumon cru	1/2a		
DA169.2 a6	Saumon cru	1/2a		
DA185 S	Saumon cru	1/2a		
DA209 q1	Saumon fumé	1/2a		
DM B5	Environmental	1/2a		
DPF 234 HG2	Hareng cru	1/2a		
DPF235 HG6	Hareng cru	1/2a		
DSS794 AA1	Hareng fumé	1/2a		
DSS835 CA1	Hareng fumé	1/2a		
DSS836 CS1	Hareng fumé	1/2a		
EGD-e*	Epidémie	1/2a		
C3935 PS	Flétan fumé	1/2a		
C4049 OT*	Flétan cru	1/2a		
B1166 O1	Hareng cru	1/2a		
B1169 P1	Hareng cru	1/2a		
B131 P2*	Environmental	1/2a		
B7201 P2	Saumon fumé	1/2a		
C1530 O	Hareng fumé	1/2a		
C4839 P1	Saumon fumé	1/2a		
C5067 PS	Hareng fumé	1/2a		
CP622 CS1	Hareng fumé	1/2a		
CS163 P1	Hareng cru	1/2a		
DSS728 CA1	Saumon fumé	1/2a		
DSS843 CFA2	Hareng fumé	1/2a		
CP614 CS2*	Hareng fumé	1/2a		
CPL631AS1	Saumon fumé	1/2a		
A32 O3	Environmental	1/2a		
C4283 PS	Hareng cru	1/2a		
CP627 BFS1*	Hareng fumé	1/2a		
DA1139.1 E	Saumon cru	1/2a		
B7880 P1	Hareng cru	1/2a		
B8005 P1*	Hareng fumé	1/2a		
C5070 DNT1	Truite fumée	1/2a		
C54 P1	Hareng cru	1/2a		
C5551 OT	Hareng fumé	1/2a		
CS328 CS1	Hareng cru	1/2a		
CS566 A1	Environmental	1/2a		
DA1283 q2	Environmental	1/2a		
DA1617 q2	Environmental	1/2a		
B7681 P1	Environmental	1/2a		
CS5d*	Hareng fumé	1/2a		
C1063 O1*	Saumon cru	1/2a		
DA1421ic2	Saumon cru	1/2a		
DA1477i4	Saumon cru	1/2a		
DA509i1	Environmental	1/2a		
DM K17c	Environmental	1/2a		
C3248 OS*	Saumon cru	1/2a		
C5125 O	Saumon fumé	1/2a		
D829 OS2*	Saumon cru	1/2a		
DA1583.3 a3*	Saumon fumé	1/2a		
DSS 1130 BFA2*	Saumon fumé	1/2a		
DSS765 BA3	Hareng fumé	1/2a		
C5583 APL1*	Truite fumée	1/2a		
B7678 P1*	Environmental	1/2a		
C3232 O1	Saumon fumé	1/2a		
C3572 OS	Saumon cru	1/2a		
C5068 PT1	Hareng fumé	1/2a		
CS536 PL1	Environmental	1/2a		
CS504 CA1	Hareng fumé	1/2a		
DA I.1	Cas sporadique	1/2a		
			(Midelet-Bourdin, et al., 2006 et Tresse, et al., 2007)	
			Cette étude	B
			(Midelet-Bourdin, et al., 2006 et Tresse, et al., 2007)	
			Cette étude	C
			(Glaser, et al., 2001)	
			Cette étude	D
			Cette étude	E
			Cette étude	F
			Cette étude	H
			Cette étude	J
			Cette étude	L
			Cette étude	N

*: Souches représentantes de chaque mutation

1.2.5 Séquençage des gènes *lmo2549* et *lmo2550*

Deux gènes ont été étudiés, *lmo2549* et *lmo2550*, intervenant dans la glycosylation par un GlcNAc des acides téichoïques de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a (Eugster, et al., 2011). Quatre - vingt - treize souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a ont été étudiées (Tableau 5). Chaque souche a été cultivée sur gélose TSAYe et incubée pendant 24 h à 37°C. Les colonies étaient prélevées à l'aide d'une oëse puis ajoutées dans le mélange réactionnel de PCR dans un volume final de 40 µl. Chaque mélange réactionnel contenait 1 µl de dNTP à 10 mM (Sigma-Aldrich), 0,3 µl de Taq polymérase (*Taq* DNA Pol 5 U/µl, MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA), 5 µl de tampon PCR (10X Incubation T.pol Mix with MgCl₂, MP Biomedicals), 32,7 µl d'eau distillée stérilisée, 0,5 µl d'amorce F à 500 nM et 0,5 µl d'amorce R à 500 nM. Un couple d'amorces a été utilisé pour l'amplification du gène *lmo2549*: lmo2549F (5'- GGG AAT GGA ATT GTC TGG TT-3 ') et lmo2549R (5'-CGT TGC CAT CTT CCC ATT TA-3'). Deux amorces ont été utilisées pour l'amplification du gène *lmo2550*: lmo2550F (5'-CTT AAT TTT ATG TAC TAC AAG AGG A-3 '), lmo2550R (5'-GTA TAC CAC GGA ATC TTG TC 3'). L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un thermocycleur iCycler (Biorad, Marnes la Coquette, France) avec les conditions suivantes: une pré-incubation à 94°C pendant 3 min, une répétition de 35 cycles avec une phase de dénaturation de l'ADN à 93°C pendant 45 s, une phase d'hybridation des amorces à 54°C pendant 45 s, et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min; suivi d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 min. Les produits PCR ont été séquencés par la société Genoscreen en sous-traitance (Lille, France) en utilisant les amorces d'amplification pour les deux gènes *lmo2449* et *lmo2550*. Un couple d'amorces supplémentaire a été utilisé pour le séquençage du gène *lmo2550* : lmo2550F2 (5'- CTG GTT GAA AAA AGC AAC TTC A-3 ') et lmo2550R2 (5'TCT ACG CAT CTT CTA TCGA G 3').

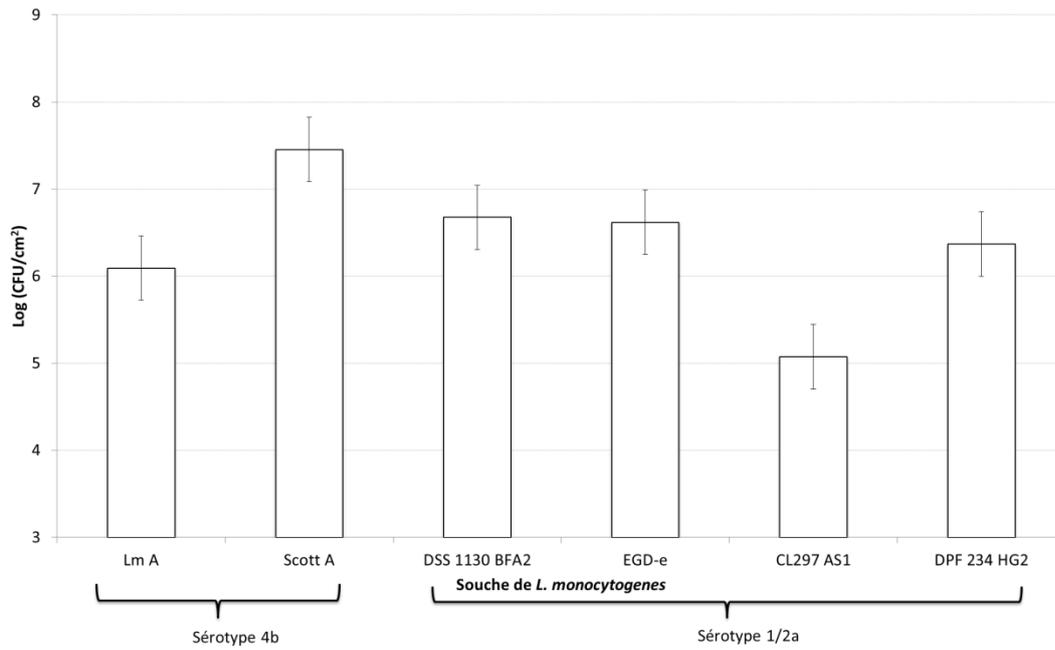


Figure 10 : Population bactérienne des biofilms formés après 48h sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202. Les données représentent les moyens et les écarts types de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance.

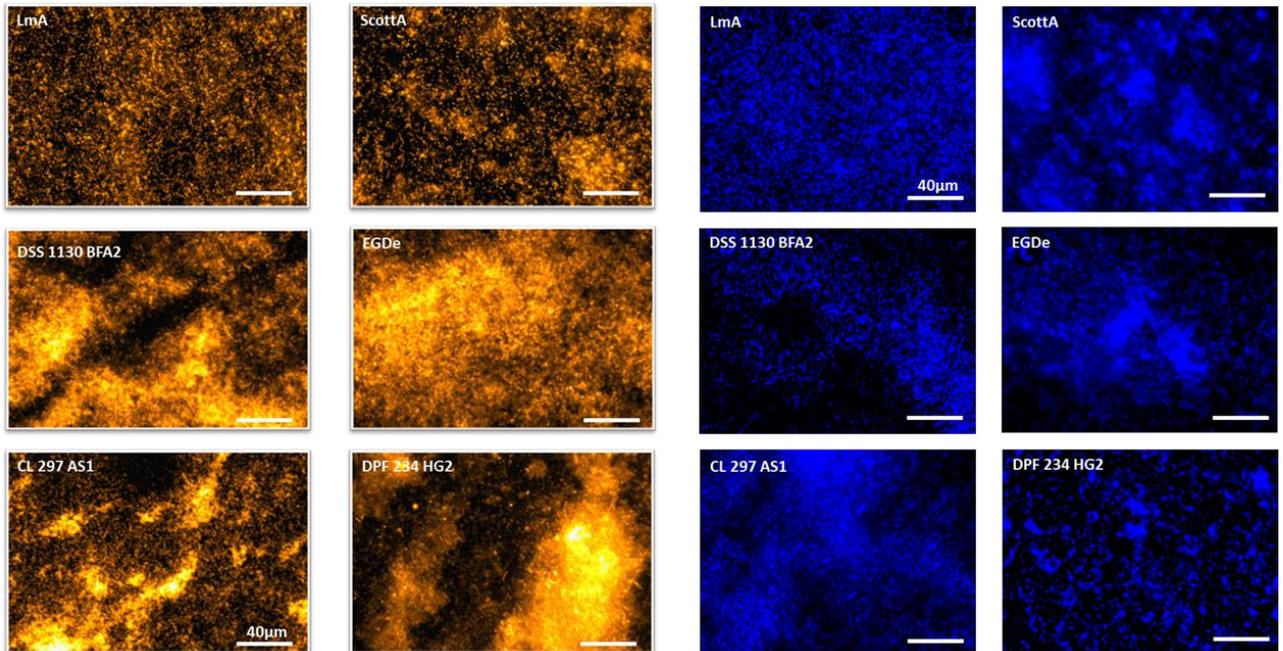


Figure 11 : Observations par microscopie en épifluorescence en coloration à l'orangé d'acridine des biofilms formés par les souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.

Figure 12 : Observations par microscopie en épifluorescence en coloration DAPI des biofilms formés par les souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.

1.2.6 Analyses statistiques

Toutes les expériences sur les biofilms ont été réalisées en triplicat. Des analyses de variance ont été effectuées pour déterminer les différences significatives de population entre les souches bactériennes. Tous les calculs ont été traités avec le logiciel Statgraphics centurion XVI (Sigma plus, Paris, France). La signification statistique a été évaluée à $P < 0,05$ avec P la probabilité limite sous l'hypothèse nulle.

1.3 Résultats

1.3.1 Formation des biofilms

La capacité de formation des biofilms de 48 h par six souches de *L. monocytogenes* a été étudiée: Scott A et Lm A (sérotype 4b) et DPF 234 HG2, CL 297 AS1, DSS 1130 BFA2 et EGD-e (sérotype 1 / 2a) (Figure 10). Les populations bactériennes viables cultivables des biofilms ont été dénombrées sur milieu gélosé. Des différences significatives de population ont été montrées entre les souches allant de 5,07 log UFC/cm² pour la souche CL 297 AS1 à 7,45 log UFC/cm² pour la souche ScottA. Des différences significatives de population ont également été observées entre des souches de même sérotype. Pour le sérotype 4b, la population des biofilms était entre 6,09 log UFC/ cm² et 7, 45 log UFC/cm² alors que pour celle des souches de sérotype 1/2a, elle était entre 5,07 log UFC/ cm² et 6,67 log UFC/cm².

Par contre, alors qu'il y avait des différences significatives de population bactérienne, toutes les souches avaient des architectures de biofilms similaires (Figures 11, 12, 13, 14). Les observations réalisées sur les biofilms colorés avec le DAPI et l'OA (Figures 11, 12) ont permis de montrer des cellules bactériennes réparties de façon hétérogène sur la surface. Il y avait des zones sans cellules bactériennes alors que d'autres étaient recouvertes de couches de

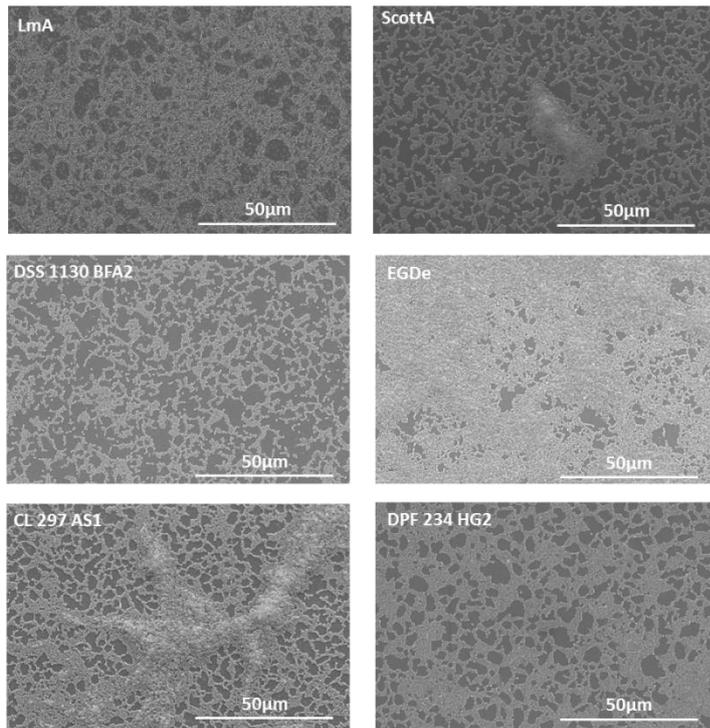


Figure 13 : Observations par MEB des biofilms des souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.

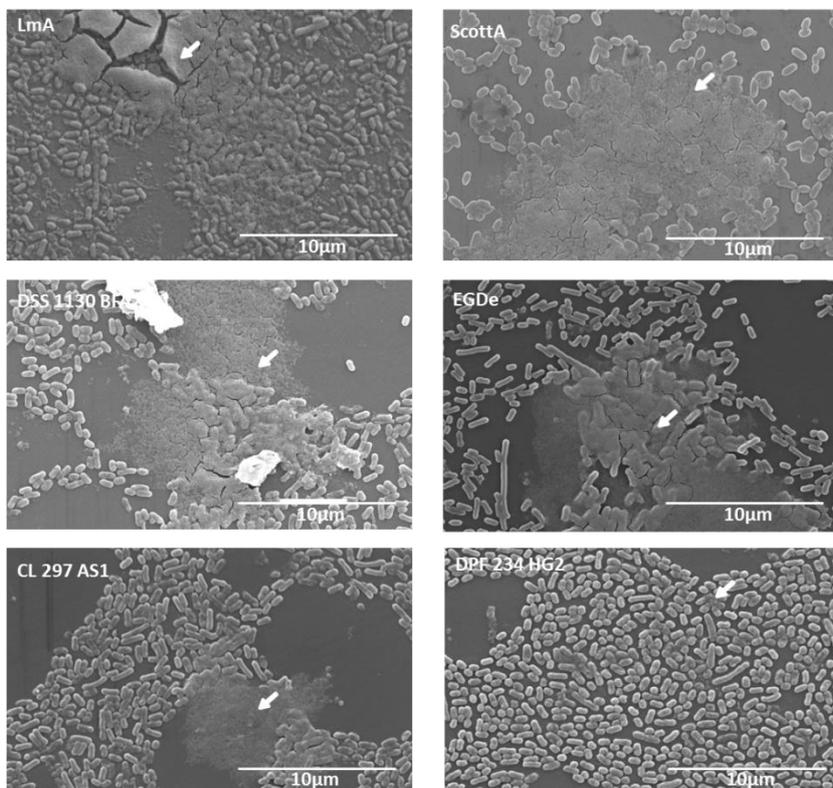


Figure 14 : Observations par MEB des biofilms des souches Lm A, Scott A, DSS 1130 BFA2, EGD-e, CL297 AS1, DPF 234 HG2 sur polystyrène à 37°C dans le milieu MCDB 202.

cellules plus ou moins denses mais composées de cellules isolées. La présence d'agrégats cellulaires avec des structures en 3D a été observée sur plusieurs champs. La densité cellulaire et la grandeur des agrégats sont apparues significativement différentes entre les souches.

Pour confirmer la présence de la matrice extracellulaire observée par microscopie en épifluorescence, les biofilms de 48 h ont été observés par MEB (Figures 13, 14). Pour toutes les souches, la présence de matrice extracellulaire (indiquée par une flèche blanche) a été validée. Elle était distribuée de façon hétérogène et la quantité est apparue différente en fonction des souches bactériennes. Une production plus importante a été observée pour la souche ScottA par rapport à la souche DPF 234 HG2 qui avait la plus faible production de matrice extracellulaire. L'architecture des biofilms observée par microscopie a été confirmée par les observations en MEB avec des tapis cellulaires distribués de façon assez hétérogène avec des zones sans bactéries et des zones pouvant être très denses en cellules avec des agrégats dont la densité et la taille variaient selon les souches étudiées.

1.3.2 Identification des polysaccharides présents dans la matrice extracellulaire et dans le milieu de culture des biofilms versus les polysaccharides pariétaux

Pour l'ensemble des souches étudiées, les polysaccharides ont été extraits à partir de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms cultivés durant 48 h et comparés aux polysaccharides pariétaux. Les polysaccharides de haut poids moléculaire ont été étudiés par les techniques de GC-MS et de spectroscopie ^1H -RMN.

1.3.2.1 Caractérisation des exopolysaccharides des souches de sérotype 4b

Afin de purifier les glucides (polysaccharides) extracellulaires (provenant du milieu de culture et de la matrice extracellulaire), nous avons utilisé la chromatographie de filtration sur gel. Elle permet la discrimination des molécules suivant leur taille et leur forme. Pour cela, un

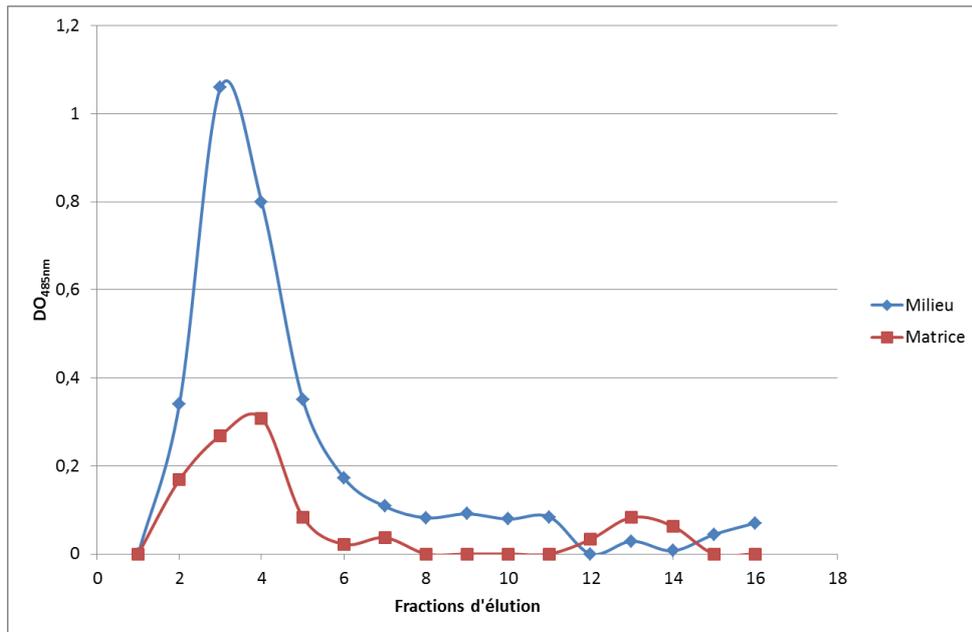


Figure 15 : Profils d'éluion obtenus après passage sur la colonne Sephadex G-50 des extraits bruts de glucides contenus à partir du milieu de culture (Bleu) et de la matrice extracellulaire (Rouge) des biofilms de la souche ScottA

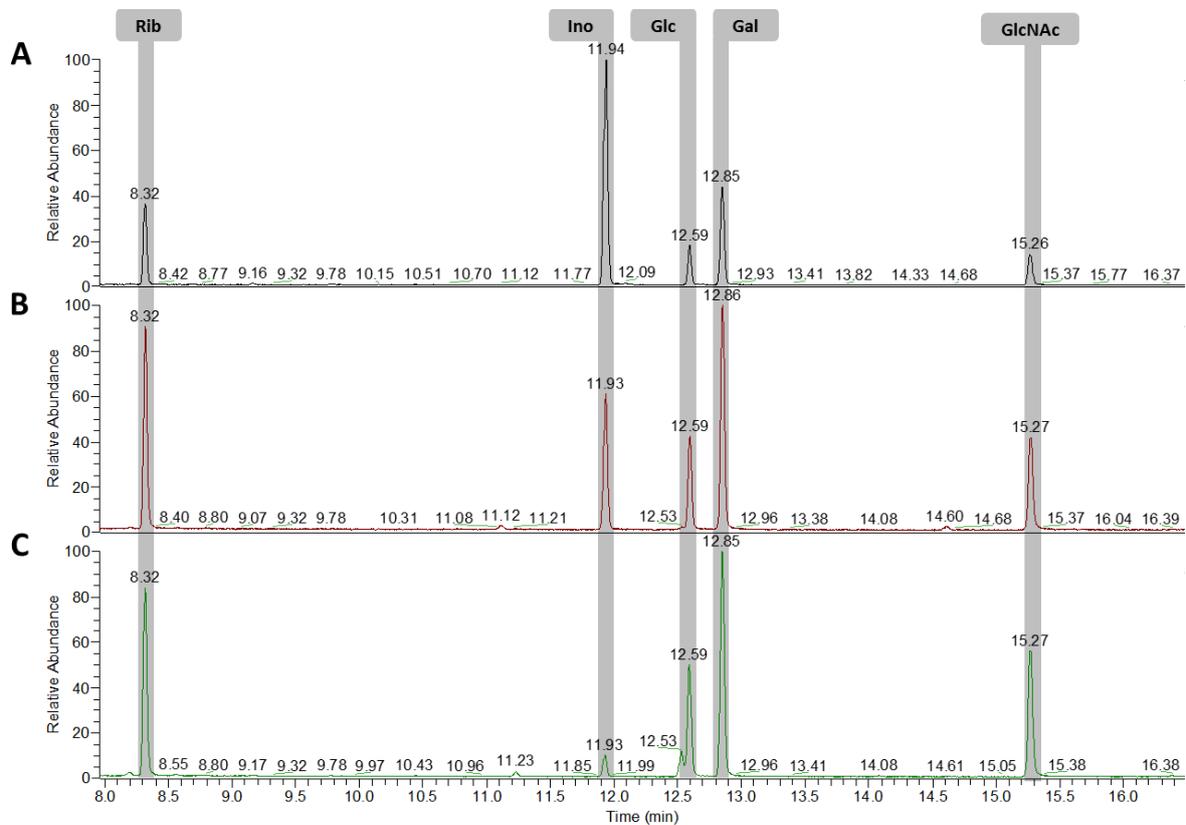


Figure 16 : Comparaison des profils GC-MS des polysaccharides provenant du milieu de culture (A), de la matrice extracellulaire (B) et de la paroi (C) de la souche ScottA de sérotype 4b. Rib : Ribitol, Ino : Inositol, Glc : Glucose, Gal : Galactose, GlcNAc : N-Acétyleglucosamine.

gel poreux composé de granules de différentes tailles est utilisé. Les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores des granules sont exclues et donc éluées, les premières au niveau du volume mort (volume d'eau externe aux granules ; V_0). Ensuite, les moyennes puis les petites molécules sont éluées progressivement. Dans nos travaux, nous avons utilisé le support Sephadex G-50 pour la purification des glucides extracellulaires de *L. monocytogenes* sur une colonne de 1,6 x 40 cm. Un aliquot de chaque fraction d'éluion a ensuite été testé pour la concentration en sucre neutre par la méthode de Dubois (Figure 15). Lors de l'éluion, les polysaccharides sont sortis dans les premières fractions et étaient bien séparés des fractions de bas poids moléculaire. Ces premiers résultats nous ont également indiqué que la quantité de glucides extracellulaires détectée était très faible dans la matrice et inférieure à celle du milieu de culture.

Les fractions correspondant aux glucides de haut poids moléculaire (polysaccharides) ont été recueillies, assemblées, lyophilisées puis la composition du polysaccharide de haut poids moléculaire a été déterminée par la technique GC-MS après sa conversion en alditol-acétate. Les monosaccharides obtenus après hydrolyse des liaisons osides peuvent être présents sous différentes conformations et ainsi donner plusieurs pics pour une même molécule. Pour éviter ce phénomène, une réduction a été réalisée afin d'obtenir un seul pic par monosaccharide (Figure 16). La comparaison des profils obtenus par la technique GC-MS à partir des polysaccharides extraits de la matrice, du milieu de culture des biofilms et de la paroi cellulaire de la souche ScottA ont permis de mettre en évidence la présence de monosaccharides identiques entre ces 3 préparations. Les monosaccharides identifiés étaient de l'anhydride ribitol, du ribitol (Rib), du glucose (Glc), du galactose (Gal) et du N-acétyl glucosamine (GlcNAc) en quantité approximativement équimolaire. L'Anhydro-ribitol correspond à du ribitol ayant adopté une conformation particulière lors de l'hydrolyse. Ces

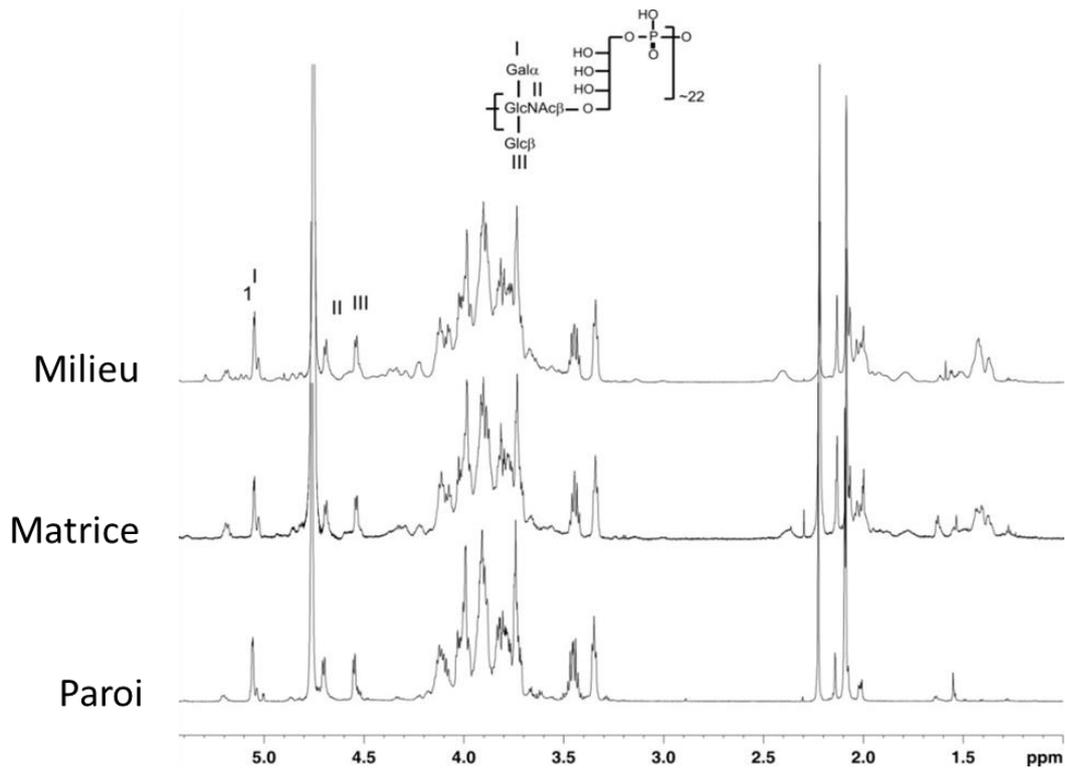


Figure 17 : Comparaison des spectres ^1H -RMN des polysaccharides provenant du milieu de culture, de la matrice extracellulaire et de la paroi de la souche ScottA de sérotype 4b

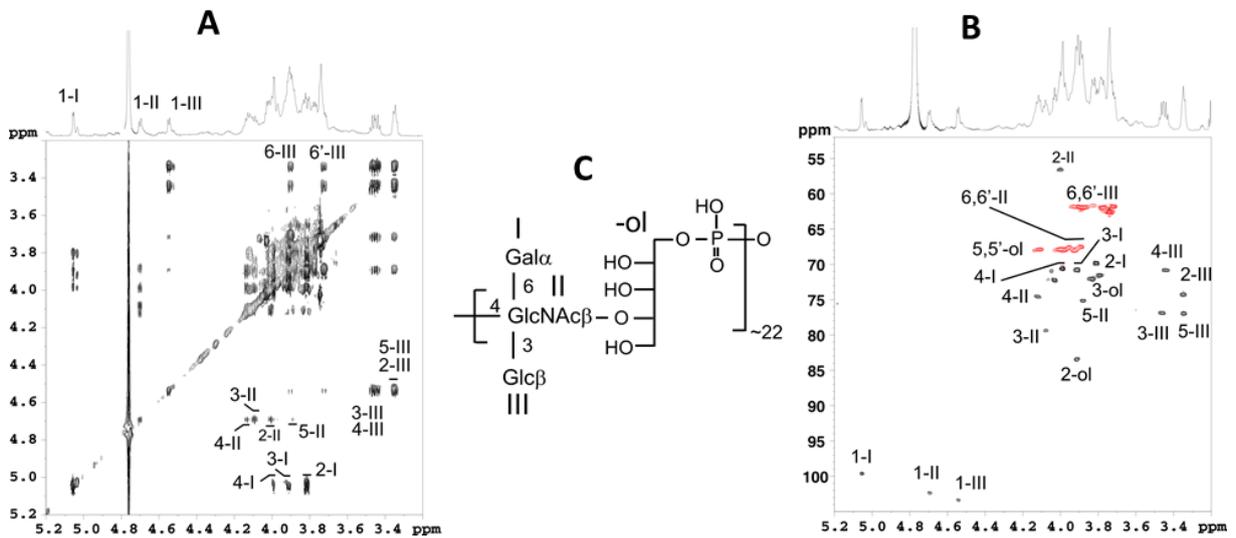


Figure 18 : Analyse $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY (A) et $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (B) du polysaccharide isolé de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche ScottA. Les signaux rouges correspondent à des groupes méthylènes. (C) Structure de l'acide téichoïque de type 4b identifié dans la matrice extracellulaire des biofilms de la souche ScottA.

résultats par la technique GC-MS nous ont permis de montrer que la composition du polysaccharide présent dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture des biofilms était identique à celui de la paroi cellulaire de la souche ScottA de *L. monocytogenes*.

Suite aux analyses réalisées par la technique GC-MS, la structure chimique de ces polysaccharides (paroi, matrice extracellulaire et milieu de culture) a été déterminée par la technique RMN (Figures 17, 18 ,Tableau 6). Les analyses RMN proton à une dimension des exopolysaccharides purifiés de la matrice, du milieu de culture des biofilms et de la paroi cellulaire de la souche Scott A ont montré que les trois échantillons étaient très similaires (Figure 17). Ils étaient tous caractérisés par la présence d'un polysaccharide majeur constitué de trois monosaccharides dont les protons anomères résonnent à δ 5,06 ; 4,70 et 4,55 ppm respectivement notés **I**, **II**, et **III**. La présence d'un signal intense dans la région des groupements N-acétyls (2,1 ppm) établit la présence d'un monosaccharide de type N-acétylhexosamine. Des signaux de contaminants mineurs restent visibles par exemple des groupes alkyles en zone de champ élevée, entre 1 et 2 ppm.

Pour déterminer plus précisément la structure de ce composé, des analyses RMN plus poussées incluant des analyses homonucléaires COSY et TOCSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ et hétéronucléaires HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ont été effectuées sur le polysaccharide isolé de la matrice extracellulaire (Figure 18, Tableau 6).

A partir des protons alpha anomériques à δ 5,06 ppm, noté **I**, trois corrélations à δ 3,82, 3,91 et 3,99 ppm correspondant respectivement aux H2, H3 et H4 ont été identifiées. Ce monosaccharide a été identifié comme un α -galacto sur la base des valeurs des trois constantes de couplage vicinales $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} < 2\text{Hz}$ and $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} < 2\text{Hz}$. Les carbones

Tableau 6 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C des résidus de l'acide téichoïque provenant de la souche ScottA. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et la valeur $^3J_{\text{H,H}}$ en Hz. Les valeurs en gras correspondent aux carbones substitués.

	1		2		3		4		5		6	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
α -Gal (I)	5,059 (3,3)	99,7	3,81 (10)	69,8	3,91 (<3)	70,7	3,99 (<3)	70,5	4,03	72,1	3,73	62,5
β -GlcNAc (II)	4,694 (8)	102,3	4,00 (7,5)	56,4	4,08 (7)	79,1	4,12	74,5	3,88	75,1	4,0/3,9	67,7
β -Glc (III)	4,541 (8)	103,3	3,35 (7,5)	74,2	3,46 (7)	76,8	3,44	70,8	3,34	74,2	3,88/3,77	61,8
Rib-ol (-ol)	~3.9/~3.7	~62.0	3,913	83,5	3,83	72,0	3,79	71,5	4,11/4.00	68,01	-	-

correspondants identifiés sur le ^1H - ^{13}C provenant du spectre HSQC ont montré que le proton **I** était en position terminale non réduite. Le deuxième proton anomérique à δ 4,71 ppm, noté **II**, avec un $^3J_{\text{H1,H2}}$ de 8.3 Hz était corrélé à un système de spins présentant uniquement des grandes constantes de couplage (jusqu'à 7 Hz) caractéristiques d'une configuration β -gluco. L'identification des carbones correspondants a mis en évidence que le C2 résonnant à δ 56,4 ppm présente une liaison avec un azote. Cette observation ajoutée à la présence d'un groupe méthyle d'N-acétyl à δ 2,09 / 23,9 ppm prouve que l'unité **II** est un résidu β -GlcNAc. Les valeurs des déplacements chimiques du C3, C4 et C6 raisonnant respectivement à δ 79,2, 74,5 et 67,8 ppm indiquent que ce GlcNAc est tri-*O*-substitué. Enfin, le troisième proton anomère, **III**, identifié à δ 4,55 ppm avec une grande constante de couplage, a été caractérisé comme un résidu β -glucose non réduit en terminal (Tableau 6). De plus, nous avons identifié des signaux corrélés à la présence d'un résidu de ribitol (**ol**). Les déblindages importants des valeurs des carbones C2 et C5 à respectivement δ 3,91/4,10 et 83,3/68,1 ppm démontrent que ces derniers étaient substitués par les unités monosaccharidiques. De plus, H5 et H5' présentent une constante de couplage complémentaire identifiée comme étant une constante de couplage hétéronucléaire vicinal ($^3J_{\text{H,C}} \sim 8\text{Hz}$) avec un atome de phosphore. Enfin un contact nOe fort entre les signaux **1-II** et **1-ol** et le C2 deblindé du **-ol** traduit que le résidu **II** est lié à l'unité ribitol. De plus, un contact nOe très élevé a été observé entre le **H1-III** et le **H3-II** avec le **6H** et le **6'H** prouvant que les résidus **III** et **I** sont liés au résidu **II**. Ces données et l'observation des carbones C3 et C6 deblindés du résidu β -GlcNAc **II** nous indiquent donc que le β -Glc **III** et l' α -Gal **I** sont liés au β -GlcNAc respectivement en position 3 et 6.

L'ensemble de ces données RMN nous a indiqué que l'exopolysaccharide majoritaire présent dans la matrice extracellulaire et dans le milieu de culture des biofilms de la souche de *L. monocytogenes* ScottA était un acide téichoïque de structure identique à celui présent dans

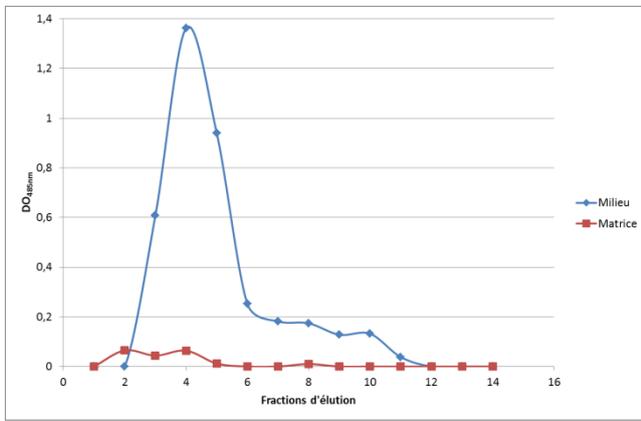


Figure 19 : Profils d'élution obtenus après passage sur la colonne Sephadex G-50 des extraits bruts de glucides contenus à partir du milieu de culture (Bleu) et de la matrice extracellulaire (Rouge) des biofilms de la souche EGD-e.

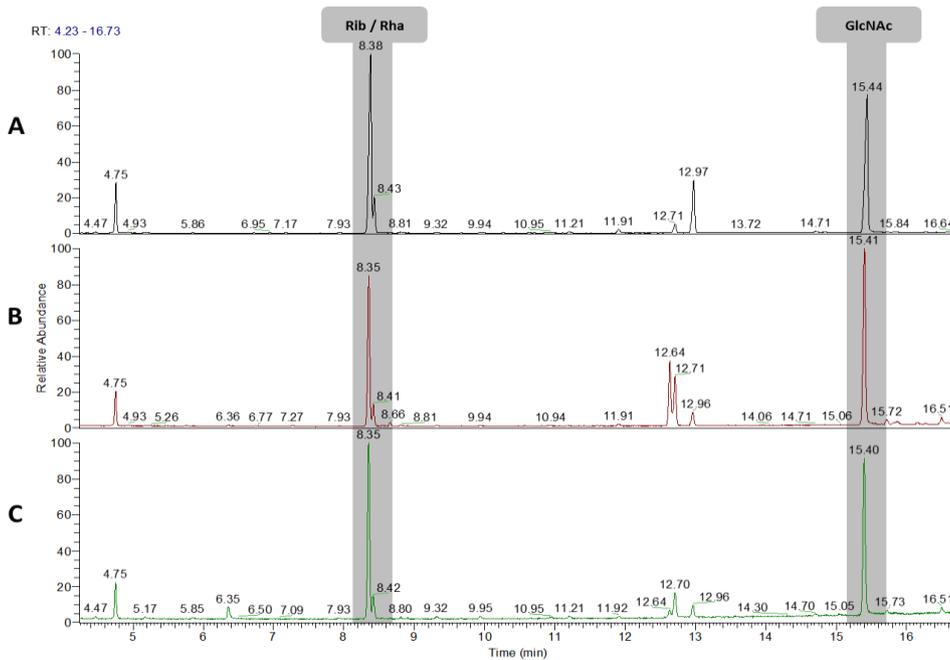


Figure 20 : Comparaison des profils GC-MS des polysaccharides provenant du milieu de culture (A), de la matrice extracellulaire (B) et de la paroi cellulaire (C) de la souche EGD-e de sérotype 1/2a. Rib: Ribitol, Rha: Rhamnose GlcNAc: N-Acétyleglucosamine.

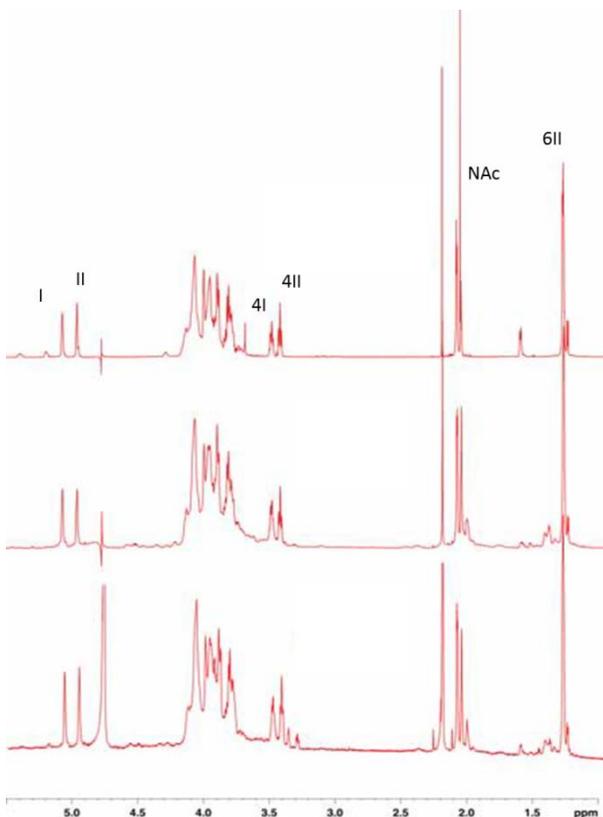


Figure 21 : Comparaison des spectres ^1H -RMN des polysaccharides provenant du milieu de culture, de la matrice extracellulaire et de la paroi de la souche EGD-e de sérotype 1/2a.

la paroi cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche LmA de sérotype 4b.

1.3.2.2 *Caractérisation des exopolysaccharides des souches de sérotype 1/2a*

Les mêmes analyses ont été effectuées sur les quatre souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a (CL 297 AS1, EGD-e, 234 HG2 DPF, DSS 1130 BFA2).

Comme pour les souches de sérotype 4b, l'élution des polysaccharides extracellulaires a indiqué que la quantité de glucides extracellulaires détectée était très faible dans la matrice extracellulaire et inférieure à celle du milieu de culture des biofilms de *L. monocytogenes* EGD-e de sérotype 1/2a (Figure 19).

Une fois les polysaccharides purifiés, la composition de ces derniers a été déterminée par la technique GC-MS (Figure 20). La comparaison des profils obtenus par la technique GC-MS à partir des polysaccharides extraits de la paroi cellulaire, de la matrice et du milieu de culture des biofilms de la souche EGD-e a permis de mettre en évidence la présence de monosaccharides identiques entre ces 3 préparations. Les monosaccharides identifiés sont de l'anhydro-ribitol, du Rib, du GlcNAc et du rhamnose (Rha). Ces résultats GC-MS nous ont indiqué que la souche EGD-e avait dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture un polysaccharide de composition identique au polysaccharide présent dans la paroi des cellules.

Suite à ces observations, la nature de ces polysaccharides (paroi, matrice extracellulaire et milieu de culture) a été déterminée par la technique RMN (Figures 21, 22, Tableau 7). Il a été montré la présence d'un polysaccharide de structure similaire dans les trois préparations avec la présence de deux monosaccharides dont les protons anomères résonnent à δ 5,08 et

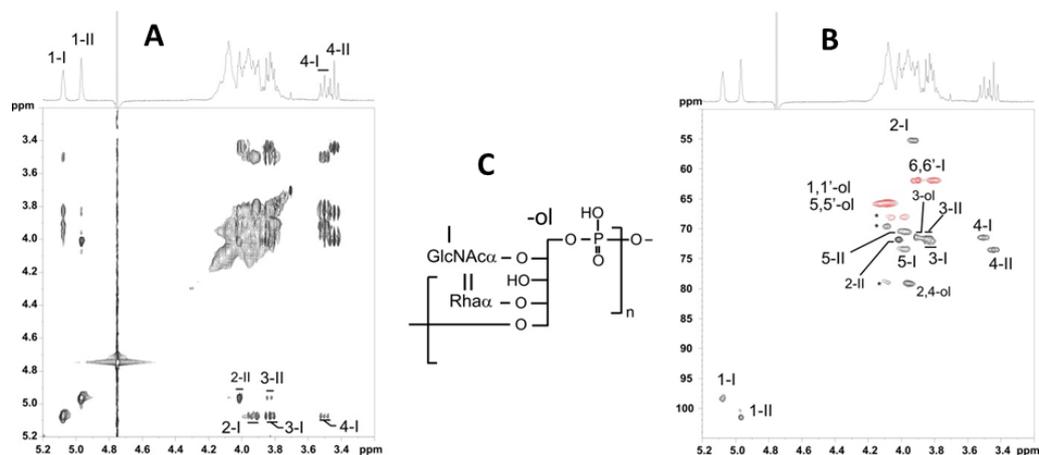


Figure 22 : Analyse $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY (A) et $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (B) du polysaccharide isolé de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche EGD-e. Les signaux rouges correspondent à des groupes méthylènes. (C) Structure de l'acide téichoïque de type 1/2a identifié dans la matrice extracellulaire des biofilms de la souche EGD-e.

Tableau 7 : Déplacements chimiques exprimés en ppm (δ) du proton et du carbone provenant de l'acide téichoïque isolé de la souche EGD-e.

protons	1		2		3		4		5		6	
	^1H	^{13}C										
α -GlcNAc (I)	5,08	98,3	3,93	55,2	3,83	72,0	3,50	71,4	3,98	73,3	3,91/3,80	61,9
α -Rha (II)	4,97	101,5	4,02	71,7	3,84	71,6	3,45	73,5	3,98	70,4	1,32	18,2
Rib-ol (-ol)	~4,1	~65,7	3,96	79,0	3,91	71,3	3,96	79,0	4,1	65,5	-	-

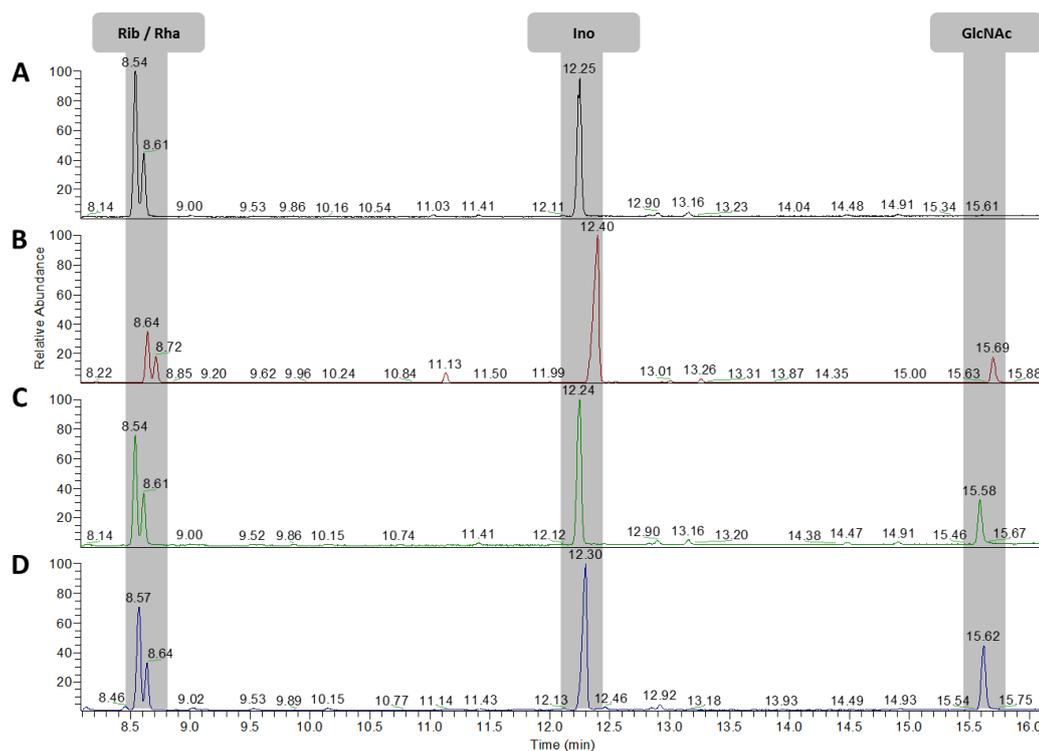


Figure 23 : Comparaison des profils GC-MS des polysaccharides provenant de la matrice extracellulaire des biofilms de A) DSS1130 BFA2, B) EGD-e, C) DPF 234 HG2 et D) CL 297 AS1. Rib: Ribitol, Rha: Rhamnose, Ino: Inositol, GlcNAc: N-Acétyleglucosamine.

4,97 ppm respectivement notés **I**, **II**. Une petite constante de couplage compatible avec une α -configuration est visible.

La lecture du système de spins à partir du résidu **I** sur le spectre 300 ms-TOCSY (Figure 22) suggère une configuration α -gluco. L'identification des carbones correspondants met en évidence que le C2 résonnant à δ 56,4 ppm, présente une liaison avec un azote. En outre, la présence d'un groupe N-acétyle (2,11 / 23,5 ppm) montre que le résidu **I** est du α -GlcNAc. En ce qui concerne le résidu **II**, il a été caractérisé comme un résidu α -Rha basé sur un ensemble des constantes de couplage vicinal correspondant à une configuration manno. La présence d'un groupe méthyle à δ 1,32 / 18,2 ppm. Il a été indiqué que ce résidu était un résidu 6-désoxy-mannosyle. Un spectre HMBC (non représenté) a permis de confirmer que les résidus α -GlcNAc et α -Rha étaient liés au résidu de ribitol respectivement en position 2 et 4.

L'ensemble de ces données RMN a permis de déterminer que l'exopolysaccharide majoritaire présent dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture des biofilms de la souche de *L. monocytogenes* EGD-e était un acide téichoïque de structure identique à l'acide téichoïque présent dans la paroi cellulaire.

Les analyses GC-MS (Figure 23) ont permis de mettre en évidence que les exopolysaccharides isolés des biofilms des souches DPF 234 HG2 et CL297 AS1 avaient une composition identique aux polysaccharides isolés de la souche EGD-e.

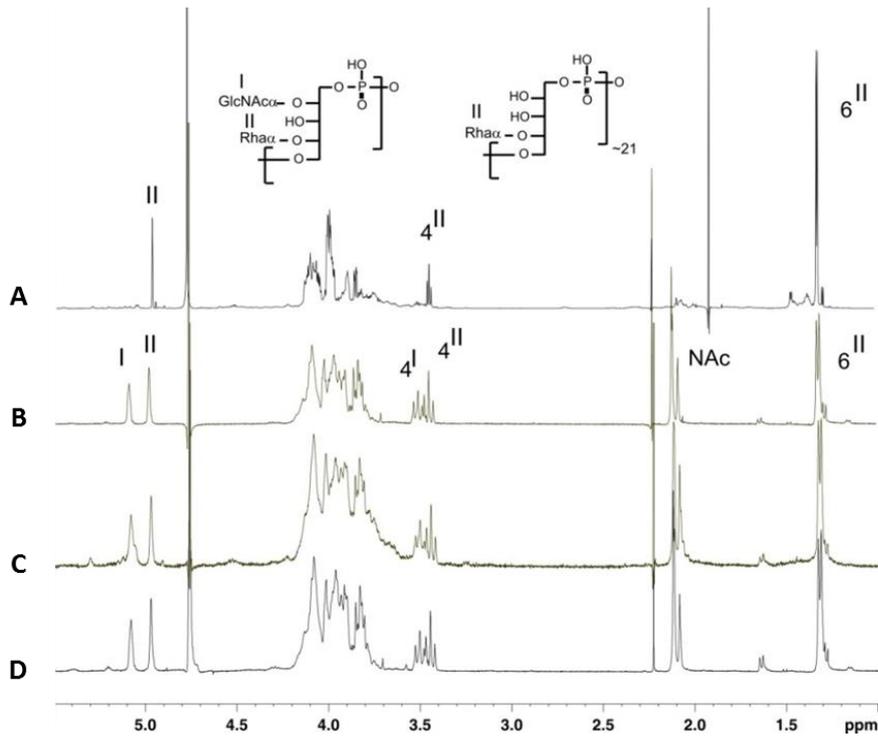


Figure 24 : Comparaison des spectres $^1\text{H-NMR}$ des polysaccharides provenant de la matrice extracellulaire des biofilms des souches A) DSS1130 BFA2, B) EGD-e, C) DPF 234 HG2 et D) CL 297 AS1.

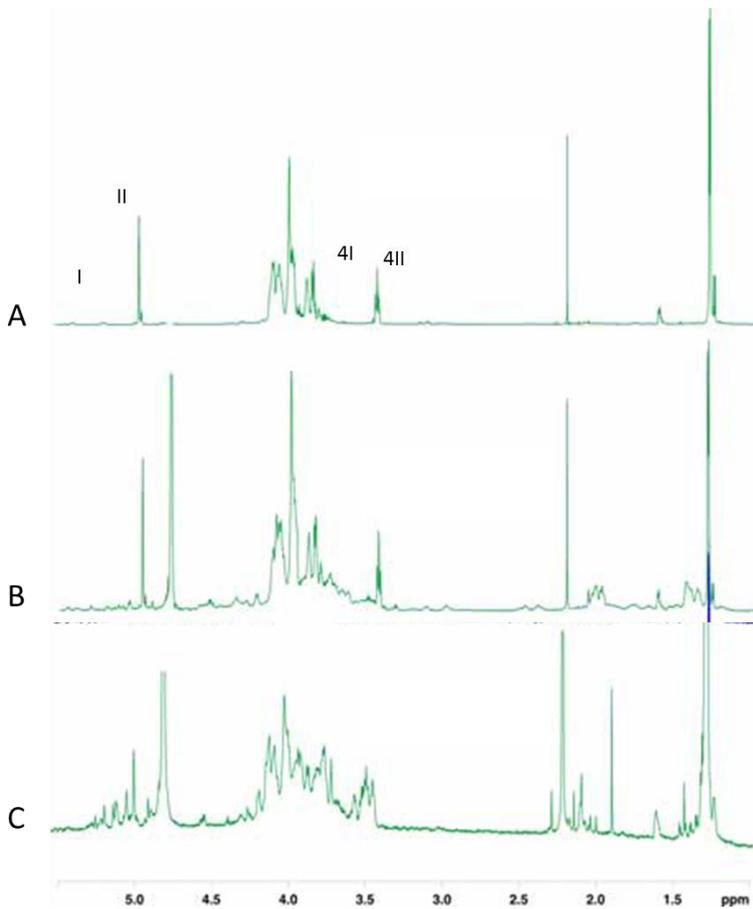


Figure 25 : Comparaison des spectres $^1\text{H-NMR}$ des polysaccharides provenant des parois bactériennes (A), de la matrice extracellulaire (B) et du milieu de culture (C) des biofilms de la souche DSS1130 BFA2

Par contre, pour la souche DSS 1130 BFA2, une composition similaire a également été observée mais avec l'absence du résidu GlcNAc. Le polysaccharide pariétal de cette souche avait une composition identique.

La comparaison des spectres ^1H RMN (Figure 24). a permis de confirmer que les souches DPF 234 HG2 et CL297 AS1 avaient dans leur paroi ainsi que dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture de leur biofilm, un exopolysaccharide de structure similaire à l'acide téichoïque identifié dans les biofilms de la souche EGD-e.

Pour la souche DSS 1130 BFA2, l'analyse des polysaccharides de la paroi et extraits de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms (Figures 24, 25) a permis de mettre en évidence une absence d'un signal à δ 5,08 ppm (**I**) concordant avec l'absence du groupe N-acétyl (δ 2,1 ppm) et le pseudo-triplet signaux H4 de l'unité I (**4I**). Ces données ont confirmé les résultats obtenus par la technique GC-MS. Elles ont également montré que la souche DSS 1130 BFA2 avait un polysaccharide majoritaire dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture des biofilms. Ce polysaccharide est un acide téichoïque dépourvu de substitution GlcNAc de composition similaire à l'acide téichoïque pariétal.

1.3.3 Séquençage des gènes *lmo2549* et *lmo2550* des quatre souches de *Listeria monocytogenes* de sérotype 1/2a étudiées

Les 2 gènes, *lmo2549* et *lmo2550*, codent des glycosyltransférases impliquées dans la ramification du GlcNAc sur l'acide téichoïque des souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a.

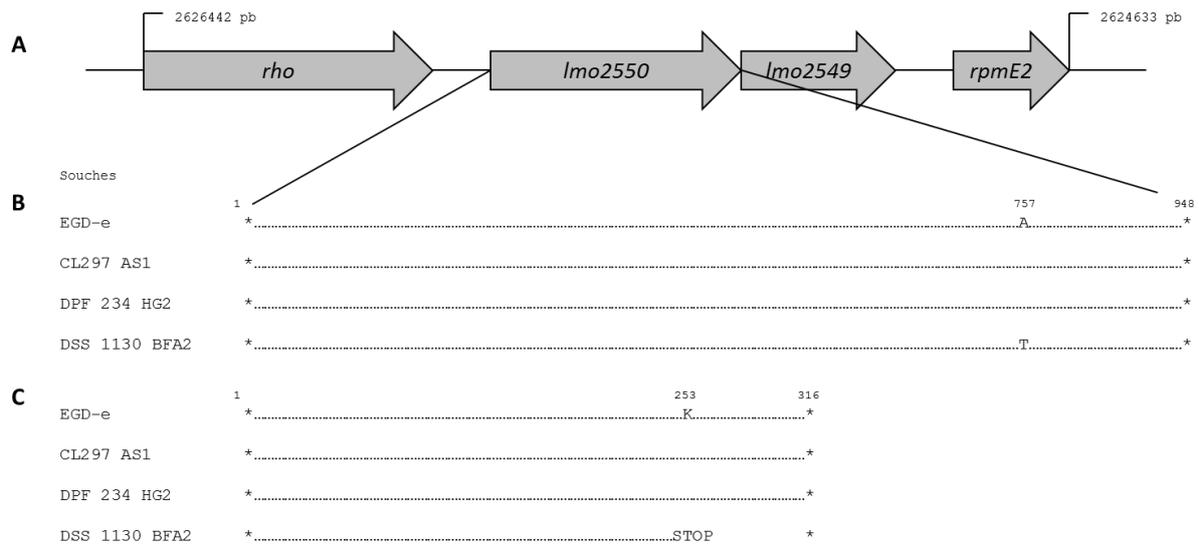


Figure 26 : Alignement des séquences du gène *Imo2550* de la souche EGD-e avec les 93 souches séquencées.

A. Organisation schématique de la région génomique comprenant *Imo2550* et *Imo2549* dans la souche EGD-e.

B. Alignement des séquences nucléotidiques de *Imo2550* provenant des souches CL297 AS1 (Accession#: LN883845), DPF 234 HG2 (Accession#: LN883844) et DSS 1130 BFA2 (Accession#: LN883847) avec la souche de référence EGD-e (Accession#: LN883846)

C. Alignement des séquences d'acides aminés des protéines *Imo2550* déduites des séquences géniques des souches CL 297 AS1, DPF 234 HG et DSS 1130 BFA2 par rapport à la souche de référence EGD-e.

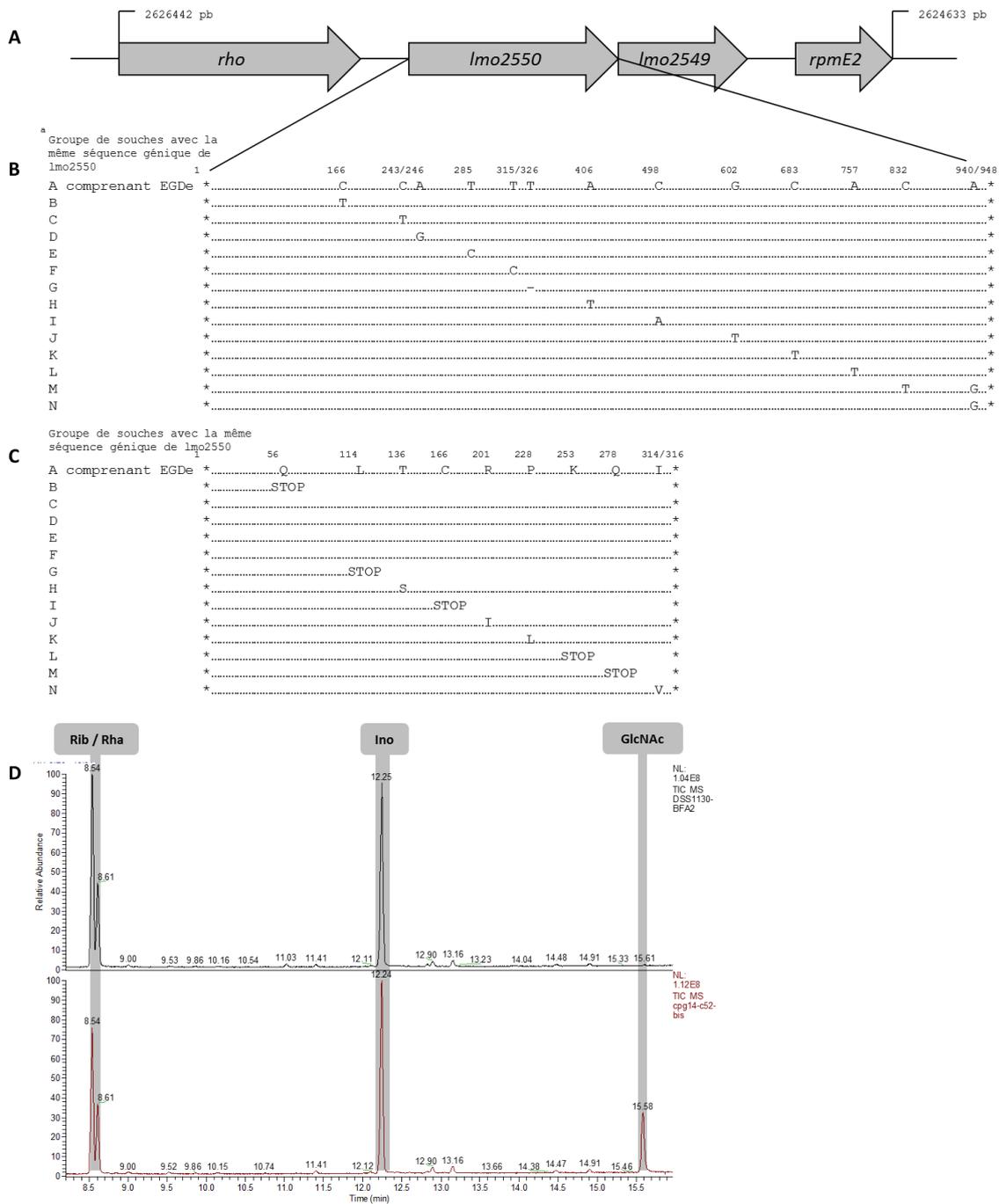
Les chiffres et les étoiles indiquent la position des codons start et des codons stop.

Les lignes en pointillé indiquent l'absence de différences de nucléotides ou d'acides aminés. Les autres chiffres indiquent les positions des mutations.

Afin de vérifier si l'absence de résidu GlcNAc dans l'acide téichoïque de la souche DSS 1130 BFA2 était due à une mutation des gènes *lmo2549* et/ou *lmo2550*, nous avons effectué un séquençage de ces deux gènes dans la souche DSS 1130 BFA2 ainsi que dans les trois autres souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a étudiées (DPF 234 HG2, EGD-e et CL 297 AS1) (Figure 26). Les séquences des gènes *lmo2549* (438 pb) et *lmo2550* (948 pb) de chaque souche ont été comparées à celles de la souche de référence EGD-e (sérotype 1/2a, numéro d'accèsion GenBank AL591824). Toutes les séquences du gène *lmo2549* des 4 souches étudiées étaient identiques à 100%. Les séquences du gène *lmo2550* des souches DPF 234 HG2 et CL 297 AS1 étaient identiques à celle de la souche de référence EGD-e (Figure 26 A, B, C). Par contre, concernant la souche DSS 1130 BFA2, produisant un acide téichoïque dépourvu de GlcNAc, nous avons mis en évidence une substitution d'une adénine par une thymine en position 757 provoquant l'apparition d'un codon stop entraînant un arrêt prématuré de la traduction à la position 253, ayant pour résultat une protéine tronquée dépourvue des 62 derniers acides aminés en C-terminale. Ces résultats expliquent donc l'absence de GlcNAc.

1.3.4 Fréquence de mutation des gènes *lmo2549* et *lmo2550* dans un panel de souches de *Listeria monocytogenes* de sérotype 1/2a

Afin de vérifier si l'absence de GlcNAc sur l'acide téichoïque observée chez la souche DSS 1130 BFA2 était un phénotype fréquent ou non chez les souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a, nous avons effectué un séquençage des gènes *lmo2549* et *lmo2550* sur un panel de 89 souches de sérotype 1/2a isolées de l'industrie des produits de la pêche ou d'épidémies. L'ensemble des séquences obtenues sur le panel de 89 souches ainsi que sur les souches DPF 234 HG2, EGD-e, CL 297 AS1 et DSS 1130 BFA2 a été comparé avec la souche de référence EGD-e (Figure 27 A). Toutes les séquences du gène de *lmo2549* sont apparues



^a : Se référer au tableau des souches en matériel et méthode

Figure 27 : Alignement des séquences du gène *lmo2550* de la souche EGD-e avec les 93 souches séquencées.
A. Organisation schématique de la région génomique comprenant *lmo2550* et *lmo2549* dans la souche EGD-e.
B. Alignement des séquences nucléotidiques de *lmo2550* provenant de la souche EGD-e avec les 93 souches séquencées.
C. Alignement des séquences d'acides aminés des protéines *lmo2550* déduites des séquences géniques de la souche EGD-e et des 93 souches séquencées. Les chiffres et les étoiles indiquent la position des codons start et des codons stop. Les lignes en pointillé indiquent l'absence de différences de nucléotides ou d'acides aminés. Les autres chiffres indiquent les positions des mutations. Le trait plein indique une substitution nucléotidique.
D. Profil GC-MS de l'acide teichoïque pariétal provenant des souches mutées. Le profil en noir représente les résultats obtenus avec la souche DSS 1130 BFA2 (groupe L) similaire aux profils des souches C4049 OT (groupe B), C3248 OS (groupe I), D829 OS2 (groupe J), DA1583.3 a3 (groupe K), C55 83 APL1 (groupe M), CS5d (groupe G) et B7678P1 (Groupe N). Le profil en rouge représente les résultats obtenus avec la souche EGD-e (groupe A) similaire aux profils des souches B131 P2 (groupe C), CP 614 CS2 (groupe D), CP627 BFS1 (groupe E), B8005 P1 (groupe F), et C1063 O1 (groupe H). Rib: Ribitol, Rha: Rhamnose, Ino: Inositol, GlcNAc: N-Acétyleglucosamine.

100% identiques. En revanche, 53% des souches avaient une mutation dans le gène *lmo2550*. Les trois types de mutations trouvés étaient : non-sens, silencieuses et faux-sens (Tableau 5, Figures 27 A, B, C). Pour la souche DSS 765 BA3, nous avons identifié une mutation similaire à celle observée dans la souche DSS 1130 BFA2, à savoir la substitution d'une adénine par une thymine en position 757 provoquant l'apparition d'un codon stop en position 253 de la séquence d'acides aminés (souches du groupe L). Le séquençage du gène *lmo2550* a révélé trois autres mutations par substitution conduisant à des mutations non-sens: Cyto166Thym (groupe B comportant deux souches), Cyto498Ala (groupe I avec deux souches), et le groupe M avec une souche, où deux mutations étaient visibles: Cyto832Thym et Ala940Gua. Enfin, la délétion d'une thymine en position 326 dans les deux souches du groupe G, B7681 et CS5d P1, ont provoqué un décalage dans le cadre de lecture entraînant l'apparition prématurée d'un codon stop. Au total, 9 souches ont ainsi été identifiées comme exprimant une protéine Lmo2550 tronquée.

Nous avons également identifié que 28% des souches étaient porteuses d'une mutation silencieuse: Cyto243Thym (groupe C comportant 11 souches), Ala246Gua (groupe D comportant 3 souches), Thym285Cyto (E groupe comportant 3 souches), et Thym315Cyto (groupe F comportant 9 souches). Pour 15% des souches, le séquençage du gène *lmo2550* a révélé quatre mutations faux-sens: Ala406Thym (groupe H comportant 5 souches), Gua602Thym (groupe J comportant une souche), Cyto683Thym (groupe K comportant une souche), et Ala940Gua (N groupe comportant 7 souches). Il est important de noter que plusieurs souches présentant des mutations différentes ont été isolées à partir du même site sur plusieurs années.

Pour confirmer les résultats de séquençage, nous avons vérifié la présence de GlcNAc ou non sur l'acide téichoïque pariétal par la technique de GC-MS en analysant les polysaccharides d'une souche par groupe de souches avec la même mutation sur le gène *lmo2550* (13 mutants) (Tableau 5, Figure 27 D). L'analyse des 13 mutants a révélé que plus de la moitié des mutations entraînait une absence de ramification du GlcNAc sur l'acide téichoïque de sérotype 1/2a. Toutes les souches porteuses d'une mutation non-sens dans le gène *lmo2550* (groupes B, G, I, L et M) étaient incapables de ramifier le GlcNAc sur leur acide téichoïque. De même, 100% des souches porteuses d'une mutation silencieuse (groupes C, D, E et F) ont ramifié le GlcNAc sur leur acide téichoïque. Concernant les mutations faux sens (groupes F, J, K et N), 50% des souches ont perdu leur capacité à ramifier l'acide téichoïque de GlcNAc ce qui est le cas pour les souches D829 OS2 (groupe J) et DA1583.3 a3 (groupe K). Au total sur les 13 souches analysées, 54% ne présentaient pas de ramification du GlcNAc sur leur acide téichoïque pariétal. Par contre, la ramification du Rha sur l'acide téichoïque était présente sur les 13 souches de sérotype 1/2 a analysées.

1.4 Discussion

Dans les conditions expérimentales de ces travaux, les six souches de *L. monocytogenes* étudiées, appartenant aux sérotypes 4b et 1/2a, étaient capables de former des biofilms sur polystyrène à 37°C pendant 48 h dans le milieu pauvre MCDB 202. La population de cellules viables cultivables des biofilms est apparue souche dépendante, mais les différences n'étaient pas liées au sérotype de la souche ou à leur origine, ce qui était conforme aux observations faites dans d'autres travaux (Borucki, et al., 2003, Renier, et al., 2011, Combrouse, et al., 2013). D'autres études ont mis en évidence une corrélation entre la lignée et la capacité de formation des biofilms par *L. monocytogenes* avec une production accrue de biofilm par les souches de lignée I comparées aux souches des lignées II et III (Djordjevic, et al., 2002, Pan, et al., 2009, Nilsson, et al., 2011) ou inversement les souches de lignée I

produisaient moins de biofilms que celles de lignée II (Lunden, et al., 2000, Norwood et Gilmour, 2001, Borucki et Call, 2003). Ces observations divergentes pourraient être expliquées par des conditions expérimentales différentes selon les études. Nos observations, par microscopie en épifluorescence et par microscopie électronique à balayage, nous ont permis de montrer que les six souches étudiées formaient des biofilms hétérogènes avec aussi bien des cellules isolées que des structures tridimensionnelles avec des agrégats de bactéries en multicouche. Des observations similaires ont été faites par Mai et Conner (2007), Combrouse, et al. (2013), Guilbaud, et al. (2015), mais là encore, la densité et la structure des biofilms de *L. monocytogenes* étaient très affectées par le substrat et les conditions environnementales (Borucki, et al., 2003, Nilsson, et al., 2011). La production de matrice extracellulaire plus ou moins importante a été proposée pour être un des facteurs participant à la formation des biofilms (Flemming et Wingender, 2010). Dans nos travaux, quelle que soit la souche étudiée, les cellules sont apparues entourées d'une matrice extracellulaire distribuée de manière hétérogène et avec une quantité dépendante de la souche. Comme le rapporte Combrouse, et al. (2013), la matrice extracellulaire de *L. monocytogenes* serait en grande partie composée de protéines, d'ADNe et de glucides. Plusieurs études ont utilisé principalement des techniques colorimétriques diverses (coloration au rouge de Congo (Tiensuu, et al., 2013, Chen, et al., 2014), l'utilisation de lectines (Hefford, et al., 2005), l'utilisation d'anticorps spécifiques (Cywes-Bentley, et al., 2013), la coloration phénolique/acide sulfurique (Combrouse, et al., 2013) ou encore le calcofluor à 0,05% (Bonsaglia, et al., 2014) pour démontrer la présence aspécifique de carbohydrates extracellulaires dans les biofilms de *L. monocytogenes*. Actuellement, aucune étude n'est disponible sur la caractérisation des glucides de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*. Pour répondre à cette question, nous avons effectué une extraction des polysaccharides pariétaux, des polysaccharides de la matrice extracellulaire et du milieu de

culture de six souches de *L. monocytogenes* de sérotypes 1/2a et 4b. Pour s'assurer d'un minimum de lyse cellulaire, la viabilité des cellules a été vérifiée dans des expériences préliminaires par dénombrement sur milieux gélosés avant et après l'étape de sonication pour détacher la matrice extracellulaire du biofilm (Annexe 3). Les résultats obtenus par les techniques de GC-MS et de RMN, nous ont permis de mettre en évidence que la composition et la structure des polysaccharides extraits de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms formés par des souches de sérotype 4b étaient identiques à l'acide téichoïque pariétale de *L. monocytogenes* de sérotype 4b (Fujii, et al., 1985, Uchikawa, et al., 1986, Fiedler, 1988, Promadej, et al., 1999, Eugster, et al., 2015). Le polysaccharide pour *L. monocytogenes* de sérotype 4b est composé d'unités répétées comprenant une chaîne de poly(ribitol phosphate) glycosylée en position 2 avec le β -GlcNAc, qui est à son tour substitué en C3 par du β -Glc et en C6 par du α -Gal. Les unités répétées sont liées par une liaison phosphodiester entre le C5 du ribitol et le C4 du β -GlcNAc. Des résultats similaires ont été obtenus à partir des souches de *L. monocytogenes* de sérotype 1/2a (EGD-e, 234 HG2 DPF, CL297 AS1) où les exopolysaccharides avaient une composition et une structure similaire à l'acide téichoïque pariétal. Ce dernier se compose d'une chaîne principale de poly (ribitol phosphate) à laquelle est ramifié en position C2 un α -Rha et en position C4 un α -GlcNAc. Les unités répétées sont liées par une liaison phosphodiester entre le C5 de l'unité ribitol et le C1 de l'unité phosphate.

La classification de *L. monocytogenes* par sérotype est basée sur la réaction Anticorps/Antigène par agglutination en utilisant différents sérums (13 antigènes somatiques (O) et 4 antigènes flagellaires (H)) (Eugster, et al., 2015). Les composants somatiques de *Listeria* sont associés principalement aux acides téichoïques pariétaux. Ces polysaccharides sont également importants dans la sensibilité aux bactériophages (Eugster, et al., 2011, Denes, et al., 2015), la

virulence (Dubail, et al., 2006), et la sensibilité aux peptides antimicrobiens (Carvalho, et al., 2015). Nos résultats sont en accord avec des observations faites sur les biofilms d'autres bactéries Gram positif, telles que *S. epidermidis* et *S. aureus* où un des polysaccharides isolés de la matrice extracellulaire était de l'acide téichoïque de structure identique à l'acide téichoïque pariétale (Hussain, et al., 1992, Sadovskaya, et al., 2005, Vinogradov, et al., 2006, Jabbouri et Sadovskaya, 2010). Ceci est en accord avec le fait qu'une grande partie de l'acide téichoïque de la paroi cellulaire se trouve dans la « surcouche » de la région au-delà de la paroi cellulaire (Neuhaus et Baddiley, 2003) ce qui indique que les molécules d'acides téichoïques staphylococciques pourraient être libérées de la surface cellulaire et devenir une composante de la matrice extracellulaire, ou du biofilm, lorsque les cellules sont fixées à une surface solide (Kogan, et al., 2006). A l'inverse, il n'a pas été identifié, dans les polysaccharides solubles extraits de la matrice extracellulaire ou de la paroi cellulaire, après fractionnement sur la colonne Sephadex G-50, le polysaccharide insoluble poly- β - (1,4) -N-acétyl-mannosamine ramifié avec le galactose lié en α -1,6 terminal qui a été décrit dans la paroi cellulaire de souches mutantes EGD-e $\Delta pdeB/C/D$ (Koseoglu, et al., 2015). Une des explications serait que l'identification de ce polysaccharide insoluble a été réalisée dans des conditions de culture planctonique, à partir d'un mutant de la souche EGD-e surproduisant des polysaccharides induits par le c-di-GMP, le mutant $\Delta pdeB/C/D$. Ni la souche sauvage EGD-e ni le mutant $\Delta pdeB/C/D\Delta pssC$, utilisé par les auteurs comme un contrôle négatif, n'ont été étudiés pour la production de ce polysaccharide insoluble. De plus, cet exopolysaccharide n'a pas été décrit dans les études portant sur la matrice extracellulaire de biofilms d'autres bactéries Gram positif ou Gram négatif contrairement à l'acide téichoïque.

En étudiant la souche DSS 1130 BFA2 de *L. monocytogenes*, nous avons identifié qu'elle fabriquait un acide téichoïque de structure identique à celui des souches de sérotype

1/2a, sans ramification du GlcNAc. Cette même structure a été retrouvée dans les extraits de matrice extracellulaire, de biofilm et de paroi. Nous avons identifié 2 gènes décrits dans la littérature : *lmo2549* et *lmo2550* qui sont responsables de cette ramification du GlcNAc sur les acides téichoïques pour les souches de sérotype 1/2a. Le gène *lmo2549* a été identifié pour la première fois dans la souche de référence EGD-e comme codant une glycosyl transférase (Eugster, et al., 2011). Cette protéine, de 145 acides aminés, présente 82% de similarité avec la protéine GtcA présente dans les souches de sérotype 4b. Le gène *lmo2549* est flanqué par le gène *lmo2550* qui code également une glycosyl transférase de 315 acides aminés. Lors de son identification, le gène *lmo2550* a présenté un fort degré de similarité avec le gène *csbB* présent chez *Bacillus subtilis* (Autret, et al., 2001). Dans nos travaux, nous avons identifié la souche DSS 1130 BFA2 avec une mutation spontanée sur le gène *lmo2550* qui était une substitution en position 757 de la séquence nucléique. Cette mutation a entraîné l'expression d'une protéine Lmo2550 tronquée, donc potentiellement inactive, ce qui explique l'absence de la ramification GlcNAc. Les premiers travaux faisant référence également à une bactérie avec une mutation spontanée sur le même gène sont ceux de Wendlinger, et al. (1996) avec l'étude de la souche WSLC 1442 de sérotype 1/2a. Des travaux complémentaires ont été réalisés par Eugster, et al. (2011) qui ont pu mettre en évidence que le gène *lmo2549* de la souche WSLC 1442 présentait une séquence identique à celle de la souche de référence EGD-e. Par contre pour la séquence du gène *lmo2550*, ils ont observé qu'il y avait une délétion de deux nucléotides en position 749 et 750 par rapport à celle de la souche de référence EGD-e. Cette mutation a conduit à un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon stop en position 259 ce qui expliquait l'absence de ramification GlcNAc sur les acides téichoïques de la souche WSLC 1442. La souche DSS 1130 BFA2 (de nos travaux) et la souche WSLC 1442 (Eugster, et al., 2011) ont été isolées à partir de différentes industries de transformation des aliments et ont des mutations à des positions différentes sur le gène *lmo*

2550. Lors de leurs travaux, Eugster, et al. (2011) ont également construit deux mutants de la souche de référence EGD-e (*EGD-eΔlmo2549* et *EGD-eΔlmo2550*) incapables de se lier au bactériophage PlyP35. Dans nos travaux, le biofilm de 48 h de la souche DSS 1130 BFA2 avait une population bactérienne semblable à celle des souches de sérotype 4b et à celles de sérotype 1/2a. L'absence de GlcNAc sur l'acide téichoïque n'a pas impacté la formation du biofilm de 48 h. Sur la base des homologues de séquence, les deux gènes *lmo2549* et *lmo2550* sont impliqués dans la glycosylation de l'acide téichoïque pariétal.

Pour la première fois, nous avons appliqué la même approche sur 89 souches de sérotype 1/2a isolées de produits de la mer ou d'épidémies. Les séquences du gène *lmo2549* des souches du panel étaient identiques à 100% avec celle de la souche de référence EGD-e. Par contre, le gène *lmo2550* était muté dans environ la moitié des souches de sérotype 1/2a résultant des mutations non-sens, silencieuses ou faux-sens. Nous avons identifié une nouvelle suppression d'une base en position 326 dans deux souches (B7681 P1 et CS5d) qui a conduit à un codon stop sur la protéine Lmo2550. Cette nouvelle mutation par délétion identifiée sur le gène *lmo2550* était différente de celle décrite dans l'étude d'Eugster, et al. (2011). De plus, 10% des souches étudiées avaient une protéine Lmo2550 tronquée et 28% des souches avaient une mutation de nucléotides sans modification de la protéine Lmo2550. Nous avons identifié pour 15% des souches, une mutation nucléotidique sur le gène *lmo2550* provoquant une mutation de l'acide aminé sur la protéine. Il est important de noter que 100% des souches porteuses d'une mutation silencieuse ou non-sens avaient la capacité ou non de ramifier le GlcNAc sur leur acide téichoïque. Par contre, la moitié des souches porteuses d'une mutation faux sens n'ont pas ramifié le GlcNAc sur l'acide téichoïque. Les mutations des bases étaient en position 602 pour le groupe J et en position 683 pour le groupe K.

1.5 Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons montré que les souches de *L. monocytogenes* de sérotypes 4b et 1/2a étaient capables de former des biofilms complexes avec des cellules pouvant être engluées dans une matrice extracellulaire. Au sein de cette matrice, nous avons mis en évidence la présence d'un polysaccharide soluble majeur : l'acide téichoïque, structurellement identique aux acides téichoïques de la paroi cellulaire du sérotype correspondant. Ces acides téichoïques étaient également présents dans le milieu de culture des biofilms. Les résultats obtenus avec la souche DSS1130 BFA2 qui a une mutation ponctuelle, ont permis de mettre en évidence qu'une mutation du gène *lmo2550* affecte non seulement la structure de l'acide téichoïque pariétal, mais aussi de l'acide téichoïque excrété dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture des biofilms. Ces résultats suggèrent donc que les acides téichoïques pariétaux et ceux présents dans le milieu extracellulaire sont issus d'une même voie de biosynthèse.

Il est à noter que cette mutation n'a pas entraîné de changement dans le niveau de la population de cellules viables des biofilms de la souche DSS 1130 BFA2, cependant, il est délicat de tirer une conclusion sur l'effet des acides téichoïques ou de leurs modifications sur la structuration des biofilms de *L. monocytogenes*. Nous avons également démontré que la mutation du gène *lmo2550* était très fréquente dans les souches isolées de l'industrie des produits de la pêche (alimentaire et environnementale). Il est donc intéressant d'étudier ces souches dans le but d'évaluer la fonction de la ramification GlcNAc dans la capacité de *L. monocytogenes* à former des biofilms et à produire de la matrice extracellulaire. D'autres analyses peuvent également être faites en étudiant l'impact de cette mutation sur des souches de *L. monocytogenes* hautement productrices de biofilm. Les différentes étapes de la formation du biofilm (adhérence, ...) pourraient être étudiées ainsi que leur détachement.

Chapitre 2. Etude du rôle de la ramification N-acétylglucosamine de l'acide téichoïque dans la formation et le détachement des biofilms de *Listeria monocytogenes* de sérotype 1/2a

2.1 Contexte et objectif

Dans nos travaux précédents, nous avons mis en évidence que les exopolysaccharides majeurs présents dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* de sérotypes 1/2a et 4b, étaient des acides téichoïques de structure identique aux acides téichoïques pariétaux décrits par Uchikawa, et al. (1986). L'étude de la souche DSS 1130 BFA2 nous a également permis d'identifier qu'une mutation du gène *lmo2550*, codant une glycosyl transférase, bloquait la mise en place du résidu GlcNAc sur les acides téichoïques pariétaux mais également sur les acides téichoïques présents dans la matrice extracellulaire. Après le séquençage d'un panel de 96 souches de *L. monocytogenes* provenant majoritairement de la filière des produits de la pêche, il s'est avéré que le gène *lmo2550* possédait une forte fréquence de mutation (51%) alors que les séquences du gène *lmo2449* étaient identiques à 100% à celle de la souche de référence 1/2a. Quelques études ont été réalisées sur des mutants obtenus par mutation dirigée sur ces 2 gènes (EGD-e $\Delta lmo2550$, EGD-e $\Delta lmo2549$) pour comprendre le rôle des acides téichoïques pariétaux dans la reconnaissance phagique et cellulaire, la sensibilité aux peptides antimicrobiens mais aucune étude n'a porté sur leur rôle dans la formation et le détachement des biofilms de *L. monocytogenes* (Eugster, et al., 2011).

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'impact de l'absence de résidu GlcNAc sur les acides téichoïques de souches de sérotype 1/2a, sur l'adhésion, la formation et le détachement des biofilms de *L. monocytogenes*.

Pour cela, nous nous sommes procuré auprès d'une équipe de recherche les deux variants géniques de la souche de référence EGD-e (sérotype 1/2a) obtenus par mutagenèse dirigée du gène *lmo2550* (mutant EGD-e $\Delta lmo2550$) et du gène *lmo2549* (mutant EGD-e $\Delta lmo2549$) (Eugster, et al., 2011). En parallèle de ces deux mutants, nous avons étudié la souche sauvage de référence EGD-e et la souche DSS 1130 BFA2 qui avait une mutation ponctuelle sur le gène *lmo2550*. Nous avons également validé quelques résultats avec les mutants complémentés ($\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$ qui doivent reprendre un phénotype comme la souche sauvage EGD-e.

Nous avons également décidé de travailler sur une surface en acier inoxydable, qui est un matériau très utilisé dans les entreprises agro-alimentaires, au lieu d'une surface en polystyrène, matériau utilisé dans la première partie de nos travaux (chapitre 1). Nous avons également changé la température d'incubation des biofilms car les mutants devaient être incubés à 30°C comme indiqué dans les travaux de Eugster, et al. (2011) au lieu de 37°C.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que les mutants synthétisaient bien des acides téichoïques dépourvus de résidus GlcNAc dans nos conditions expérimentales.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les propriétés de surface des mutants de *L. monocytogenes* versus la souche sauvage EGD-e par mesure du caractère hydrophobe/hydrophile et du potentiel électrostatique. Des observations de la morphologie bactérienne ont

été réalisées par microscopie électronique à balayage. Nous avons également confirmé que les mutants étaient viables dans le milieu de culture MCDB 202 par un suivi de croissance en culture planctonique.

Dans un troisième temps, pour valider que les nouvelles conditions expérimentales (nature du matériau, température d'incubation) n'impactaient pas la nature et la synthèse des polysaccharides, nous avons confirmé que les acides téichoïques étaient toujours les exopolysaccharides majeurs présents dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*. Ensuite, nous avons observé par microscopie optique et dénombré les populations bactériennes viables cultivables de l'étape d'adhésion bactérienne à une surface ($t = 3$ h) jusqu'à la formation d'un biofilm mature ($t = 48$ h). Ensuite, nous avons étudié plus en détails l'architecture (microscopie optique et microscopie électronique à balayage) et l'état de viabilité des populations bactériennes (dénombrement sur milieux gélosés, PMA-qPCR, qPCR) des biofilms de 48 h des mutants versus la souche sauvage EGD-e. Ces résultats ont été complétés par une quantification des substances exopolymériques (EPS) de la matrice extracellulaire des biofilms de 48 h pour avoir une caractérisation « globale » du biofilm mature.

Dans une dernière partie, nous avons évalué la population résiduelle (observation et viabilité cellulaire) des mutants versus celle de la souche sauvage EGD-e sur l'acier inoxydable après le passage d'un flux laminaire d'eau (action mécanique) à un débit de 40 Pa (contrainte courante employée en entreprise agro-alimentaire). Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus avec le couple action mécanique/ action chimique qui correspondait à l'application d'un flux d'une solution de soude à 0,05%, qui est un détergent couramment

Tableau 8 : Souches de *L. monocytogenes* étudiées.

Souches	Abréviation	Caractéristique	Références
EGD-e	EGD-e	Souche sauvage, sérotype 1/2a	(Glaser, et al., 2001)
EGDeΔlmo2549	Δ lmo2549	EGD-e portant une délétion chromosomique de <i>lmo2549</i>	(Eugster, et al., 2011)
EGDeΔlmo2549::pLIV2(<i>lmo2549</i>)	Pas d'abréviation	EGD-e portant une délétion chromosomique de <i>lmo2549</i> et complétée par le plasmide pLIV2 (<i>lmo2549</i>), exprimant <i>lmo2549</i> constitutivement; Cm ^r	(Eugster, et al., 2011)
EGDeΔlmo2550	Δ lmo2550	EGD-e portant une délétion chromosomique de <i>lmo2550</i>	(Eugster, et al., 2011)
EGDeΔlmo2550::pLIV2(<i>lmo2550</i>)	Pas d'abréviation	EGD-e portant une délétion chromosomique de <i>lmo2550</i> et complétée par le plasmide pLIV2 (<i>lmo2550</i>), exprimant <i>lmo2550</i> constitutivement; Cm ^r	(Eugster, et al., 2011)
DSS 1130 BFA2	Pas d'abréviation	Souche environnementale porteuse d'une mutation ponctuelle de <i>lmo2550</i>	(Midelet-Bourdin, et al., 2006)

employé en entreprise agro-alimentaire pour voir si l'absence ou la présence du résidu GlcNAc influait sur la persistance des cellules sur les matériaux.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches étudiées ont été conservées dans du bouillon cœur-cerveille supplémenté en glycérol (18% v/v) à -20°C (Tableau 8). Les cultures bactériennes ont été maintenues jusqu'à un mois à 4°C sur gélose TSAYe en pente. Les précultures ont été réalisées à partir de ces cultures réfrigérées qui ont été transférées dans 30 ml de bouillon TSBYe, incubées à 30 ° C pendant 24 h sous agitation rotative (200 tr/min). Cette suspension bactérienne a été diluée au 1/10^{ème} dans du bouillon TSBYe puis incubée à 30°C pendant 24 h. Les cultures ont ensuite été centrifugées (5000g, 10 min) et lavées avec 20 ml de milieu MCDB 202 (USBiological CryoBioSystem, Salem, États-Unis, Annexe 4) (Hébraud et Guzzo, 2000). Ensuite elles ont été centrifugées (5000g, 10 min) puis remises en suspension dans du milieu MCDB 202. Du chloramphénicol (Cm) à 10µg/ml a systématiquement été ajouté dans les bouillons et les milieux gélés utilisés pour étudier les mutants complémentés $\Delta lmo2549 :: pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550 :: pPL2(lmo2550)$.

2.2.2 Etude phénotypique des bactéries en culture planctonique

2.2.2.1 Etude de la composition des acides téichoïques pariétaux

L'analyse monosaccharidique des acides téichoïques pariétaux a été réalisée comme décrit dans le paragraphe 1.2.4.1

2.2.2.2 Mesure du caractère hydrophobe/ hydrophile des surfaces bactériennes

Le caractère hydrophobe/ hydrophile de la surface des cellules bactériennes a été déterminé par la technique de cinétique d'affinité pour un solvant, l'héxadécane (MATS :

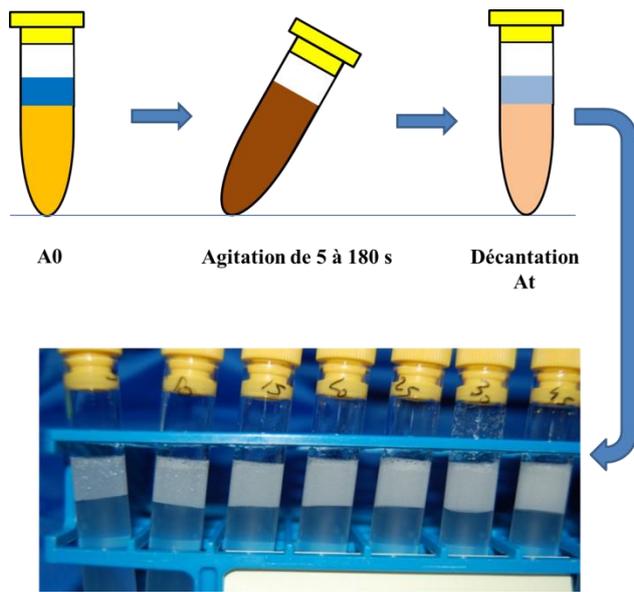


Figure 28: Représentation schématique du test MATS

Microbial Adhesion To Solvents) selon le mode opératoire développé par Faille, et al. (2010). Après 3 h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202, 3 mL de suspension bactérienne ajustée à une DO_{600nm} de 0,6 (A0) avec de l'eau physiologique ont été vortexés avec 500 μ l d'hexadécane à des durées allant de 5 à 180 secondes afin d'obtenir une émulsion (Figure 28). Après 30 minutes de décantation, la densité optique de la phase aqueuse (At) a été mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'affinité au solvant a été calculé comme suit : % d'affinité = $100 * [1 - (At/A0)]$ et la courbe a été tracée en fonction du temps d'agitation. La pente initiale (R0) a été calculée à partir de $(At/A0) * 100$ tracée en fonction du temps d'agitation. Une culture était considérée comme hydrophobe lorsque le -R0 était inférieur à -4,0 et hydrophile pour des valeurs supérieures (Faille, et al., 2010).

2.2.2.3 Mesure du potentiel électrostatique des surfaces bactériennes

Après 3 h d'incubation à 30°C, les cultures bactériennes dans le milieu MCDB 202 ont été centrifugées 10 minutes à 5000g et les culots ont été lavés avec 40 ml d'eau physiologique stérilisée. L'opération a été répétée une seconde fois puis les culots ont été remis en suspension dans 30 ml d'eau physiologique stérilisée. Des géloses TSAYe ont été ensemencées à partir de ces tubes afin de vérifier la pureté. Deux cent microlitres des suspensions bactériennes dans l'eau physiologique ont été placés dans 49 ml de solution tampon à pH 7. Les cultures ont ensuite subi deux séries de sonication entrecoupées d'un temps de repos de 30 secondes, et cela afin de rompre les agrégats cellulaires. Enfin, la mobilité électrophorétique et le potentiel zéta des cultures bactériennes ont été mesurés par un zétamètre (CAD Instrumentation, France) à l'INRA de Villeneuve d'Ascq (France).

2.2.2.4 Etude de la morphologie des cellules bactériennes par microscopie électronique en transmission.

A partir des cultures bactériennes dans le milieu MCDB 202, cinq millilitres de suspension ont été centrifugés et lavés deux fois avec 5 ml d'eau distillée stérilisée. Les

concentrations de l'inoculum ont été ajustées à 10^8 UFC/ ml dans de l'eau distillée stérilisée. Les cellules bactériennes ont été fixées sur des grilles Formvar revêtus (15/95, Euromedex, EMS, Hatfield, États-Unis) et observées après coloration négative avec 1% d'acétate d'uranyle (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) par un microscope électronique Hitachi H600 à une tension de 75 kV accéléré (INSERM, USTL 1, Lille, France).

2.2.2.5 Cinétique de la croissance bactérienne en culture planctonique

Les concentrations des cultures bactériennes dans le milieu MCDB 202 ont été ajustées à 10^7 UFC/ ml dans 30 ml de milieu MCDB 202 frais supplémenté ou non de Cm à 10 µg/ ml.

Cent µl de ces cultures à 10^7 UFC/ ml ont été placés dans une microplaque 96 puits et incubés à 30°C pendant 48 h. Un suivi de croissance a été réalisé à l'aide d'un lecteur de microplaques (BIOTEK Instruments Inc., Winooski, USA) avec une lecture à DO_{620nm} , toutes les 15 min après 5 secondes d'agitation rotative.

En parallèle, les 30 ml de suspension bactérienne ont été incubés pendant 48 h à 30°C sous agitation. Le nombre de bactéries a été déterminé sur milieux gélosés TASYe supplémentés ou non en Cm (10 µg/ ml) à $t = 0$, $t = 6$ h, $t = 24$ h, $t = 30$ h et $t = 48$ h à l'aide d'un ensemenceur spirale (Spiral DS System; Interscience, Saint Nom La Bretèche, France) et après incubation à 30°C pendant 24 h.

2.2.3 Etude de l'adhésion à la formation du biofilm de Listeria monocytogenes sur acier inoxydable

2.2.3.1 Préparation des lames d'acier inoxydable

Deux diamètres de lames d'acier inoxydable AISI 316 L 2B (Goodfellow, Lille, France) ont été utilisés : des lames de 16 x 37 mm et des lames de 90 x 90 mm.

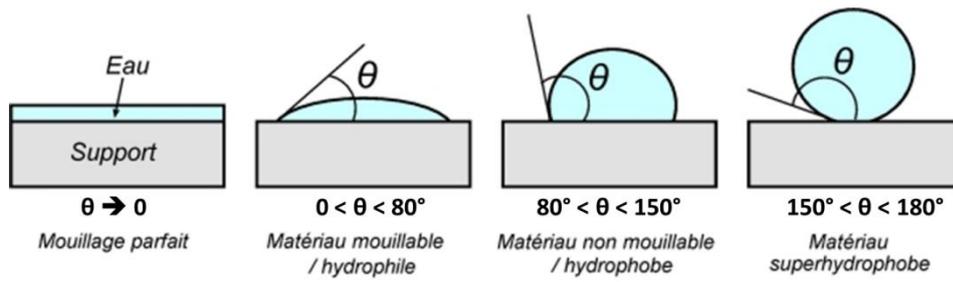


Figure 29: Angle de contact d'un liquide avec un support utilisé comme index de mouillabilité. Pour un $\theta < 80^\circ$, le liquide mouille la paroi qui est donc à tendance plutôt hydrophile. Pour un $\theta > 80^\circ$, le liquide ne mouille pas la surface qui est donc à tendance hydrophobe.

Les films protecteurs recouvrant les petites lames 16x37 mm ont été retirés. Ces dernières ont été frottées à l'aide d'un papier absorbant imbibé d'une solution d'acétone à 50 % (v/v) et d'éthanol à 50% (v/v), afin d'éliminer d'éventuels résidus de film protecteur, et placés sur un portoir. Elles ont alors été immergées pendant 10 minutes sous agitation dans 1 L d'une solution de RBS₅₀ à 2% (v/v) préparée dans l'eau du robinet à une température initiale de 50°C. Un premier rinçage a été effectué par immersion du portoir sous agitation dans 1L d'eau du robinet à 50°C pendant 20 minutes. Enfin, 5 rinçages successifs d'une minute chacun ont été faits dans de l'eau ultra-pure à température ambiante. Les lames présentes dans le portoir ont ensuite été emballées dans du papier aluminium. La veille de leur utilisation, les lames ont été stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

Pour les lames de 90 x 90 mm, le protocole était identique avec l'ajout d'une étape de sonication d'1 h à 30°C entre les rinçages à l'eau à 50°C et les 5 rinçages successifs à l'eau ultra-pure.

2.2.3.2 Mesure du caractère hydrophobe/ hydrophile de l'acier inoxydable

Le caractère hydrophobe/hydrophile des coupons d'acier inoxydable après nettoyage et stérilisation (paragraphe 2.2.3.1) a été déterminé par mesure des angles de contact à l'eau (θ) à température ambiante en utilisant un goniomètre Digidrop GBX (modèle ASE) à l'INRA de Villeneuve d'Ascq. Dix mesures ont été réalisées sur 3 coupons en déposant des gouttes de 5 μ L. L'angle formé entre la surface et la tangente à la goutte au point de contact avec la surface a été mesuré de chaque côté de la goutte (Figure 29).

2.2.3.3 Etude structurale des polysaccharides de la paroi cellulaire, de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms de 48 h de Listeria monocytogenes

L'étude structurale des polysaccharides de la paroi cellulaire, de la matrice extracellulaire et du milieu de culture des biofilms a été réalisée comme décrite dans les

paragraphes 1.2.3 et 1.2.4 avec quelques modifications. Soixante ml de suspension bactérienne ajusté à 10^7 UFC/ml dans du milieu MCDB 202 ont été placés dans des boîtes de Pétri de 140 mm de diamètre (Grosseron) contenant une lame d'acier inoxydable AISI 316 de 90 x 90 mm stérilisée. Après 48 h d'incubation à 30°C, le milieu de culture a été récupéré et mis dans un flacon stérile. Le biofilm a été lavé successivement trois fois avec 5 ml d'eau distillée stérilisée. L'eau utilisée pour les lavages a été ajoutée dans le flacon contenant le milieu de culture. Après centrifugation (6000 g, 10 min), le surnageant a été utilisé pour la préparation des polysaccharides du milieu de culture, et le culot cellulaire pour la préparation des polysaccharides pariétaux. Les biofilms ont été décrochés par grattage à l'aide de l'index qui était protégé d'un gant stérile, avec 4 ml d'eau distillée stérilisée puis placés dans un tube Falcon (Combrouse, et al., 2013). La matrice extracellulaire du biofilm a été détachée des cellules bactériennes par sonication sur glace (IKA Labortechniksonicator, Staufen, Allemagne) pendant 3 x 30 s, à des cycles de 50%, à une intensité de 0,5 comme décrit par Sadovskaya et al. (2005). Les cellules ont été collectées par centrifugation à température ambiante (10 000 g, 10 min) et additionnées au culot cellulaire obtenu avec le milieu de culture.

2.2.3.4 Protocole de l'adhésion à la formation des biofilms

Les coupons d'acier inoxydable AISI 316 de 37 x 16 mm stérilisés ont été placés dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. Afin d'éviter une déshydratation des biofilms durant l'incubation, chaque boîte de Pétri de 60 mm de diamètre a été placée dans une boîte de Pétri de 140 mm de diamètre contenant un papier absorbant humidifié avec 25 ml d'eau distillée. Onze ml de suspension bactérienne ajustée à 10^7 UFC/ml dans du milieu MCDB 202 supplémenté ou non en Cm (10 µg/ml) ont été déposés sur les coupons d'acier inoxydable puis incubés à 30°C pendant 3 h, 24 h, 30 h ou 48 h. Après incubation, le milieu

de culture a été retiré puis les coupons d'acier inoxydable contaminés ont été rincés avec 25 ml d'eau distillée stérilisée.

2.2.3.5 Observations microscopiques de l'adhésion bactérienne à la formation des biofilms bactériens

Les coupons contaminés ont été observés par microscopie en épifluorescence après 3 h, 24 h, 30 h et/ou 48 h d'incubation à 30°C. Au préalable, les bactéries présentes sur les coupons d'acier inoxydable ont été colorées soit avec le colorant diamidino 4',6'-phénylindole – 2 Dichlorohydrate (DAPI) soit avec le colorant orangé d'acridine (OA) suivant les protocoles décrits dans le paragraphe 1.2.2. La viabilité des bactéries présentes dans les biofilms a également été observée après coloration différentielle avec le colorant Live/Dead® Bac Light™ (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), basée sur l'intégrité de la membrane bactérienne. Selon le fournisseur, le mode d'emploi de l'OA peut sensiblement changer, concernant celui utilisé dans notre étude (Acridine orange hemi(zinc chlora salt, Sigma, Saint Louis, USA), il est indiqué que le complexe OA/ADN doit être excité à 480 nm pour une émission à 510 nm alors que le complexe OA/ARN doit être excité à une longueur d'onde de 440 à 470 nm pour une émission également à 510 nm. Le filtre que nous avons utilisé est un jeu de filtre n°09 (Zeiss, Marly-le-Roi, France) avec une bande passante d'excitation de 460 à 490 nm et d'émission à 510 nm. Les colorations à l'OA que nous avons réalisées ont permis d'observer l'ensemble des acides nucléiques des biofilms (ADN+ARN). Les biofilms ont été observés par un microscope en épifluorescence (Imager.Z1, Zeiss, Marly-le-Roi, France) connecté à une caméra CCD (Axiocam - MRm, Zeiss) avec un système d'acquisition d'image numérique. L'analyse des images des biofilms a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ 1.22d (Casarin, et al., 2014).

Afin d'observer les structures de biofilm par microscopie électronique à balayage (MEB), chaque biofilm a été fixé pendant 20 minutes dans une solution de glutaraldéhyde à 3% (v / v) + 0,02 M de tampon cacodylate. Les biofilms ont ensuite été déshydratés dans une série de bains d'éthanol à 70% (v / v), 80% (v / v), 90% (v / v) et 100% (v / v) pendant 10 min chacun puis traités à l'acétate de 3-méthylbutyle. Les biofilms ont été ensuite soumis à un séchage au point critique, recouverts d'or-palladium pendant 1,5 minute et visualisés par la technique MEB (Jeol, JSM-35 CF, Japon) (INRA, Villeneuve d'Ascq).

2.2.3.6 Quantification des populations viables cultivables, viables et totales à l'étape d'adhésion (t = 3 h) et du biofilm de 48 h

Chaque coupon contaminé a été écouvillonné en le frottant avec un premier écouvillon sec qui a ensuite été agité dans un tube Eppendorf de 5 ml contenant 2 ml d'eau distillée stérilisée. La surface contaminée a une nouvelle fois été frottée avec ce même écouvillon qui a été cassé dans le microtube une fois l'opération terminée. Cette manipulation a été réalisée une seconde fois avec un nouvel écouvillon. Le tube Eppendorf a été ensuite agité au vortex pendant 20 secondes. La suspension bactérienne a ensuite été divisée en 3 échantillons de 500 µl chacun :

- Echantillon 1 : pour le dénombrement des cellules viables cultivables sur milieux gélosés,
- Echantillon 2 : pour le dénombrement des cellules viables (viables cultivables et viable non cultivable) par traitement des cellules bactériennes au monoazide de propidium (PMA) suivi d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative (PMA-qPCR). Cette PMA-qPCR a été mise au point (spécificité des amorces, concentration en PMA optimale, temps de photoactivation optimal...) pendant un projet antérieur à ces travaux,

- Echantillon 3 : pour le dénombrement de la population totale (Viables cultivables, viables non cultivable et mortes) par qPCR.

2.2.3.6.1 Quantification de la population viable cultivable

La population de bactéries viables cultivables (VC) a été déterminée à partir de l'échantillon 1 à l'aide d'un enseigneur spirale (Spiral DS System; Interscience, Saint Nom La Bretèche, France) sur des géloses TSAYe supplémentées ou non en Cm (10µg/ ml), qui ont été incubées à 30°C pendant 24 h.

2.2.3.6.2 Quantification des populations viables et totales par PMA-qPCR et qPCR

La population de bactéries viables (VC et viables non cultivables (VNC)) a été déterminée par PMA-qPCR et la population totale par qPCR. L'échantillon 2 a été traité au PMA (Biotium, Hayward, USA) à une concentration finale de 50 µM puis il a été incubé 5 min à température ambiante à l'obscurité et photoactivé durant 10 min à une intensité de 80% par l'utilisation d'une lampe PHAST Blue (GenIUL, Barcelone, Espagne). L'échantillon 2 traité au PMA et l'échantillon 3 non traité au PMA ont été centrifugés (5000 g, 10 min) puis l'ADN des culots bactériens a été extrait avec le kit Dneasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Allemagne, Annexe 5).

Pour la quantification relative de l'ADN extrait, le gène de virulence *hlyA* qui code la listériolysine, une protéine intervenant dans la multiplication intracellulaire de *L. monocytogenes* dans le cycle infectieux de cette bactérie dans les cellules hôtes, a été utilisé comme cible génétique. La qPCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 2,5 µl d'ADN génomique, 12,5 µl de SYBR Premix Taq Ex (Perfect Temps réel) (Takara, FosterCity, Californie, USA), 1 µM d'amorce NovF (5'TGC AAG TCC TAA GAC GCC A-3') (Nogva, et al., 2000), 1 µM d'amorce NovR (5'CAC TGC ATC TCC GTG GTA TAC TAA-3') (Nogva, et al., 2000) et 9 µl d'eau distillée stérilisée. La qPCR a été réalisée dans un

Poids d'une unité génome de *L. monocytogenes*

$$= \frac{\text{Taille du génome de } L. monocytogenes \times (\text{Poids moléculaire d'une paire de base})}{\text{Nombre d'Avogadro}}$$

$$= \frac{(2,94 \cdot 10^6 \text{ pb}) \times (660 \text{ g/mol})}{(6,022 \cdot 10^{23})}$$

$$= 3,22 \cdot 10^{-15} = 3,22 \cdot 10^{-9} \mu\text{g} = \text{Poids d'une unité génome de } L. monocytogenes$$

Nombre d'unité génome dans 100 µg/ml d'ADN de *L. monocytogenes*

$$= \frac{(100 \mu\text{g/ml})}{\text{Poids d'une unité génome de } L. monocytogenes}$$

$$= \frac{(100 \mu\text{g/ml})}{3,22 \cdot 10^{-9} \mu\text{g}} = 3,1 \cdot 10^{10} \text{ UG/ml}$$

Figure 30 : Calcul du nombre d'unité génome de *L. monocytogenes* contenu dans 100 µg/ml (1.10⁸ pg/ml) d'ADN génomique de *L. monocytogenes*.

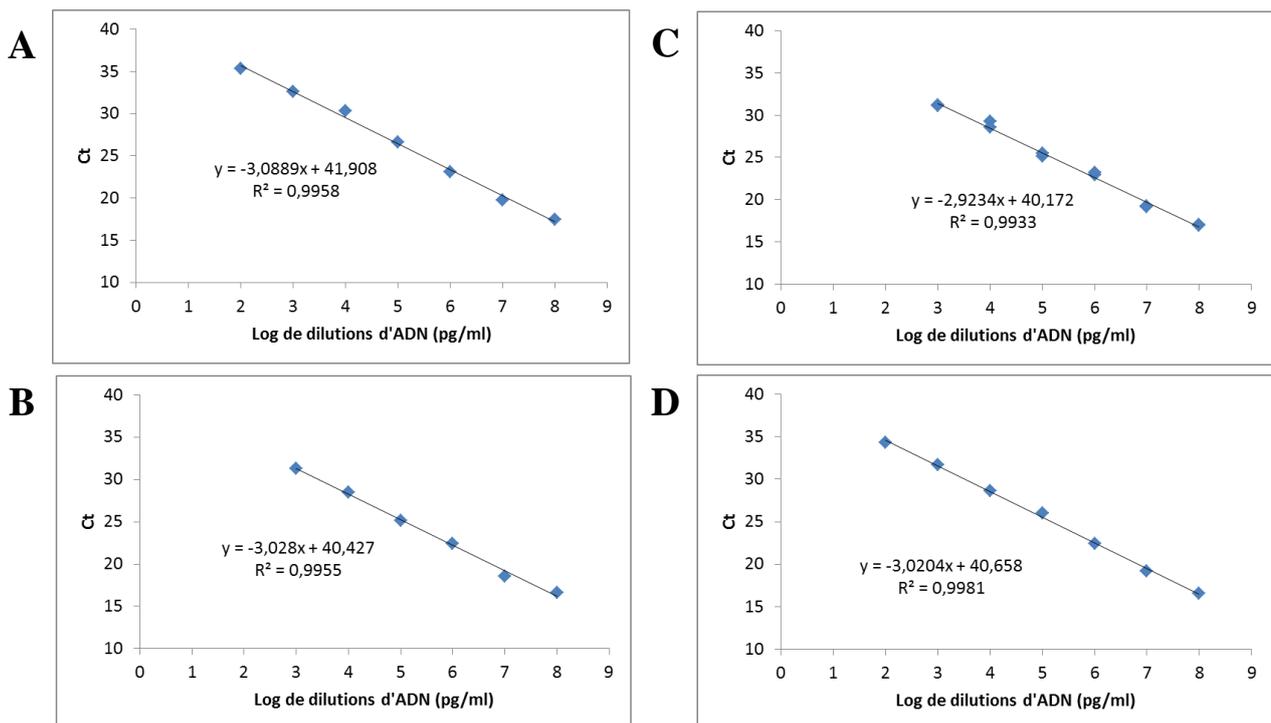


Figure 31 : Courbes standards obtenues avec les amorces NovF/NovR sur des dilutions d'ADN génomique de *L. monocytogenes* allant de 100 µg/ml à 0.0001 µg/ml

appareil Smart-Cycler II (Cepheid, Sunnyvale, Etats-Unis) dans les conditions suivantes: une pré-incubation à 95°C pendant 30 sec, une répétition de 40 cycles avec une phase de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 s et une phase d'hybridation des amorces à 57°C pendant 30 s. Toutes les expériences de qPCR ont été réalisées en présence d'un point de gamme provenant d'une gamme étalon utilisée lors de l'élaboration des courbes standards. Les courbes standards ont été réalisées en utilisant des dilutions successives de l'ADN génomique de la souche EGD-e allant de 100 µg/ ml à 0,0001 µg/ ml soit $3,1 \cdot 10^{10}$ à $3,1 \cdot 10^3$ unités génomes (UG) si l'on se base sur le poids d'une unité génome de *L monocytogenes* de 3,22 fg (Figure 30). Les Ct pour chaque dilution d'ADN ont été utilisés pour tracer une courbe standard. Les courbes standards utilisées durant ces travaux avaient pour équation ($y = -3,0889x + 41,908$; $R^2 = 0,9958$), ($y = -3,028x + 40427$ $R^2 = 0,9955$), ($y = -3,028x + 40,427$ $R^2 = 0,9955$), ($y = -2,9234x + 40,172$ $R^2 = 0,9933$) et ($y = -3,0204x + 40,658$ $R^2 = 0,9981$) (Figures 31 A, B, C et D).

2.2.4 *Quantification des composants de la matrice extracellulaire [Glucides extracellulaires, protéines extracellulaires et acides désoxyribonucléiques extracellulaires (ADNe)] des biofilms de 48 h*

Soixante ml de suspension bactérienne ajustés à 10^7 UFC/ ml dans du milieu MCDB 202 ont été placés dans des boîtes de Pétri de 140 mm de diamètre (Grosseron, Saint Herblain, France) contenant une lame d'acier inoxydable AISI 316 de 90 x 90 mm. Après 48 h d'incubation à 30°C, le milieu de culture a été éliminé et le biofilm a été lavé trois fois avec 5 ml d'eau distillée stérilisée. Les biofilms ont été décrochés par grattage à l'aide de l'index qui était protégé d'un gant stérile, avec 10 ml d'eau distillée stérilisée puis placés dans un tube Falcon (Combrouse, et al., 2013). La matrice extracellulaire du biofilm a été détachée des cellules bactériennes par sonication sur glace (IKA Labortechniksonicator, Staufen,

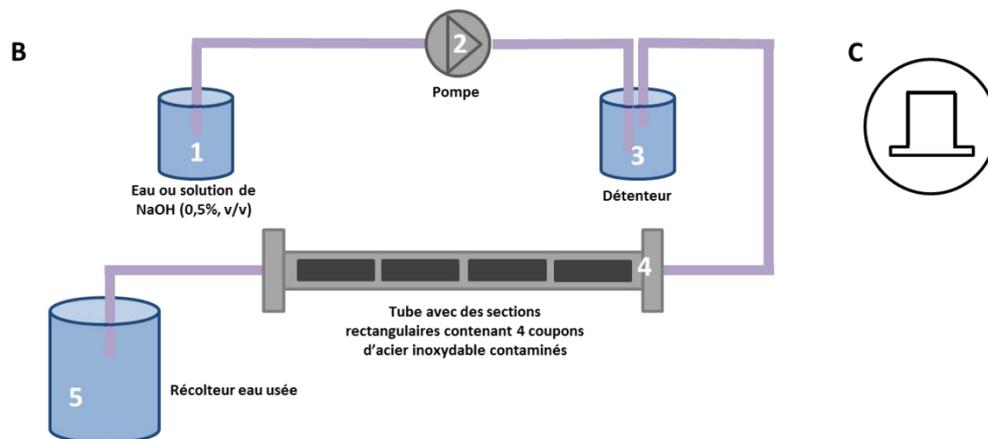
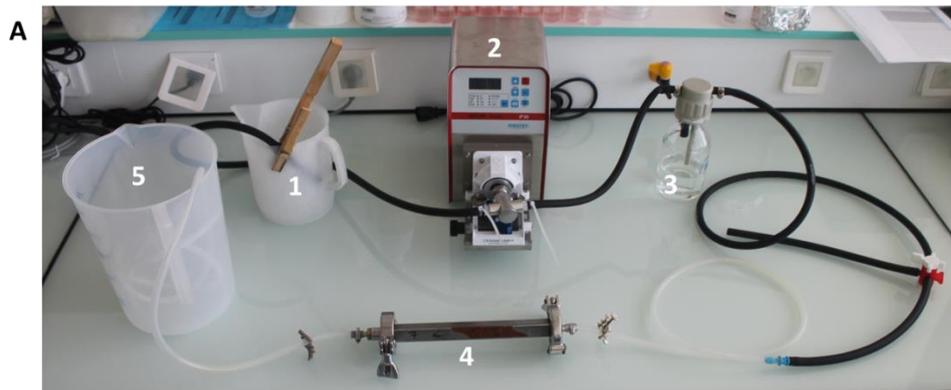


Figure 32 : Principe de la boucle d'essai expérimentale induisant les forces de décrochage sur les coupons d'acier inoxydable contaminés. A) Photographie de la boucle expérimentale, B) Schéma explicatif de la boucle expérimentale, C) Schéma transversal du tuyau accueillant les coupons d'acier inoxydable contaminés.

Allemagne) pendant 3 x 30 s, à des cycles de 50%, à une intensité de 0,5 comme décrit par Sadovskaya et al. (2005). Les tubes ont été centrifugés à température ambiante (10 000 g, 10 min) et le culot cellulaire a été éliminé. Le surnageant, qui contenait la matrice extracellulaire du biofilm, a été conservé pour l'analyse quantitative. La concentration en glucide a été déterminée par dosage à l'acide phénol-sulfurique (Dubois et al., 1956) et exprimé en équivalent glucose. La teneur en protéine a été mesurée en utilisant le kit de dosage protéique Bio-Rad, avec de l'albumine de sérum bovin (Sigma, Lyon, France) comme standard. La concentration en ADN a été mesurée à une $DO_{260\text{ nm}}$ avec le spectrophotomètre DS-11 Denovix (Wilmington, NC, USA) après avoir réalisé l'extraction d'ADN avec le kit Dneasy® Blood & Tissue (Annexe 5). Ces expériences ont été réalisées en triplicat, et les mesures des concentrations en sucre et en protéine totale ont été réalisées en triplicat pour chaque expérience.

2.2.5 Résistance des biofilms à un décrochage mécanique couplé ou non à un traitement chimique

Les coupons d'acier inoxydable contaminés ont été rincés avec 25 ml d'eau distillée stérilisée puis insérés dans des tubes à section rectangulaire (Figure 32 C). Ces tubes à section rectangulaire ont été reliés à une pompe (Figures 32 A, B) et un flux d'eau a été diffusé pendant 10 min à une vitesse d'écoulement laminaire de 40 Pa soit de $8,15 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$ durant 10 minutes à température ambiante. L'expérience a été effectuée deux fois et chacun des essais a été effectué en triplicat pour chaque expérience. Des expériences ont également été réalisées avec un flux laminaire de soude (NaOH) à 0,5% (v / v) à température ambiante qui a été passé pendant 10 min à un débit d'écoulement laminaire de 40 Pa. La population bactérienne résiduelle sur les coupons a été décrochée par écouvillonnage puis elle a été quantifiée par

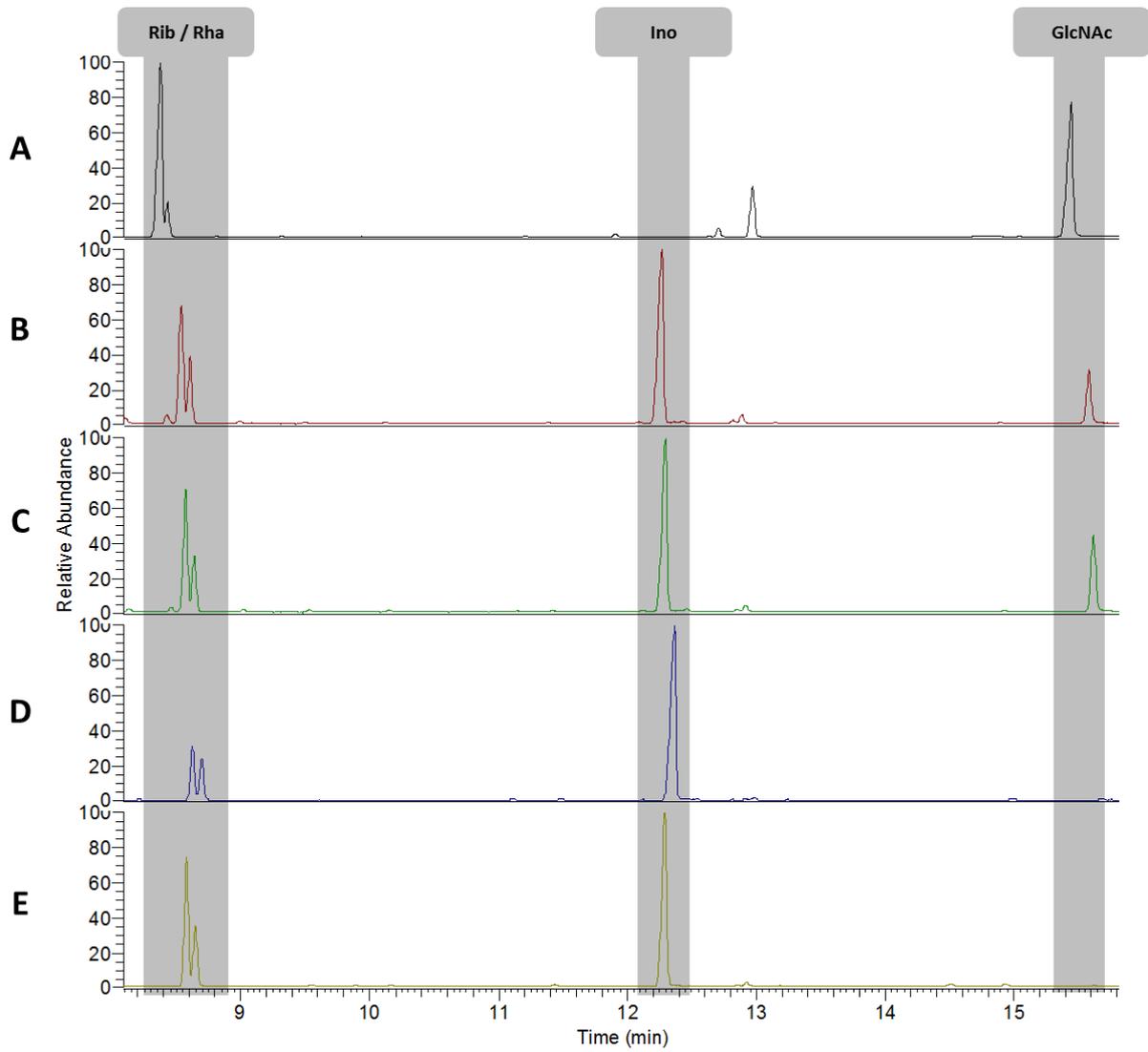


Figure 33 : Comparaison des profils GC-MS des acides téichoïques pariétaux provenant de la souche sauvage EGD-e (A), du mutant complétement EGDeΔlmo2549::pLIV2(lmo2549) (B), du mutant complétement EGDeΔlmo2550::pLIV2(lmo2550) (C), du mutant Δlmo2549 (D) et du mutant Δlmo2550 (E). Rib: Ribitol, Rha: Rhamnose, Ino: Inositol, GlcNAc: N-Acétyleglucosamine.

différentes techniques : dénombrement sur milieux gélosés, par qPCR et par PMA-qPCR comme décrites dans le paragraphe 2.2.3.6.

2.2.6 Analyses statistiques

Toutes les expériences sur les biofilms ont été réalisées en triplicat. Des analyses de variance ont été effectuées pour déterminer les différences significatives de population entre les souches bactériennes. Tous les calculs ont été traités avec le logiciel Statgraphics centurion XVI (Sigma plus, Paris, France). La signification statistique a été évaluée à $P < 0,05$ avec P la probabilité limite sous l'hypothèse nulle.

2.3 Résultats

2.3.1 Confirmation du phénotype mutant

Afin de valider que les conditions expérimentales ne modifiaient pas le phénotype des mutants, nous avons extrait et analysé les exopolysaccharides par une technique de GC-MS des mutants $\Delta lmo2549$, $\Delta lmo2550$ et DSS 1130 BFA2 après les avoir cultivés dans le milieu MCDB 202 pendant 48 h. Les profils obtenus par la technique GC-MS nous ont permis d'identifier la présence de résidus Rib et Rha et l'absence de résidu GlcNAc. Cette comparaison des profils GC-MS a également été réalisée avec les mutants complétés ($\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$) et la souche sauvage EGD-e ce qui a permis de mettre en évidence la présence des monosaccharides Rib, GlcNAc et Rha (Figure 33).

Ces travaux ont permis de confirmer que dans ces nouvelles conditions expérimentales, la souche DSS 1130 BFA2, les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ exprimaient un acide téichoïque sans ramification GlcNAc et la complémentation de ces 2 mutants a

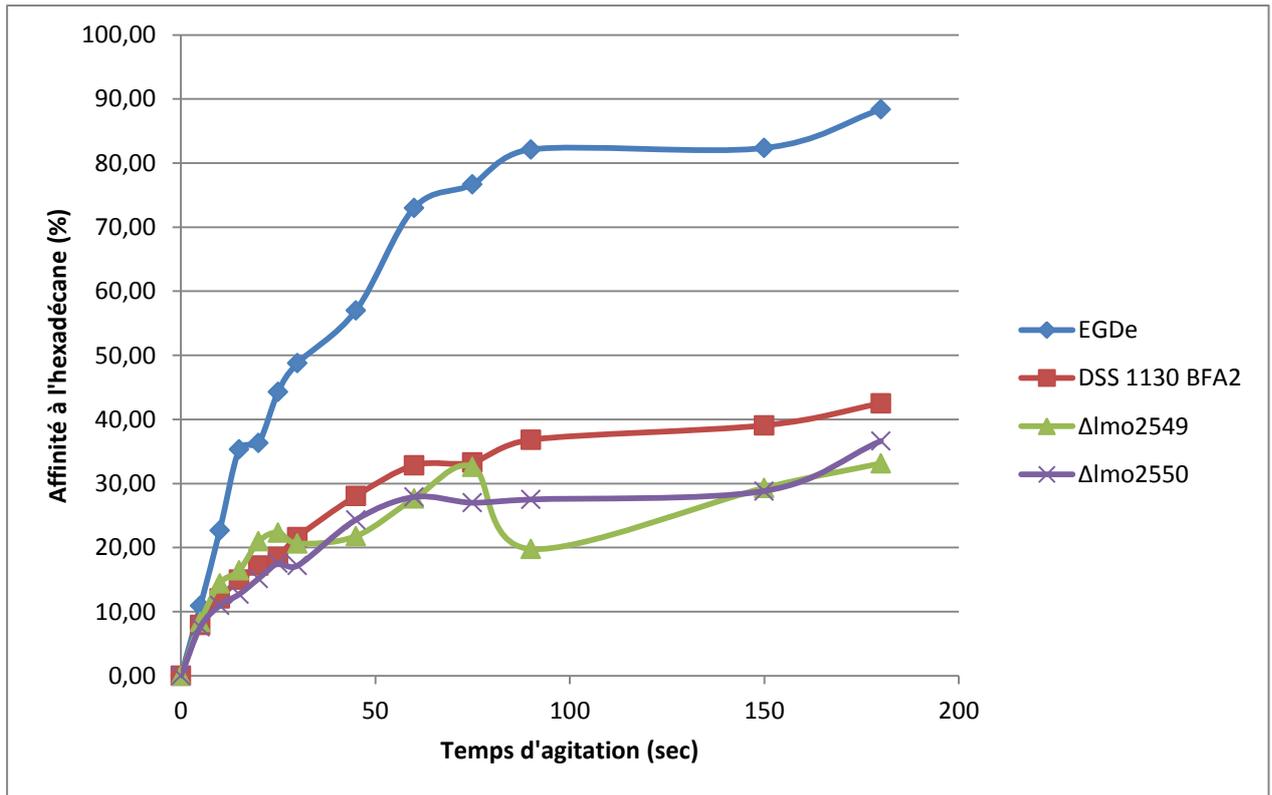


Figure 34 : Affinité à l'hexadécane des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202 (n = 3).

entraîné la synthèse d'un acide téichoïque de composition identique à celui de la souche sauvage EGD-e.

2.3.2 *Caractérisation phénotypique des bactéries*

Dans cette partie, nous avons caractérisé les propriétés de surface des mutants de *L. monocytogenes* versus la souche sauvage EGD-e par mesure du caractère hydrophobe/hydrophile et du potentiel électrostatique. Des observations de la morphologie bactérienne ont été réalisées par microscopie électronique à balayage.

2.3.2.1 *Mesure du caractère hydrophobe/ hydrophile des surfaces cellulaires*

Le caractère hydrophobe/ hydrophile des cultures bactériennes a été mesurée sur des cultures planctoniques des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e qui ont été réalisées dans le milieu MCDB 202 à 30°C pendant 48 h (Figure 34). Pour la souche sauvage EGD-e, l'affinité des cellules bactériennes pour l'hexadécane à $t = 0$ était de 0% pour passer à 88,4 % après 180 secondes d'agitation. L'affinité à l'hexadécane des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ augmentait de façon similaire en fonction du temps d'agitation avec un passage de 0% à $t = 0$ à respectivement 42,5 %, 33,1% et 36,7% d'affinité au solvant après 180 secondes d'agitation.

La forte affinité à l'hexadécane de la souche EGD-e traduisait un caractère faiblement hydrophile ce qui était cohérent avec la valeur $-R_0$ qui était de -1,3 secondes. Par contre, les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ avaient un caractère hydrophile plus marqué par rapport à la souche sauvage EGD-e avec une faible affinité à l'hexadécane et une valeur de $-R_0$ respectivement de 0,6 ; 0,5 et 0,5 secondes. Pour les mutants complémentés, $\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$, les cellules avaient une affinité à l'hexadécane très faible (environ 10%) (Annexe 6).

Tableau 9 : Mobilité électrophorétique et potentiel zéta à pH 7 des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202 (n = 3).

Souches	Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m/s/V/cm}$)	Ecart type	Potentiel zéta (mV)	Ecart type
EGD-e	-2,86	0,08	-38,99	0,96
DSS1130 BFA2	-2,88	0,08	-38,83	1,08
$\Delta lmo2549$	-2,79	0,06	-38,15	0,81
$\Delta lmo2550$	-2,89	0,12	-37,13	0,16

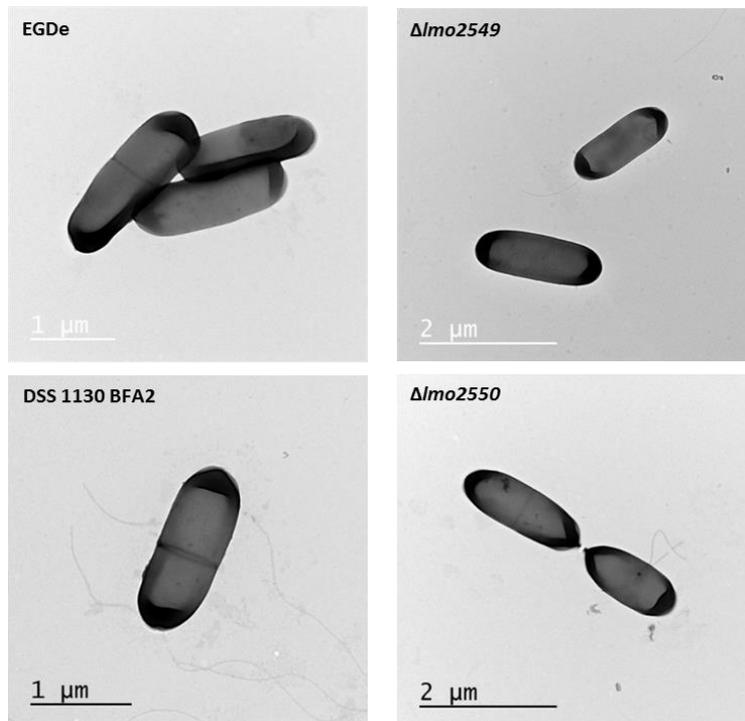


Figure 35 : Observations par microscopie électronique à transmission des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202.

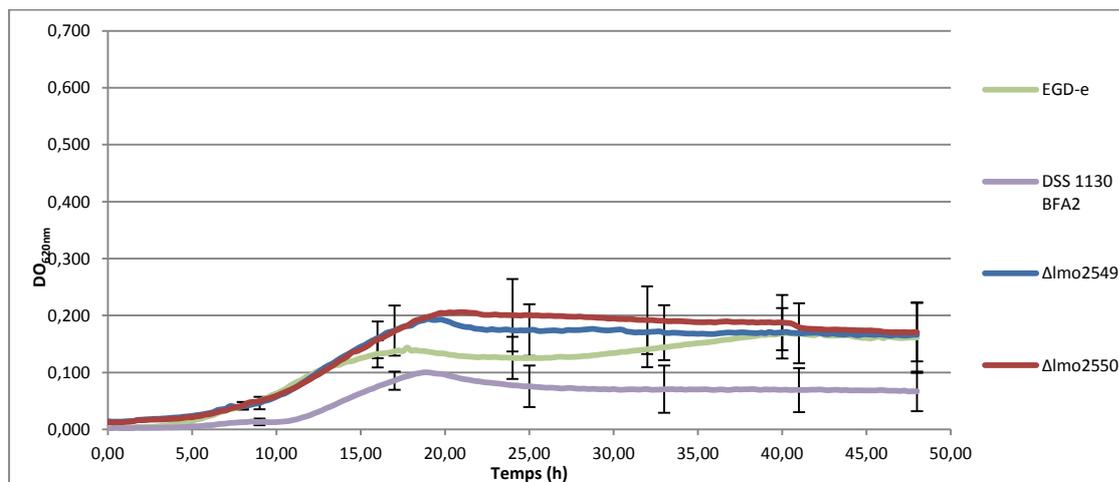


Figure 36 : Suivi de croissance par lecture d'absorbance (DO_{620nm}) des mutants $\Delta lmo2549$, $\Delta lmo2550$, DSS1130 BFA2 et de la souche sauvage EGD-e en culture planctonique dans du milieu MCDB 202 à 30°C durant 48h. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance (n=3).

2.3.2.2 *Mesure du potentiel électrostatique*

La charge électrique des cellules bactériennes a été caractérisée par le potentiel zéta. La mobilité électrophorétique de la souche sauvage EGD-e ainsi que des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ indiquait un caractère négatif pour toutes les souches dans une solution tampon à pH=7 avec une valeur légèrement inférieure (-37,13 mV) pour le mutant $\Delta lmo2550$ (Tableau 9).

2.3.2.3 *Morphologie des cellules bactériennes*

La morphologie des cellules des mutants a été comparée à celle de la souche sauvage EGD-e par microscopie électronique en transmission après une coloration négative (Figure 35). Les cellules de la souche sauvage EGD-e étaient en forme de bacilles de 2 μm de long et 0,67 μm de large, avec une paroi « rigide ». Les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ avaient une morphologie similaire (taille des cellules, forme, rigidité de la paroi) à celle de la souche sauvage EGD-e avec la présence de cellules en état de division cellulaire. Pour l'ensemble des souches, de nombreux flagelles péritriches ont été observés.

2.3.2.4 *Suivi de croissance bactérienne en culture planctonique*

Un suivi de croissance des cultures planctoniques ajustées à 10^7 UFC/ ml a été réalisé par densité optique à $\text{DO}_{620\text{nm}}$ dans le milieu MCDB 202 à 30°C pendant 48 h (Figure 36). Une phase exponentielle de croissance a été observé pour la souche sauvage EGD-e entre $t = 5\text{h}$ et $t = 18\text{h}$ ($\text{DO}_{620\text{nm}} = 0,12$). Cette phase exponentielle était suivie d'une phase stationnaire de $t = 18\text{h}$ jusqu'à $t = 48\text{h}$. Le mutant DSS 1130 BFA2 avait commencé à croître plus tardivement (à partir de $t = 10\text{h}$) avec une phase exponentielle qui se terminait à $t = 18\text{h}$ ($\text{DO}_{620\text{nm}} = 0,10$). Les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ont commencé leur phase exponentielle au même moment que la souche sauvage EGD-e à $t = 5\text{h}$ et étaient rentrés en phase stationnaire à $t = 20\text{h}$. A $t = 48\text{h}$, la $\text{DO}_{620\text{nm}}$ (= 0,18) était identique pour les mutants

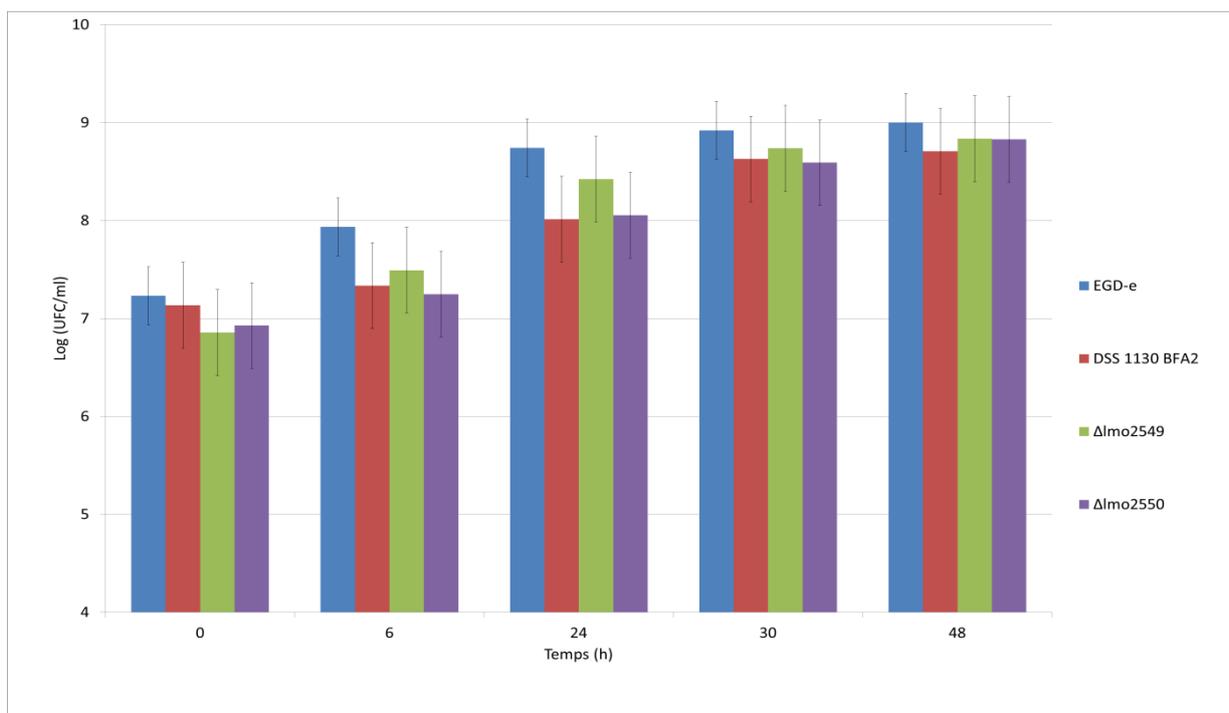


Figure 37 : Suivi de croissance sur 48h par dénombrement sur milieux gélosés TSAYe des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e en culture planctonique dans du milieu MCDB 202 à 30°C. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance (EGD-e : n=12, DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$: n= 5).

Δlmo2549 et *Δlmo2550* et la souche sauvage EGD-e alors que pour le mutant DSS 1130 BFA2, la DO_{620nm} était plus faible (0,08).

En parallèle des suivis de croissance par densité optique, des dénombrements sur milieux gélosés ont été réalisés (Figure 37). Le premier résultat important était que l'ensemble des bactéries sont restées viables cultivables durant les 48 h d'incubation à 30°C dans le milieu de culture pauvre MCDB 202. Dans un second temps, la population bactérienne de la souche sauvage EGD-e a augmenté de 1,77 log UFC/ ml entre $t = 0$ et $t = 24$ h, et ensuite la population était restée constante jusqu'à $t = 48$ h. Une augmentation significative des populations pour les mutants DSS 1130 BFA2, *Δlmo2549* et *Δlmo2550* a également été observée entre $t = 0$ et $t = 24$ h allant de 1,57 à 1,90 log UFC/ ml ($P < 0,05$). Après 30 h d'incubation dans le milieu MCDB 202, les populations bactériennes étaient d'environ 8,5 log UFC/ ml.

La croissance des mutants complémentés *Δlmo2549::pPL2(lmo2549)* et *Δlmo2550::pPL2(lmo2550)* était similaire à celle de la souche sauvage EGD-e ($P > 0,05$) (Annexe 7).

2.3.3 Etude de l'adhésion bactérienne à la formation du biofilm

Nous avons étudié l'impact de l'absence de la ramification GlcNAc sur l'acide téichoïque, de la phase d'adhésion à la formation d'un biofilm de 48h. Pour cela, nous avons observé la biomasse (population bactérienne + matrice extracellulaire) par microscopie optique en épifluorescence avec la coloration d'orangé d'acridine (OA) puis nous avons quantifié et observé la viabilité des populations bactériennes.

2.3.3.1 *Validation des nouvelles conditions de réalisation des biofilms de 48 h*

Dans une étude préliminaire, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'impact de la nature du matériau (passage d'une surface polystyrène (0) à une surface en acier inoxydable) et d'un changement de la température d'incubation (passage de 37°C à 30°C) sur la nature des exopolysaccharides présents dans la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*. Des biofilms de la souche de référence EGD-e ont été cultivés dans le milieu MCDB 202 sur acier inoxydable pendant 48 h à 30°C, puis les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire et du milieu de culture ont été isolés et caractérisés par la technique RMN. Les structures des exopolysaccharides ont été comparées à celles présentes dans la matrice extracellulaire des biofilms formés par cette même souche sur une surface polystyrène après incubation à 37°C pendant 48 h (Paragraphe 1.3.2.2) (Figure 38).

La comparaison des spectres RMN a permis de mettre en évidence la présence d'un polysaccharide de structure similaire dans la paroi, la matrice extracellulaire et le milieu de culture des biofilms de la souche sauvage EGD-e sur acier inoxydable à 30°C. Des résidus GlcNAc et Rha dont les protons anomères résonnent respectivement à δ 5,08 et δ 4,97 ppm ont été identifiés. La structure de ce polysaccharide était identique à l'acide téichoïque identifié dans la matrice extracellulaire des biofilms de 48 h de cette même souche sur polystyrène à 37°C. Nous avons donc validé les nouvelles conditions de réalisation des biofilms pour la suite des travaux.

2.3.3.2 *Observation par microscopie en épifluorescence des coupons contaminés*

Nous avons observé la biomasse (cellules bactériennes + matrice extracellulaire) adhérente à l'acier inoxydable, de $t = 3$ h à $t = 48$ h d'incubation à 30°C, par microscopie optique en épifluorescence après coloration à l'OA (Figure 39).

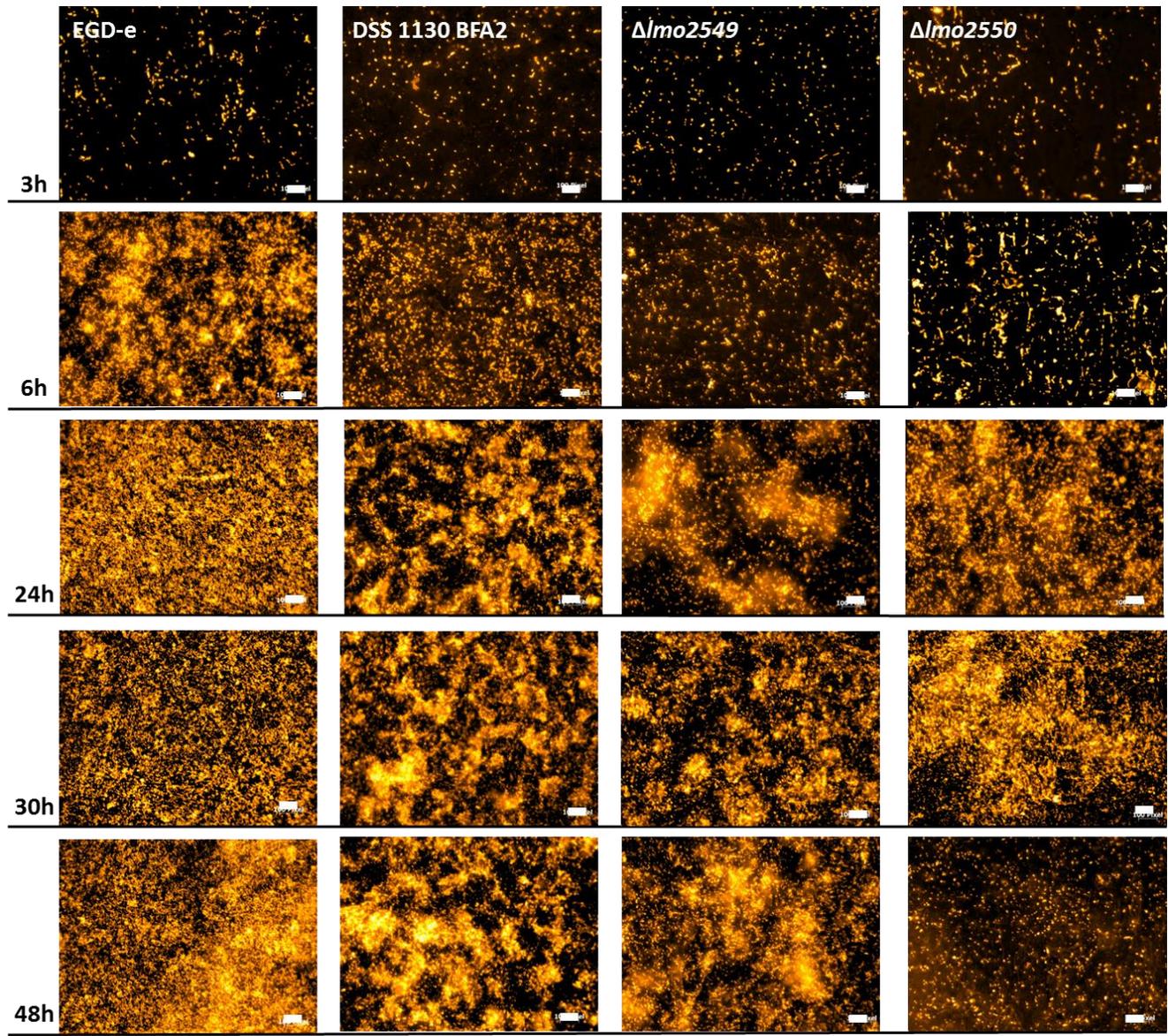


Figure 39 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration à l'orangé d'acridine de l'adhésion à la formation des biofilms de 48h par les mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202. Les barres blanches représentent l'échelle à 20 μm

A $t = 3$ h, qui correspond à la phase d'adhésion réversible, toutes les souches étudiées étaient capables d'adhérer à l'acier inoxydable principalement en cellules isolées. Aucune différence n'était visible dans la densité de cellules adhérentes entre la souche sauvage EGD-e et les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$.

A $t = 6$ h, pour la souche EGD-e, il y avait une augmentation de la densité cellulaire importante avec la formation de plusieurs petites micro-colonies formées de cellules bactériennes et de matrice extracellulaire par rapport à $t = 3$ h. Pour les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, il y avait également une augmentation de densité cellulaire par rapport à $t = 3$ h, avec principalement des cellules isolées et pas ou très peu de matrice extracellulaire.

A $t = 24$ h, la souche sauvage EGD-e formait un biofilm avec une architecture en tapis cellulaire dense réparti de manière assez uniforme sur l'acier inoxydable avec des petits amas cellulaires et de la matrice extracellulaire. Des micro-colonies composées de cellules bactériennes et de matrice extracellulaire étaient observées pour le biofilm formé par le mutant DSS1130 BFA2. Des micro-colonies étaient également observées dans les biofilms des mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ mais de tailles plus importantes que celles de la souche DSS1130 BFA2. Des cellules isolées et de la matrice extracellulaire étaient également présentes en plus grande quantité.

A $t = 30$ h, la densité cellulaire et l'architecture des biofilms de toutes les souches étaient comparables aux observations faites à $t = 24$ h.

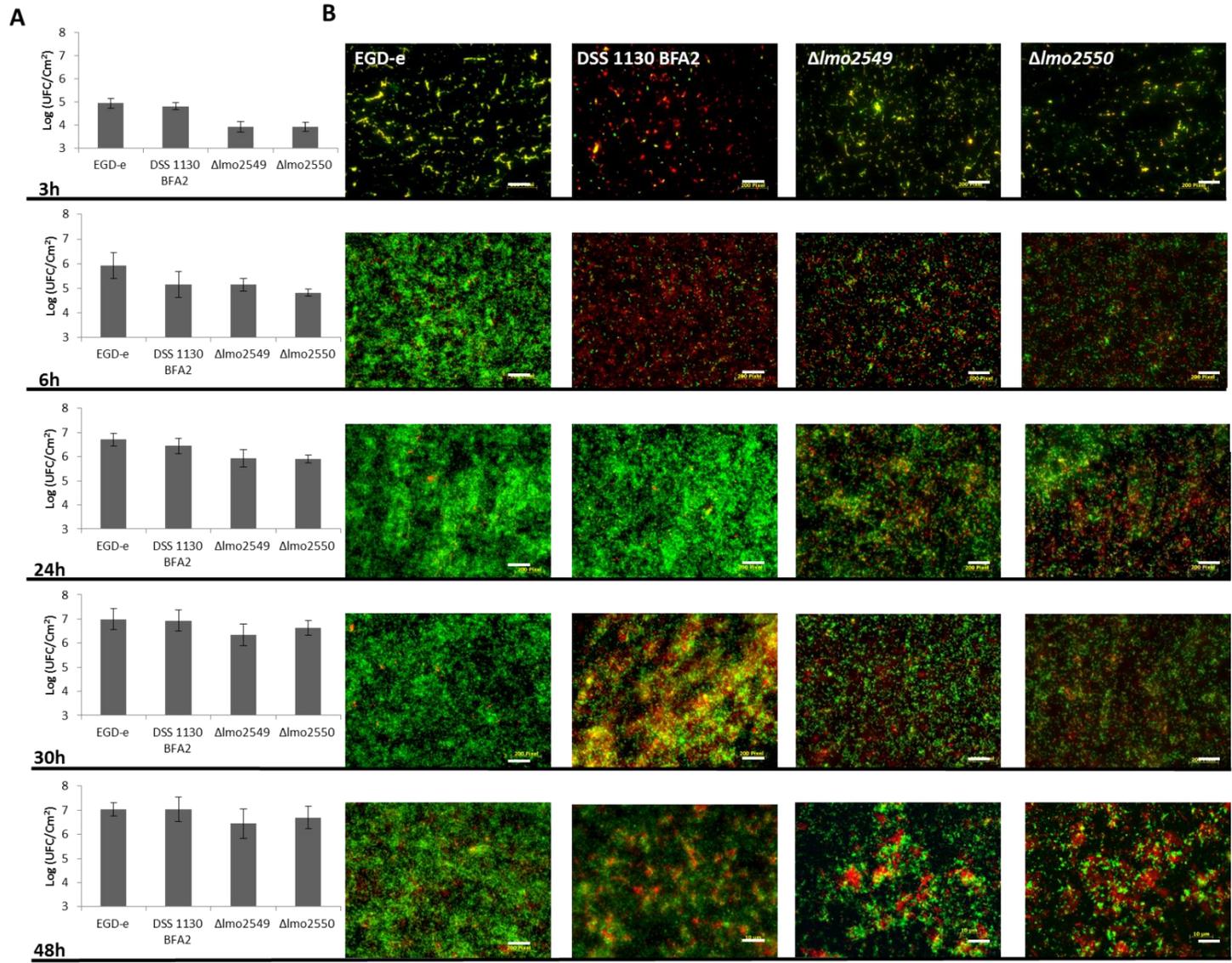


Figure 40: Suivi de l'adhésion à la formation des biofilms de 48h par les mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 A) Dénombrement sur milieux gélosés de la population de cellules viables cultivables à t= 3 h ; 6 h, 24 h, 30 h et 48 h B) Observations par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des cellules à t= 3 h ; 6 h, 24 h, 30 h et 48 h. Les barres blanches représentent l'échelle à 20 μm . Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance (n=3)

A $t = 48$ h, les architectures des biofilms de la souche sauvage EGD-e et des mutants DSS1130 BFA2 et $\Delta lmo2549$ étaient similaires à celles décrites à $t = 24$ h. Par contre, la biomasse du biofilm du mutant $\Delta lmo2550$ était moins dense par rapport à celle observée à $t = 30$ h. Les micro-colonies n'étaient plus présentes, faisant place à un tapis de cellules plus ou moins isolées réparties assez uniformément sur le matériau.

2.3.3.3 *Quantification et observation des populations viables et mortes*

Des quantifications de la population viable cultivable (VC) ont été réalisées de l'étape d'adhésion ($t = 3$ h) jusqu'à la formation d'un biofilm mature ($t = 48$ h) avec en parallèle, des observations microscopiques en épifluorescence avec la coloration Live/Dead® Bac Light™ pour la viabilité cellulaire (Figure 40).

En phase d'adhésion à $t = 3$ h, la souche sauvage EGD-e et le mutant DSS 1130 BFA2 avaient des populations de cellules VC adhérentes les plus importantes ($4,96 \log \text{ UFC/ cm}^2$ et $4,82 \log \text{ UFC/ cm}^2$). Les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ avaient des populations adhérentes en quantité similaire (environ $3,9 \log \text{ UFC/ cm}^2$) et significativement inférieures à celle de la souche sauvage EGD-e (1 log de différence) ($P < 0,05$). Les observations avec le colorant Live/Dead® Bac Light™ ont permis de confirmer celles avec le colorant OA pour l'architecture des tapis cellulaires. La viabilité des cellules n'a pas pu être déterminée du fait d'une coloration simultanée des cellules en rouge et vert.

A $t = 6$ h, la souche sauvage EGD-e avait la population adhérente significativement la plus élevée avec $5,92 \log \text{ UFC/ cm}^2$ en comparaison avec celles des mutants (de $5,14$ à $4,81 \log \text{ UFC/ cm}^2$). Les observations microscopiques étaient cohérentes par rapport aux dénombrements puisqu'à $t = 6$ h la souche sauvage EGD-e avait une densité de cellules viables plus importante que celle des mutants. Parmi les cellules viables colorées en vert, une

quantité plus ou moins importante de cellules mortes était observée pour les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$.

A $t = 24$ h, 30 h et 48 h, la population bactérienne des biofilms de la souche sauvage EGD-e était similaire à celles des mutants DSS 1130 BFA2 et $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ (de $6,71 \log \text{ UFC/cm}^2$ à $6,35 \log \text{ UFC/cm}^2$) ($P > 0,05$) et significativement supérieure à celles dénombrées à $t = 6$ h ($P < 0,05$). Il est important de noter qu'il y avait une augmentation plus importante des populations mutantes par rapport à la souche sauvage EGD-e entre $t = 6$ h et $t = 24$ h. Pour les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, nous avons observé la présence d'une population de cellules mortes (couleur rouge) en densité cellulaire proche de celle des cellules viables (couleur verte). Ceci n'a pas été observé pour la souche sauvage EGD-e ni pour la souche DSS 1130 BFA2 mais cela restait cohérent avec les observations à $t = 6$ h. Comme observé avec l'OA, la souche EGD-e formait un tapis cellulaire réparti de manière uniforme sur le matériau. Pour la souche DSS 1130 BFA2, il y avait principalement des cellules viables isolées et en micro-colonies à $t = 24$ h, alors qu'à $t = 30$ h, l'architecture restait identique mais avec l'apparition de cellules mortes présentes en micro-colonies. La présence de cellules mortes a été observée à $t = 48$ h pour toutes les souches bactériennes. Par contre, l'architecture des biofilms était identique à celle observée à $t = 30$ h avec des cellules isolées pour la souche sauvage EGD-e, des cellules isolées et des micro-colonies pour le mutant $\Delta lmo2549$ et la souche DSS 1130 BFA2, et des cellules isolées ainsi que des agrégats cellulaires pour le mutant $\Delta lmo2550$. Ces observations ont été confirmées avec la coloration en DAPI (Annexe 8).

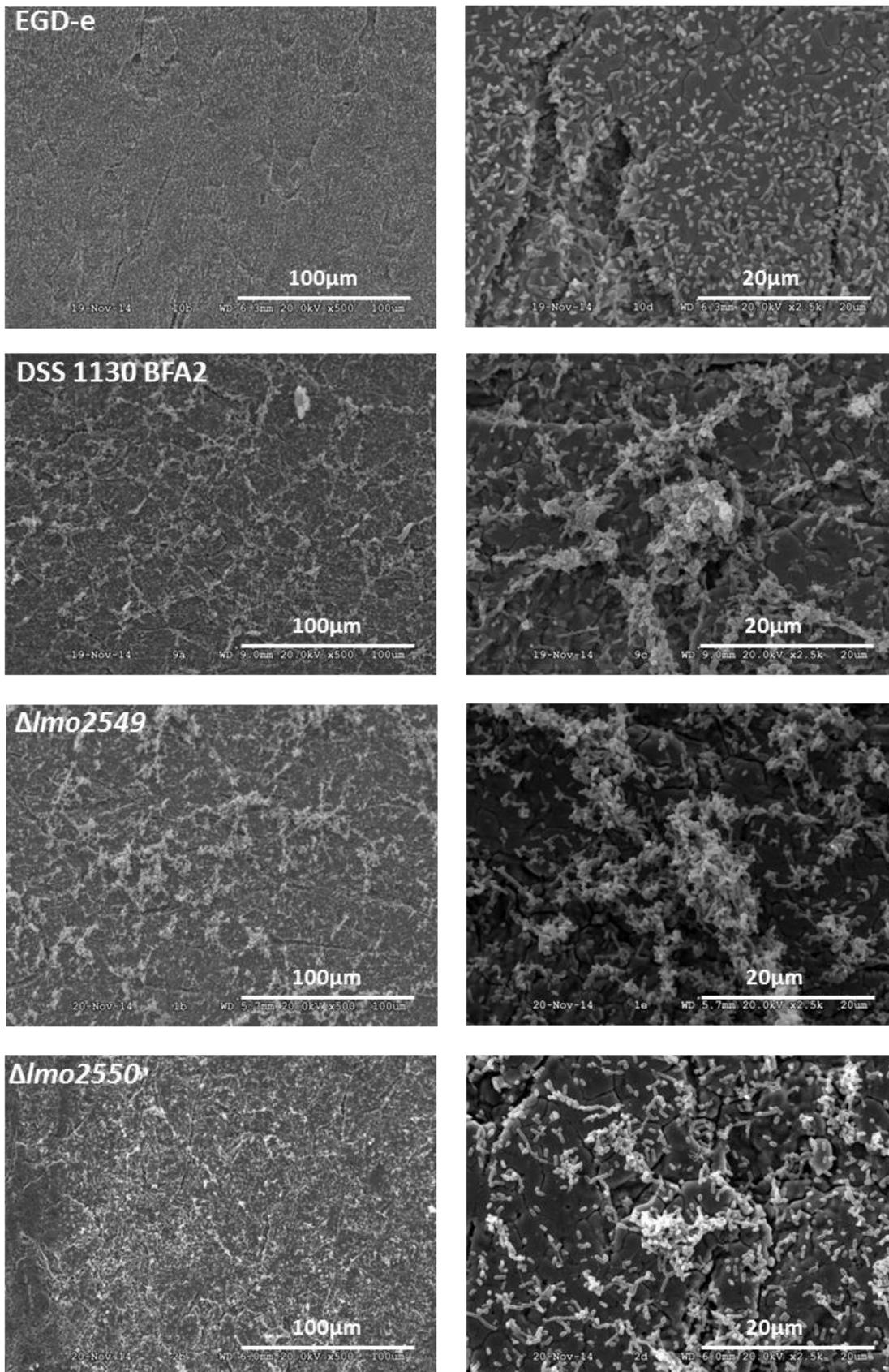


Figure 41 : Observations par microscopie électronique à balayage des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202.

2.3.4 *Caractérisation des biofilms matures de 48 h*

Nous avons étudié plus en détails l'architecture, l'état de viabilité des populations bactériennes et la composition de la matrice extracellulaire des biofilms matures de 48 h des mutants versus la souche sauvage EGD-e.

2.3.4.1 *Etude de l'architecture des biofilms de 48 h par microscopie électronique à balayage*

Des observations ont été réalisées par microscopie électronique à balayage (MEB) des biofilms de 48 h formés par la souche sauvage EGD-e et les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ (Figure 41). Un tapis de cellules isolées réparties de manière uniforme sur la surface a été observé pour les biofilms de 48 h de la souche sauvage EGD-e. Pour les biofilms formés par les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$, nous avons observé la présence de nombreuses micro-colonies avec de la matrice extracellulaire ainsi que des cellules isolées réparties sur tout le matériau de façon assez uniforme ce qui a confirmé les observations par microscopie en épifluorescence. Pour le mutant $\Delta lmo2550$, comme avec la microscopie en épifluorescence, nous avons observé un tapis de cellules principalement isolées répartis sur la surface avec la présence de quelques agrégats de cellules avec de la matrice extracellulaire.

2.3.4.2 *Observation des populations viables et mortes des biofilms de 48 h par microscopie optique*

Nous avons présenté les photographies qui permettent de visualiser la coloration avec le syto 9 et avec l'iodure de propidium et la photographie combinée des deux observations (Figure 42). Nous avons observé qu'il y avait un tapis dense de cellules viables réparties de manière uniforme sur le matériau pour les biofilms de la souche sauvage EGD-e ainsi qu'un tapis de cellules mortes réparties également de manière uniforme sur le matériau. Ensuite,

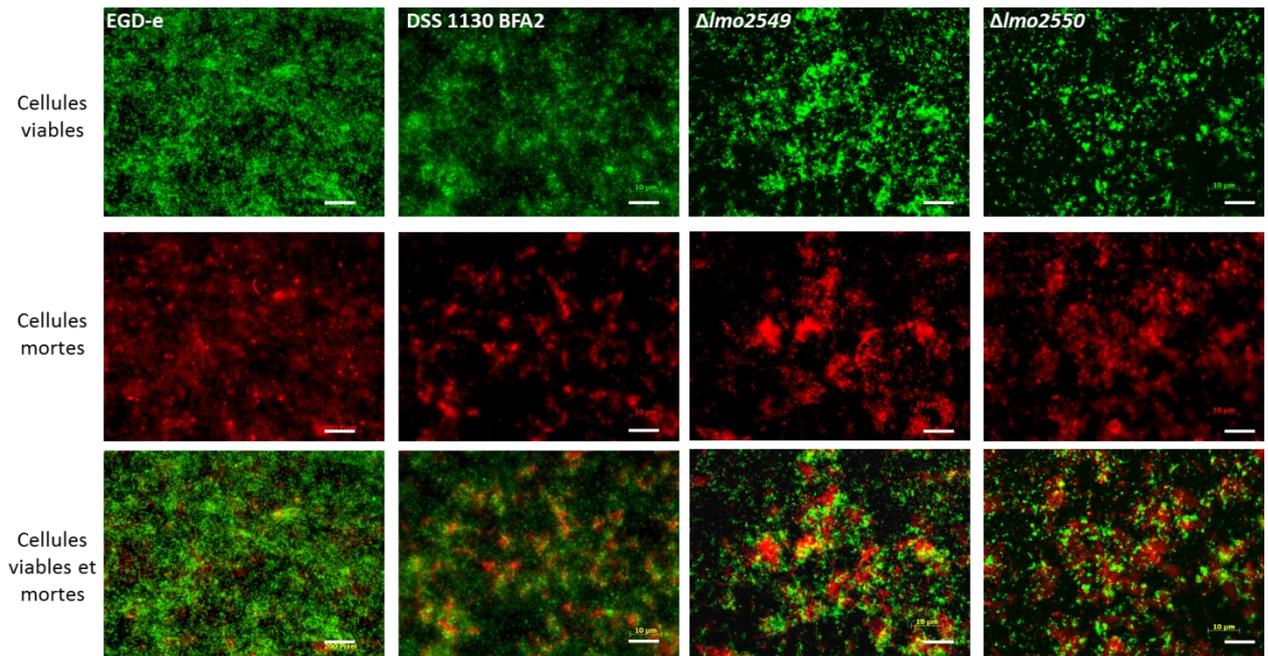


Figure 42: Observations par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202.

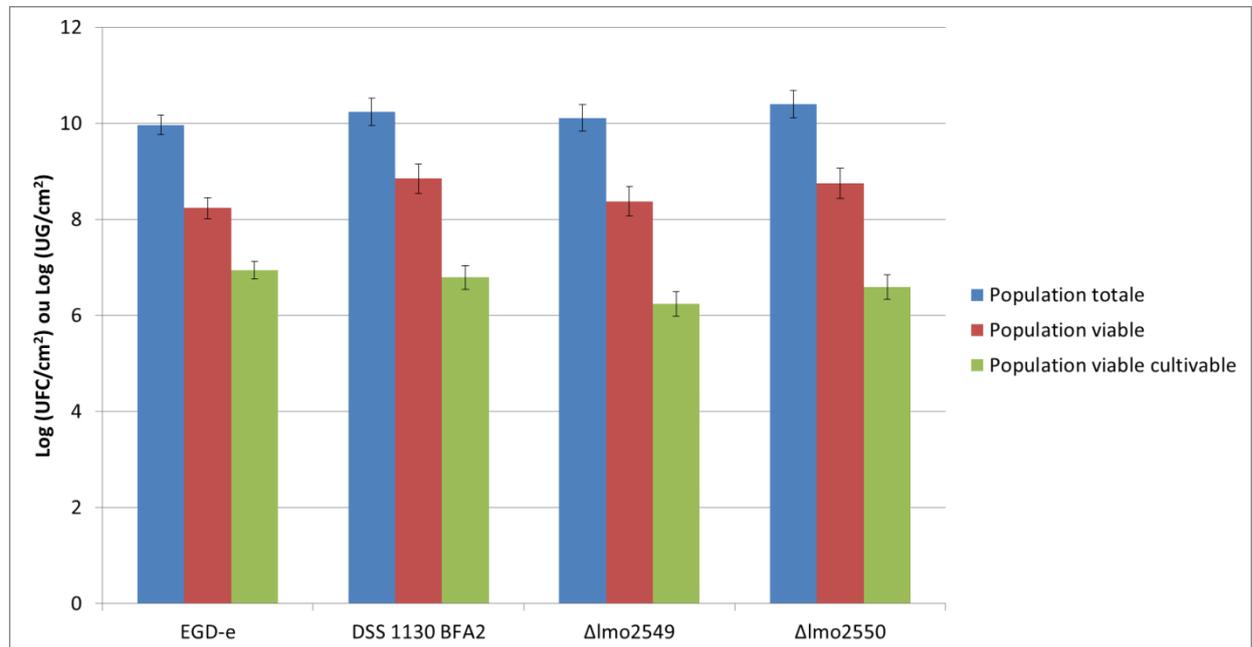


Figure 43: Quantification des populations totales, viables et viables cultivables des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. (EGD-e : n = 25, DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ n = 13).

nous avons combiné les 2 photographies pour analyser l'architecture du biofilm dans sa globalité. La combinaison des 2 prises d'image a permis de montrer un tapis cellulaire uniforme sur tout le matériau, il restait peu d'espace sans cellules. Par un effet d'optique (dominante d'une couleur), l'interprétation aurait été qu'il y avait plus de cellules viables que de mortes mais on voit une densité cellulaire dans un ordre de grandeur proche lorsque l'on observe les 2 photographies séparément. Les mutants complémentés $\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$ présentaient une architecture de biofilm similaire à celle de la souche sauvage EGD-e (Annexe 9).

Pour les biofilms des mutants DSS1130 BFA2 et $\Delta lmo2549$, nous avons observé un tapis dense de cellules isolées viables réparties sur toute la surface avec la présence de quelques micro-colonies. Pour les cellules mortes, elles étaient préférentiellement en agrégats cellulaires et moins en cellules isolées par rapport à la population viable. La combinaison des 2 prises d'image a permis de visualiser dans le centre des micro-colonies des cellules mortes et en périphérie des cellules viables. Ces cellules viables se présentaient également en cellules isolées. Une architecture similaire a été visible avec les biofilms du mutant $\Delta lmo2550$ qui présentait plus des agrégats cellulaires plutôt que des micro-colonies.

2.3.4.3 *Dénombrement de la population viable et totale des biofilms de 48 h*

Des quantifications des populations viables (VC et VNC) et totales (VC, VNC et morte) des biofilms de 48 h ont été réalisées par PMA-qPCR et par qPCR puis comparées aux populations de cellules VC dénombrées sur milieux gélosés (Figure 43). La population totale quantifiée par qPCR des biofilms de la souche de référence EGD-e était similaire à celle des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ($P > 0,05$). De même, les populations viables quantifiées par PMA-qPCR et VC quantifiées par dénombrement sur milieux gélosés

étaient significativement identique entre les biofilms de la souche sauvage EGD-e et ceux des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ($P > 0,05$).

Les différences de population obtenues entre les 3 méthodes de quantifications (qPCR, PMA-qPCR et milieux gélosés) ont permis de montrer la présence de populations VC, VNC et mortes dans les biofilms de la souche sauvage EGD-e. Les différences entre les quantifications effectuées par PMA-qPCR et celles sur milieux gélosés ont montré la présence d'une population VNC alors que les différences entre les quantifications effectuées par qPCR et celles par PMA-qPCR ont montré la présence d'une population morte. Il y avait une différence ($1,29 \log \text{UG/ cm}^2$) entre la quantification effectuée par PMA-qPCR et le dénombrement sur milieux gélosés ce qui montrait la présence d'une population de VNC dans les biofilms de la souche sauvage EGD-e. L'écart ($1,73 \log \text{UG/ cm}^2$) entre la quantification effectuée par qPCR et par PMA-qPCR a permis de montrer la présence d'une population morte. La population de cellules VNC apparaît significativement plus importante dans les biofilms des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ que dans les biofilms de la souche sauvage ($P < 0,05$). Par contre, la population de cellules mortes était similaire entre les biofilms de la souche sauvage EGD-e et ceux des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ($P > 0,05$).

Les populations bactériennes dénombrées par les 3 techniques de quantification dans les biofilms de 48 h des mutants complémentés $\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$ étaient en proportion similaire à celles de la souche sauvage EGD-e (Annexe 10).

Tableau 10 : Quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) des biofilms de 48h formés par les mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 .

Souches	ADNe ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm IC ^A	Protéines ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm IC ^B	Glucides ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm IC ^C
EGD-e	4,09 \pm 0,77	1,56 \pm 0,20	7,63 \pm 1,98
DSS 1130 BFA2	3,48 \pm 0,77	0,73 \pm 0,20	7,21 \pm 1,98
<i>$\Delta lmo2549$</i>	2,81 \pm 0,77	0,61 \pm 0,20	7,71 \pm 1,98
<i>$\Delta lmo2550$</i>	2,88 \pm 0,77	0,32 \pm 0,20	4,16 \pm 1,98

^A: Intervalle de confiance n=6

^B: Intervalle de confiance n=10

^C: Intervalle de confiance n=9

2.3.4.4 *Quantification des composants de la matrice extracellulaire*

La quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) a permis de montrer que le composé majoritaire était les glucides puis l'ADNe et en dernier les protéines pour toutes les souches. Seules les quantités variaient (Tableau 10). Le composant majoritaire de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche sauvage EGD-e était les glucides avec une concentration de $7,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ suivi de l'ADNe avec une concentration de $4,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ puis des protéines avec une concentration de $1,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les composants de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche DSS1130 BFA2 étaient significativement identiques de celles de la souche sauvage EGD-e sauf pour les protéines qui étaient 2 fois moins concentrées ($P < 0,05$). Le mutant $\Delta lmo2549$ avait une quantité de glucides similaire à celle de la souche sauvage EGD-e, une quantité d'ADNe similaire à celle du mutant $\Delta lmo2550$, et une quantité de protéines similaire à celles de la souche DSS1130 BFA2.

Pour le mutant $\Delta lmo2550$, les quantités de chaque composé étaient significativement plus faibles que celles de la souche sauvage EGD-e ($P < 0,05$).

2.3.5 *Résistance des biofilms de 48 h à des flux laminaires*

Dans cette dernière partie, nous avons évalué la population résiduelle (observation et viabilité cellulaire) des mutants versus celle de la souche sauvage EGD-e sur l'acier inoxydable après le passage d'un flux laminaire pour voir si l'absence ou la présence du résidu GlcNac influait sur la persistance des cellules sur les matériaux.

2.3.5.1 *Population résiduelle après un flux d'eau laminaire*

Les populations résiduelles VC, viables et totales sur l'acier inoxydable ont été quantifiées après l'application d'un flux d'eau avec une contrainte de 40Pa pour la souche sauvage EGD-e et les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ (Figure 44).

A

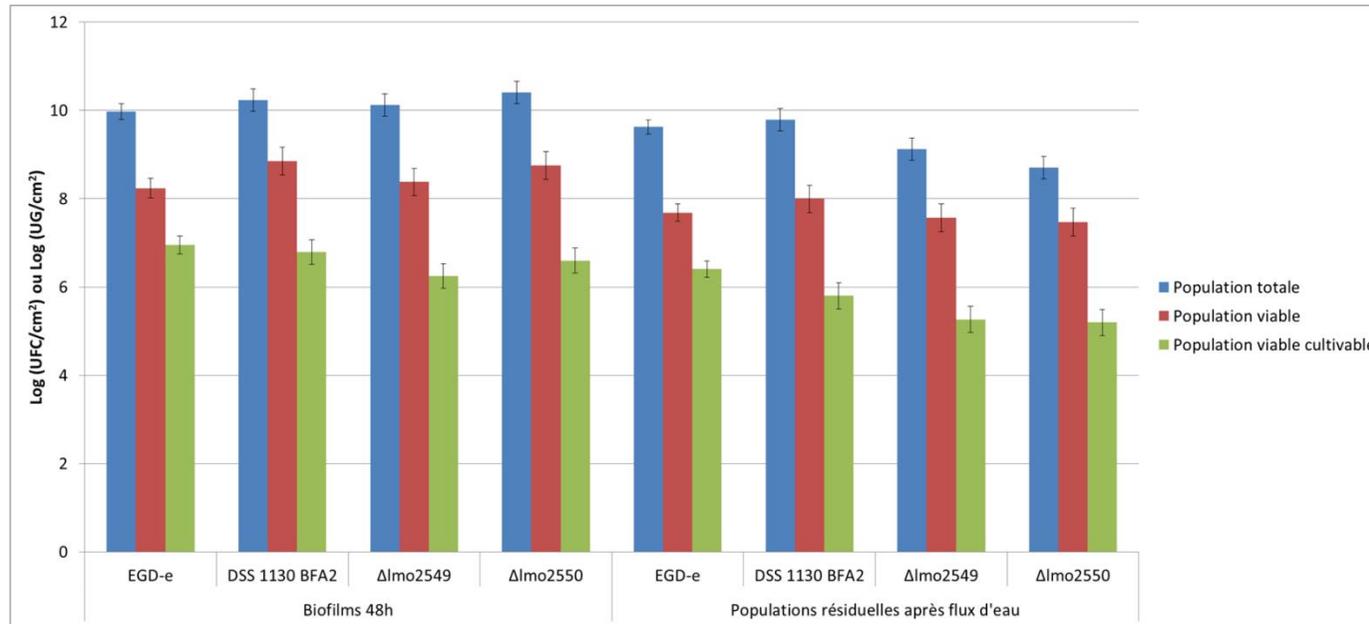
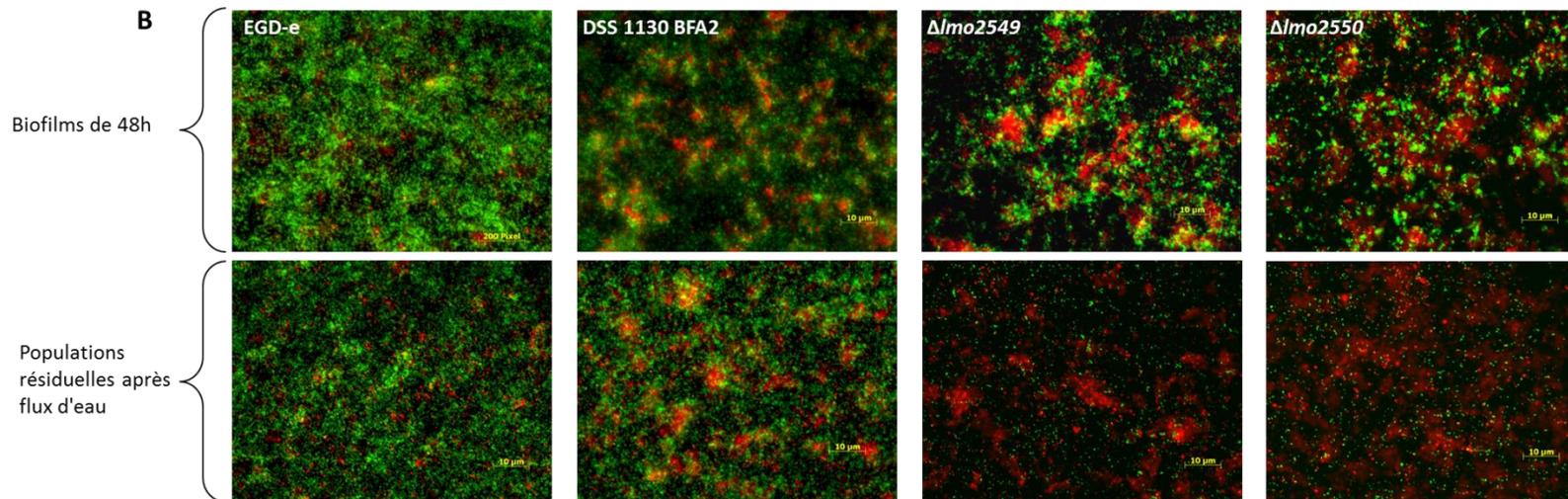


Figure 44 : Résistance des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 à un flux d'eau à un débit de 40 Pa. A) Dénombrement des populations résiduelles totales, viable et viable cultivable. B) Observations microscopiques des populations résiduelles après coloration au Live/Dead® Bac Light™. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. EGD-e : n = 24, DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ n = 12.

B



La quantification réalisée par qPCR a montré que la population totale des biofilms de la souche sauvage EGD-e n'était pas décrochée par le flux d'eau. Des observations similaires ont été faites avec les biofilms du mutant DSS 1130 BFA2 (Figure 44 A). Par contre, il y avait une diminution significative ($1 \log \text{UG/ cm}^2$ et $1,69 \log \text{UG/ cm}^2$) de la population totale pour les biofilms des mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ($P < 0,05$). Pour la population viable (VC et VNC) du biofilm de la souche sauvage EGD-e, elle n'était pas significativement différente avant et après passage du flux d'eau. Des observations similaires ont été faites sur les populations viables des biofilms des mutants DSS 1130 BFA2 et $\Delta lmo2549$. Par contre, la population résiduelle du mutant $\Delta lmo2550$ après le passage du flux laminaire contenait une population viable significativement inférieure à celle avant passage du flux (perte de $1,28 \log \text{UG/ cm}^2$) ($P < 0,05$). La population VC du biofilm de la souche sauvage EGD-e a diminué de $0,56 \log \text{UFC/ cm}^2$. Par contre, les populations VC des biofilms des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ont subi un décrochage significatif avec une baisse de $1 \log \text{UFC/ cm}^2$ pour les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et de $1,40 \log \text{UFC/ cm}^2$ pour le mutant $\Delta lmo2550$.

La différence entre la quantification réalisée par PMA-qPCR et le dénombrement sur milieux gélosés a permis de mettre en évidence la présence d'une population VNC dans les biofilms résiduels de la souche sauvage EGD-e. Cette proportion de cellules VNC n'est pas apparue significativement affectée par le passage du flux d'eau sur les biofilms ($P < 0,05$). Des observations similaires ont été faites dans les biofilms résiduels des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$. De même, la différence entre la quantification réalisée par PMA-qPCR et par qPCR nous a permis de mettre en évidence la présence d'une population morte dans les biofilms résiduels de la souche sauvage EGD-e. Cette population n'a également pas

été affectée par le passage du flux d'eau sur les biofilms. Des observations similaires ont été faites dans les biofilms résiduels des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$.

Les observations microscopiques étaient en accord avec les données de quantification (Figure 44 B). L'architecture du biofilm de la souche de référence EGD-e et du mutant DSS 1130 BFA2, après le passage du flux d'eau, était identique à celle décrite dans le biofilm mature initial. Par contre, les populations résiduelles des biofilms des mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ étaient moins denses après passage du flux d'eau que dans le biofilm initial.

Concernant la viabilité cellulaire, les bactéries viables résiduelles de la souche sauvage EGD-e étaient toujours visibles après le passage du flux d'eau dans des proportions égales à celles du biofilm initial comme pour le mutant DSS1130 BFA2. Par contre, pour les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, nous avons observé qu'il restait principalement que des agrégats de cellules mortes et des cellules mortes isolées avec une densité faible de cellules viables isolées sur la surface. La partie des cellules viables des micro-colonies du mutant $\Delta lmo2549$ a été décrochée ainsi qu'une partie des cellules mortes qui composaient également cette structure. Il en était de même pour le mutant $\Delta lmo2550$.

Les résultats obtenus avec les mutants complémentés $\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$ étaient similaires à ceux de la souche sauvage EGD-e ($P > 0,05$) (Annexe 11).

A

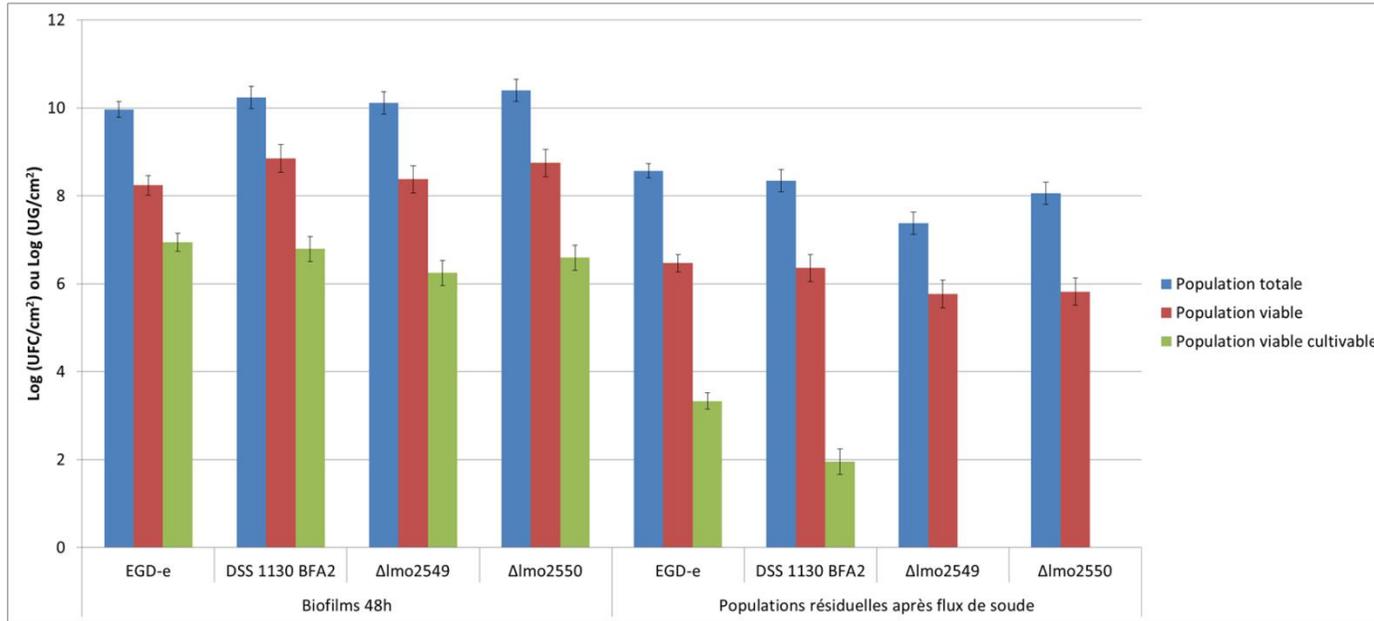
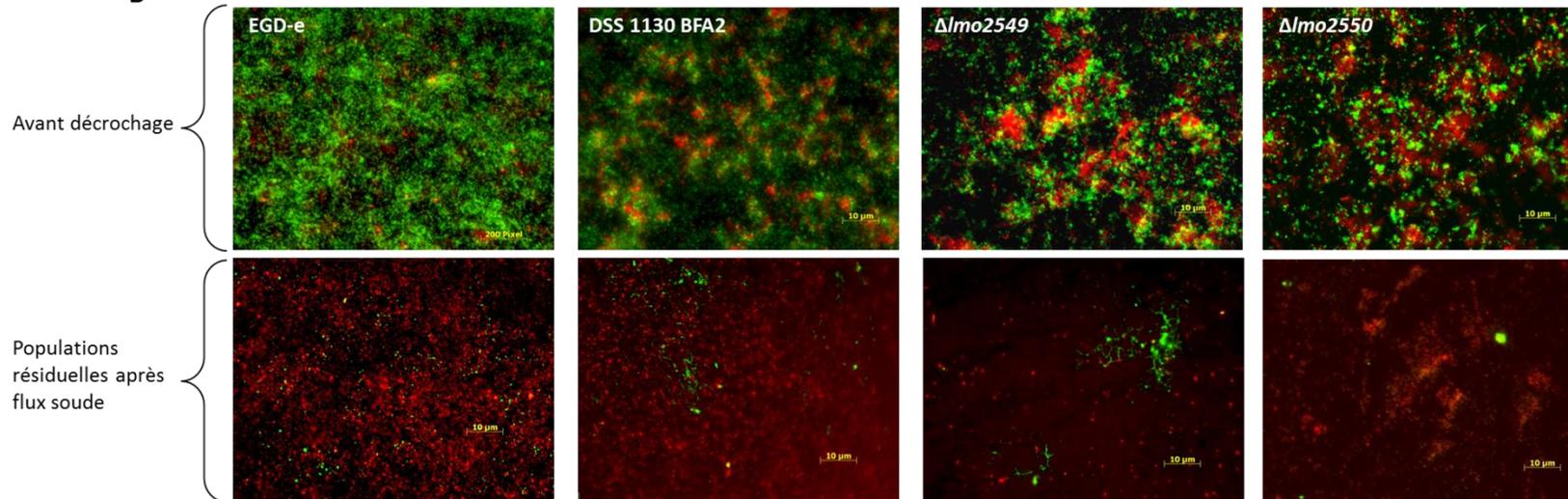


Figure 45 : Résistance des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivée sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 à un flux de soude (0,05%) à un débit de 40 Pa. A) Dénombrement des populations résiduelles totales, viables et viables cultivables. B) Observations microscopiques des populations résiduelles après coloration au Live/Dead[®] Bac Light[™]. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. EGD-e : n = 24, DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ n = 12.

B



2.3.5.2 Population résiduelle après un flux laminaire couplé à un traitement avec un détergent, la soude

Afin d'évaluer la résistance à un décrochage mécanique couplé à un traitement chimique, les biofilms de 48 h de la souche sauvage EGD-e et des mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ont été soumis à un flux laminaire avec une solution de soude à 0,05% pendant 10 minutes avec une contrainte de 40 Pa (Figure 45). Ensuite, les populations résiduelles VC, viables et totales ont été quantifiées (Figure 45A).

La population totale résiduelle pour la souche sauvage EGD-e était significativement inférieure à celle de la population dans le biofilm initial (diminution de 1,40 log UG/ cm²) ce qui était également observé pour les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ (diminution allant de 1,89 log UG/ cm² à 2,74 log UG/ cm²) ($p < 0,05$).

Les populations viables résiduelles (VC et VNC) des biofilms de la souche sauvage EGD-e ont également diminué significativement de 1,77 log UG/ cm² comme pour les mutants DSS 1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ (2,43 à 2,93 log UG/ cm²) ($P < 0,05$). Cette diminution significative a également été observée pour la population VC de la souche sauvage EGD-e et pour la souche DSS1130 BFA2 (3,61 à 4,84 log UFC/ cm²) ($P < 0,05$). En ce qui concerne les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, avec une sensibilité à (2 UFC/Cm²), aucune bactérie VC n'a été détecté après le passage du flux de soude à un débit de 40 Pa sur l'acier inoxydable. Il ne restait que des populations VNC et mortes.

La densité cellulaire des biofilms de la souche de référence EGD-e et du mutant DSS 1130 BFA2 après le passage du flux de soude était moins importante que pour le biofilm initial avec la présence principalement de cellules mortes isolées réparties sur toute la surface

et la présence de quelques cellules viables isolées (Figure 44B). Pour les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, il y avait beaucoup moins de cellules adhérentes après le passage du flux de soude, il s'agissait surtout de cellules mortes isolées.

Les résultats obtenus avec les mutants complémentés $\Delta lmo2549::pPL2(lmo2549)$ et $\Delta lmo2550::pPL2(lmo2550)$ étaient similaires à ceux de la souche sauvage EGD-e ($P > 0,05$) (Annexe 11).

2.4 Discussion

Dans ces travaux, nous avons étudié l'impact de l'absence de résidu GlcNAc des acides téichoïques sur l'adhésion, la formation et le détachement des biofilms de *L. monocytogenes* sur acier inoxydable. Pour cela, le comportement de deux mutants obtenus par mutagenèse dirigée des gènes *lmo2549* et *lmo2550*, et d'un mutant porteur d'une mutation ponctuelle du gène *lmo2550* ont été étudiés versus la souche sauvage EGD-e.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que l'ensemble des souches étudiées avait un caractère hydrophile dans le milieu de culture MCDB 202. Ces observations étaient en accord avec les travaux de Briandet, et al. (1999) qui ont montré que la souche ScottA (sérotypage 4b) avait un caractère hydrophile plus ou moins marqué en fonction du pH du milieu de culture utilisé. Pour les mutants $\Delta lmo2549$, $\Delta lmo2550$ et DSS 1130 BFA2, la perte du résidu GlcNAc des acides téichoïques pariétaux a entraîné une augmentation du potentiel hydrophile par rapport à la souche sauvage EGD-e. Cela peut s'expliquer puisque comparativement au glucose (Glc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc) est modifié sur le carbone 2 où la fonction alcool est remplacée par un groupement N-acétyl constitué d'une fonction amide et du squelette de l'acide acétique. Cette fonction amide confère une nature plus hydrophobe au GlcNAc. Nos résultats sont donc en accord avec ces propriétés puisque la

souche sauvage porteuse du résidu GlcNAc sur ces acides téichoïques apparaît moins hydrophile que les mutants dépourvus de GlcNAc. Ces propriétés hydrophobes/hydrophiles des surfaces bactériennes ont un rôle essentiel dans l'adhésion bactérienne en milieu aqueux. Plus une bactérie est hydrophobe, mieux celle-ci adhère aux surfaces hydrophobes. Inversement, sur des surfaces hydrophiles, les bactéries hydrophiles présentent une meilleure adhésion. Une autre propriété importante dans le mécanisme d'adhésion est la charge électrique sur la surface bactérienne. L'ensemble des souches de *L. monocytogenes* étudiées avait une charge négative élevée dans le milieu de culture pauvre MCDB 202, et une mobilité électrophorétique à pH 7 identique à celle obtenue par Briandet, et al. (1999) ($-3 \mu\text{m} / \text{s} / \text{V} / \text{cm}$) avec la souche ScottA cultivée dans un milieu de culture TSYE avec du glucose. La charge bactérienne est attribuée aux constituants de la paroi cellulaire (par exemple, les phosphates, les groupements carboxylates, et les protéines) (Pelletier, et al., 1997). Les acides téichoïques étant un constituant majeur de la paroi cellulaire des bactéries Gram positif, ils sont responsables en grande partie de la charge négative mesurée sur les souches de *L. monocytogenes* (Neuhaus et Baddiley, 2003). L'absence de GlcNAc sur ces acides téichoïques n'a pas modifié la charge bactérienne des mutants étudiés ce qui s'explique car le GlcNAc n'est pas porteur de charge électrique. Les observations réalisées en microscopie électronique à transmission n'ont révélé aucun impact de l'absence de résidu GlcNAc sur la morphologie bactérienne ni sur la division cellulaire dans le milieu MCDB 202 ce qui était en accord avec les observations des mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ par microscopie en contraste de phase réalisées par Eugster, et al. (2011). Il en est de même pour la croissance et la viabilité cellulaire qui était similaire entre les mutants et la souche sauvage EGD-e et nous avons également montré qu'un changement de température de culture et de nature du matériau n'a pas affecté la composition polysaccharidique de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes* ce qui n'avait pas encore été démontré dans d'autres travaux.

En lien avec les propriétés de surface, nous avons observé une population adhérente (t = 3 h et 6 h) à l'acier inoxydable (caractérisé comme une surface hydrophobe, Annexe 12) moins importante pour les mutants *Δlmo2549*, *Δlmo2550* que pour la souche sauvage EGD-e. Par contre, ces observations n'ont pas été confirmées avec le mutant DSS 1130 BFA2 qui avait une population adhérente similaire à la souche sauvage EGD-e ce qui peut s'expliquer car d'autres facteurs peuvent influencer l'adhésion bactérienne. Les observations microscopiques en coloration Live/Dead® Bac Light™ des populations adhérentes après 3 h d'incubation ne permettaient pas de faire une distinction entre les cellules viables et les cellules mortes. Des quantifications réalisées par PMA-qPCR et qPCR des populations viables et totales (t = 3 h) nous ont permis de confirmer que les proportions de cellules mortes étaient identiques dans l'ensemble des conditions alors que les proportions de cellules VNC étaient significativement plus importantes pour les mutants *Δlmo2549*, *Δlmo2550* par rapport au mutant DSS1130 BFA2 et à la souche sauvage EGD-e (Annexe 13). Par contre, il n'y avait plus de différence de population bactérienne VC entre toutes les souches étudiées pour les biofilms de t = 24 h, 30 h et 48 h. Ces résultats indiquent donc qu'une adhésion réduite n'est pas forcément synonyme d'une capacité réduite à former des biofilms. En effet, la formation des biofilms n'est pas inhérente aux cellules initialement adhérentes mais est le résultat d'une adhésion perpétuelle des bactéries tout au long de la vie du biofilm. En plus des cellules VC, les quantifications des populations viables par PMA-qPCR et totales par qPCR des biofilms de 48 h ont révélé que les mutants dépourvus de substitution GlcNac comportent une population plus importante de cellules VNC par rapport à la souche sauvage. En revanche, la proportion de cellules morte apparaissait similaire entre les mutants *Δlmo2549*, *Δlmo2550* et DSS1130 BFA2 et la souche sauvage EGD-e. Lors de l'analyse des composants de la matrice extracellulaire, pour toutes les souches étudiées, le composé majoritaire était les glucides ensuite l'ADNe et enfin les protéines. Par contre, les quantifications d'EPS ont mis en

évidence une sous-production des composants de la matrice extracellulaire par les mutants $\Delta lmo2549$, $\Delta lmo2550$ et DSS1130 BFA2 versus la souche sauvage EGD-e avec une quantité de protéine extracellulaire diminuée pour l'ensemble des mutants, ainsi que d'ADNe pour les mutants $\Delta lmo2549$, $\Delta lmo2550$ et de glucides pour le mutant $\Delta lmo2550$. Il a souvent été rapporté que les glucides étaient les EPS majoritaires de la matrice extracellulaire de la plupart des biofilms bactériens (Kumar et Anand, 1998, Branda, et al., 2005) alors que pour d'autres études ce sont les protéines qui constituaient la classe majeure (Nielsen, et al., 1997, Jahn, et al., 1999). Il y a très peu d'études quantitatives sur *Listeria*. A l'heure actuelle, seuls les travaux de Combrouse, et al. (2013) ont mis en évidence que les quantités d'EPS dépendaient du milieu de culture et des souches étudiées. Les autres études n'ont pas utilisé le même mode opératoire (milieu de culture, temps d'incubation des biofilms, méthodes de quantification...)

Les observations de l'architecture des biofilms par microscopie en épifluorescence et par microscopie électronique à balayage ont montré que l'absence du résidu GlcNAc modifiait l'architecture des biofilms à partir de 24 h d'incubation en favorisant l'apparition de micro-colonies et d'amas cellulaires par rapport au tapis cellulaire de la souche sauvage EGD-e. Des observations similaires ont été faites en microscopie confocale par Danese, et al. (2000) sur des mutants d'*Escherichia coli* K-12 inactivés dans leur voie de biosynthèse de l'acide colanique, un EPS majeur de cette bactérie. Par contre, il n'y a pas d'études similaires de l'adhésion à la formation d'un biofilm pour des mutants de *L. monocytogenes*.

Suite à cette caractérisation, la résistance des biofilms mutants a été évaluée face à un flux d'eau avec un débit de 40Pa. Le premier résultat important était la résistance des biofilms

mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ ont subi une diminution significative de leur population VC. Cette diminution de la population VC a été accompagnée d'une augmentation significative de la proportion de VNC suggérant que la population VC aurait adaptée sa viabilité face au stress mécanique et chimique. Peu de résultats similaires ont été rapportés dans la littérature sur les biofilms et les cellules bactériennes adhérentes de *L. monocytogenes*. Seuls des travaux utilisant des cellules à écoulement radial circulaire ont été rapportés. Perni, et al. (2007) ont ainsi montré que des cellules de *L. monocytogenes* après 24 h d'adhésion à 30°C à l'acier inoxydable 316L pouvaient être éliminées par l'application d'une contrainte de cisaillement entre 52 et 101 Pa. Plus récemment, Giao et Keevil (2013) ont mis en évidence que des biofilms de 24 h formés par la souche de *L. monocytogenes* NCTC 13372 (sérotypage 1/2c) à 22°C sur de l'acier inoxydable AISI 316 L et soumis à un flux laminaire de $1,62 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$ de 10 min étaient décrochés pratiquement en totalité. Pour l'ensemble de ces études, les populations VNC et mortes n'ont pas été étudiées. Il est à noter que les forces que nous avons appliquées dans notre étude reflètent les conditions rencontrées dans les industries agro-alimentaires. En effet, les contraintes de cisaillement dans les industries sont pour la plupart en dessous de 20 Pa dans les tuyaux, jusqu'à 100 Pa dans des échangeurs à plaques, et parfois plus dans des domaines spécifiques tels que les pompes centrifuges. Plus largement, il a été mis en évidence que des sprays à haute pression (17,2 bar) se sont avérés capables de détacher les biofilms de *P. aeruginosa*, avec une baisse de 2 log UFC (Gibson, et al., 1999). Un autre travail sur des spores de *Bacillus* a mis en évidence que des forces de cisaillement de 500 Pa décrochaient moins de 90% des spores adhérents (Faille, et al., 2013).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la résistance plus faible au décrochage observée pour les mutants dépourvus de GlcNAc pourrait être le résultat des forces

d'interaction entre les cellules et l'acier inoxydable plus faibles comme nous avons montré que l'adhésion était moins importante pour les mutants que pour la souche sauvage EGD-e.

En effet, il est admis que plusieurs facteurs dont les propriétés de surface cellulaire (Fang, et al., 2000, Sheng, et al., 2007, Deupree et Schoenfisch, 2008), les propriétés de la surface d'adhésion (Briandet, et al., 1999, Faille, et al., 2010), le conditionnement de surface (Busscher, et al., 2008), et la force ionique (Xiaoxia, et al., 2006) interviennent dans l'adhésion bactérienne. Il est également intéressant de noter que, dans ce travail, les coupons contaminés n'étaient pas séchés à l'air avant les procédures de décrochage, ce qui aurait pu expliquer en partie la résistance élevée des cellules au détachement. En effet, un travail antérieur sur *L. monocytogenes* de Giao et Keevil (2013) a montré que les biofilms déshydratés étaient légèrement plus résistants aux flux turbulents (détachement 83%) que quand ils étaient humides (détachement totale). Une autre explication pourrait être la topographie de l'acier inoxydable que nous avons utilisé. En effet, l'acier inoxydable 316 L est connu pour présenter des crevasses caractéristiques qui pourraient fournir une protection contre les forces exercées lors du décrochage. Les observations effectuées en microscopie à balayage ont permis de confirmer la présence de ces crevasses. Une autre hypothèse serait le rôle de la matrice extracellulaire qui a des fonctions dans la cohésion du biofilm bactérien et la protection des cellules bactériennes face aux agressions de l'environnement. Du fait de la sous production de protéines et d'ADNe dans la matrice extracellulaire des biofilms de 48 h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, il nous est possible de faire l'hypothèse que cette sous-production de matrice extracellulaire fragiliserait les biofilms entraînant un décrochage accru des cellules face aux flux d'eau.

Par contre, il est clair qu'une action mécanique exercée par un flux d'eau est loin de décrocher les biofilms dans leur totalité. Nous avons ajouté une action chimique à l'action

mécanique du flux ce qui a joué un rôle essentiel dans l'élimination des cellules VC mais qui a favorisé l'apparition de cellules VNC. Ce phénomène a été fortement accentué chez les mutants dépourvus de GlcNAc. Faille, et al. (2013) ont mis en évidence qu'avec un décrochage à 4 Pa, l'utilisation de soude à 0,5% a permis d'éliminer jusqu'à 99% des spores de *Bacillus*. Cependant, aucune quantification des cellules VNC n'a été réalisée dans ces études. Nous aurions pu tirer des conclusions similaires par rapport à nos travaux puisque avec les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, 99% des cellules VC étaient éliminés par le flux de soude. Or, les proportions de cellules VNC ont révélé qu'en réalité, seulement 30,73% et 29,37% des cellules viables (VC + VNC) étaient décrochées après traitement. Ce n'est pas la première fois que de telles observations sont faites pour d'autres bactéries. Duffy et Dykes (2009) ont ainsi mis en évidence qu'à partir d'un coupon d'acier initialement contaminé avec 10^7 UFC/ml de *Campylobacter jejuni*, aucune cellule VC n'était dénombrée après 20 jours d'incubation alors que $3,5 \log$ UFC/cm² de cellules VNC avaient adhéré. Cette meilleure adhésion des cellules VNC de *C. jejuni* serait dû à l'expression constitutive du gène *cadF* codant une protéine de la membrane externe responsable de la liaison des fibronectines et intervenant dans l'adhésion et la formation des biofilms aux surfaces inertes (Sulaeman, et al., 2012, Patrone, et al., 2013). De même, Signoretto, et al. (2004) ont mis en évidence que l'adhésion des cellules VNC d'*E. faecalis* au plancton était un mécanisme important pour sa persistance dans les milieux aquatiques. Cette conclusion est également étayée par une étude montrant que des cellules métaboliquement actives mais non cultivables par des techniques classiques de dénombrement sur milieu gélosé (limite de détection de $1,3 \log$ UFC/cm²) sont restées attachées à des coupons d'acier inoxydable après un vortexage avec des billes (Giaouris, et al., 2005).

2.5 Conclusion

Dans nos travaux, nous avons mis en évidence que la perte de la fonction GlcNAc entraînait une diminution de l'adhésion bactérienne à l'acier inoxydable à cause d'un changement du caractère hydrophile des parois bactériennes mais la différence de population n'était plus visible sur les populations bactériennes des biofilms de 48 h. Il y a eu un changement dans l'architecture des biofilms de 48 h avec l'apparition de micro-colonies ou d'agrégats pour les mutants dépourvus de GlcNAc. Il faut également noter que ces biofilms de 48 h étaient plus sensibles à un décrochage sous flux d'eau exercé à une pression de 40 Pa en raison du caractère moins hydrophile des mutants, de la présence de micro-colonies ainsi que d'une sous-production de la matrice extracellulaire. Afin de résister au stress dû à une action mécanique et/ou chimique, *L. monocytogenes* a adopté un état VNC qui était accentué chez les mutants dépourvus de GlcNAc.

Chapitre 3. Etude de la capacité de formation de biofilms par des souches de *Listeria monocytogenes* de sérotype 1/2a affectées dans leurs voies de biosynthèse de l'acide téichoïque

3.1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en évidence que la non ramification de l'acide téichoïque avec du GlcNAc avait un impact sur le caractère hydrophile, l'adhésion bactérienne, l'architecture du biofilm et sa sensibilité à être décroché par un flux. De plus, les cellules des mutants avaient plus tendance à adopter un état VNC lors d'une action mécanique couplée à une action chimique. Il est apparu intéressant pour compléter ces travaux sur le rôle des exopolysaccharides dans la matrice extracellulaire, d'étudier des mutants inactivés dans la voie de biosynthèse des acides téichoïques. Les travaux portant sur ces mutants ne se sont pas intéressés aux biofilms bactériens (Dubail, et al., 2006, Eugster et Loessner, 2012).

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'impact d'une sous-expression d'acides téichoïques dans des souches de sérotype 1/2a, de l'adhésion à la formation et au détachement des biofilms de *L. monocytogenes* sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu pauvre MCDB 202.

Pour cela, nous avons travaillé avec la souche de référence *Listeria monocytogenes* EGD-e et avec quatre mutants de la souche de référence inactivés dans leur voie de biosynthèse des acides téichoïques qui ont été demandés auprès d'équipes de recherche (Dubail, et al., 2006, Eugster et Loessner, 2012). Un premier mutant, EGD-e Δ lmo2537/pLiv-lmo2537, était délété

du gène *lmo2537*, codant pour une UDP-GlcNAc 2-épimérase intervenant dans la formation de l'unité de liaison entre le peptidoglycane et la chaîne principale de poly(ribitol phosphate) de l'acide téichoïque (Dubail, et al., 2006). Trois mutants ont été étudiés : un mutant porteur d'une double délétion des gènes *tagO1* et *tagO2* (EGD-e Δ *tagO1* Δ *tagO2* ::pLIV2(*tagO1*)) intervenant dans la formation d'un décaprényl-diphospho-N-acétylglucosamine également nécessaire à la formation de l'unité de liaison entre le peptidoglycane et la chaîne principale de poly(ribitol phosphate) de l'acide téichoïque et deux mutants simples (EGD-e Δ *tagO1*, EGD-e Δ *tagO2*) (Eugster et Loessner, 2012). L'absence d'acides téichoïques ayant été caractérisée par les équipes de recherche comme létale pour *L. monocytogenes*, les gènes *lmo2537* et *tagO1 tagO2* ont été placés sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) afin de contrôler leur expression.

Dans une étude préliminaire, nous avons confirmé que les mutants ne synthétisaient pas d'acides téichoïques dans nos conditions expérimentales en quantifiant le ribitol pariétal. Nous avons décidé de quantifier le ribitol car c'est une molécule spécifique de l'acide téichoïque.

Ensuite, nous avons évalué l'impact des mutations sur les propriétés de surface de *L. monocytogenes* par mesure du caractère hydrophobe/hydrophile et du potentiel électrostatique. Des observations de la morphologie bactérienne ont été réalisées par microscopie électronique en transmission. Après avoir confirmé la viabilité des mutants dans le milieu de culture pauvre MCDB 202, nous avons étudié la population bactérienne de l'adhésion à la formation des biofilms par microscopie en épifluorescence et par dénombrement des populations VC sur milieux gélosés.

Tableau 11 : Souches bactériennes étudiées.

Souches	Abréviations	Caractéristiques	Références
EGD-e	EGD-e	Souche sauvage, sérotype 1/2a	(Glaser, et al., 2001)
EGDeΔtagO1	Δ tagO1	EGD-e Δ lmo0959; EGD-e portant une délétion chromosomique de lmo0959	(Eugster, et al., 2011)
EGDeΔtagO2	Δ tagO2	EGD-e Δ lmo2519; EGD-e portant une délétion chromosomique de lmo2519	(Eugster, et al., 2011)
EGDeΔtagO1ΔtagO2::pLIV2(tagO1)	Δ tagO1tagO2	Double mutant EGD-e délété de Δ tagO1 (lmo0959) et Δ tagO2 (lmo2519) et complétée par pLIV2 (tagO1), exprimant tagO1 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG; Cm ^r	(Eugster, et al., 2011)
EGD-eΔlmo2537/pLiv-lmo2537	Δ lmo2537	Mutant EGD-e délété du gène lmo2537 et complétée par pLiv (lmo2537), exprimant lmo2537 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG; Em ^r ; Cm ^r ; Km ^r .	(Dubail, et al., 2006)

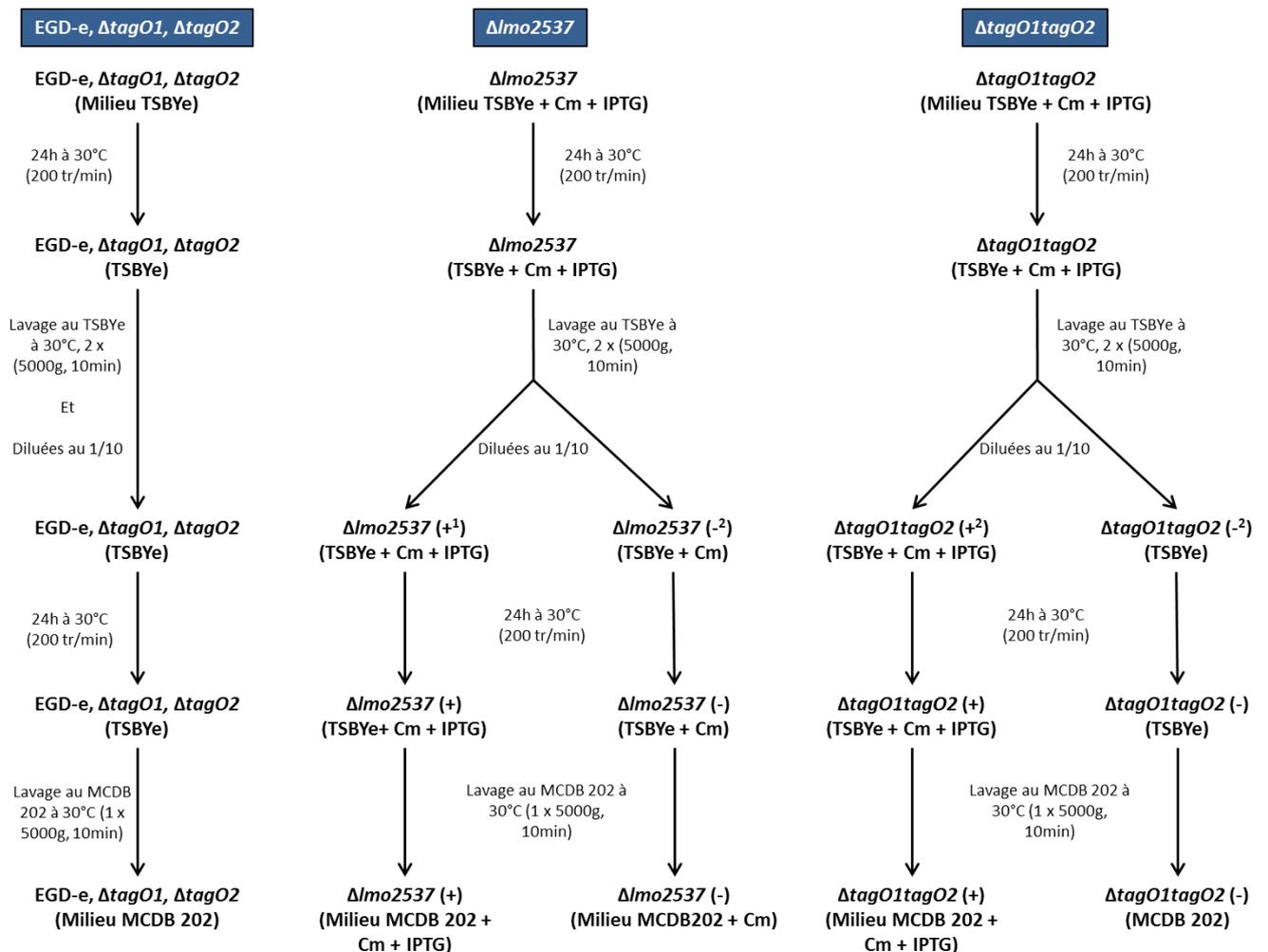


Figure 46 : Conditions de culture de la souche sauvage EGD-e et des mutants Δ lmo2537, Δ tagO1tagO2, Δ tagO1 et Δ tagO2. ¹: (+) Culture avec IPTG, ²: (-) : Culture sans IPTG.

Ensuite, nous avons étudié plus en détails les biofilms de 48 h par différentes techniques (microscopie électronique à balayage, dénombrement sur milieux gélosés, qPCR, PMA-qPCR, quantification des EPS). Suite à cette caractérisation, la résistance des biofilms statiques de 48 h a été évaluée après l'application d'un flux d'eau ou de soude appliquée à une contrainte de 40 Pa par quantification des populations résiduelles des biofilms.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Souches et conditions de culture

Les souches étudiées sont listées dans le tableau 11. Les cellules bactériennes ont été conservées dans du bouillon BCC supplémenté en glycérol (18% v/v) à -20°C.

3.2.1.1 *Pré-culture des mutants EGD-e Δ tag01, EGD-e Δ tag02 et de la souche sauvage EGD-e.*

Les mutants EGD-e Δ tag01 (Δ tag01) et EGD-e Δ tag02 (Δ tag02) ont été cultivés de façon identique à la souche sauvage EGD-e (Figure 46). Après décongélation à 30°C pendant 10 min des cryotubes contenant les souches, 20 μ l des cultures ont été transférés dans 30 ml de bouillon TSBYe puis incubés à 30°C pendant 24 h sous agitation rotative (200 tr/min). Les suspensions ont été diluées au 1/10^{ème} dans du bouillon TSBYe puis incubées à 30°C pendant 24 h sous agitation (200 tr/ min). Les cultures ont été centrifugées à 5000g pendant 10 min puis lavées avec du milieu MCDB 202 pour éliminer toutes traces du bouillon TSBYe. Les cultures ont de nouveau été centrifugées à 5000g pendant 10 min puis le culot a été resuspendu dans du milieu MCDB 202.

3.2.1.2 Pré-culture des mutants *EGD-eΔlmo2537/pLiv-lmo2537* et *EGD-eΔtagO1tagO2::pLIV2(tagO1)*

La réalisation des précultures des mutants *EGD-eΔlmo2537/pLiv-lmo2537* (*Δlmo2537*) et *EGD-eΔtagO1tagO2::pLIV2(tagO1)* (*ΔtagO1tagO2*) est schématisée dans la figure 46. Vingt microlitres de culture des mutants *Δlmo2537* et *ΔtagO1tagO2*, décongelés pendant 10 min à 30°C, ont été transférés dans 30 ml de bouillon TSBYe, qui ont été préincubés à 30°C, supplémentés en Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) et en chloramphénicol (Cm) à 10 µg/ ml (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) et incubés pendant 24 h à 30°C sous agitation à 200 tr/ min. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 5000g pendant 10 min et les culots ont été repris avec 30 ml de bouillon TSBYe. La manipulation a été répétée une seconde fois puis les culots ont été remis en suspension dans 30 ml de bouillon TSBYe.

L'induction de l'expression des acides téichoïques a été faite en diluant au 1/10^{ème} les deux mutants dans du bouillon TSBYe supplémenté avec du Cm (10 µg/ ml) et de l'IPTG (1 mM).

La répression de l'expression des acides téichoïques a été faite en diluant au 1/10^{ème} le mutant *Δlmo2537* dans du bouillon TSBYe supplémenté avec du Cm (10 µg/ ml) et dans du bouillon TSBYe sans antibiotique pour le mutant *ΔtagO1tagO2*.

Les cultures ont ensuite été incubées à 30°C sous agitation (200 tr/ min). Après 24 h d'incubation, les cultures ont été centrifugées (5000g, 10 min) puis lavées avec du milieu MCDB 202 pour éliminer toute trace du bouillon TSBYe. Les cultures ont de nouveau été centrifugées à 5000g pendant 10 min puis le culot a été resuspendu dans du milieu MCDB 202 supplémenté ou non avec les antibiotiques appropriés.

3.2.2 *Etude des bactéries en culture planctonique*

3.2.2.1 *Quantification du ribitol pariétal*

A partir des suspensions des mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1\Delta tagO2$ dans le milieu MCDB 202, des suspensions bactériennes de 30 ml ajustées à 10^7 UFC/ ml ont été réalisées dans du milieu MCDB 202 après lecture de la DO ($DO_{620nm} = 0,15 = 10^8$ UFC/ ml). Elles ont été ensemencées sur milieux gélosés TSAYe supplémentés ou non en Cm (10 μ g/ ml) et IPTG (1mM) à l'aide d'un ensemenceur spirale puis un dénombrement a été effectué après 24 h d'incubation à 30°C. Les cultures ajustées à 10^7 UFC/ ml ont été incubées sous agitation à 30°C. Après 3 h et 48 h d'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 6000g pendant 10 min. Les culots cellulaires ont été lavés 3 fois avec de l'eau distillée stérilisée, puis les cellules ont été lyophilisées. Deux milligrammes de cellules ont été pesés puis 20 μ l d'étalon interne standard (Inositol à 180 μ g/100 μ l) et 100 μ l d'acide hydrofluorique (HF) ont été ajoutés à l'échantillon puis incubés à 4°C pendant 48 h afin d'hydrolyser les liaisons phosphodiester. Le ribitol et l'inositol ont été identifiés par la technique de GC-MS en tant qu'alditol acétates suivant le protocole décrit dans le paragraphe 1.2.4.1. La quantification de ribitol a été réalisée en établissant un rapport avec l'étalon interne.

3.2.2.2 *Caractérisations cellulaires des mutants*

Les mesures du caractère hydrophobe/hydrophile, du potentiel électrostatique et les observations de la morphologie bactérienne ont été réalisées comme décrit dans les paragraphes 2.2.2.2, 2.2.2.3 et 2.2.2.4.

3.2.2.3 *Cinétique de la croissance bactérienne en culture planctonique*

La cinétique de croissance bactérienne en culture planctonique a été réalisée comme décrit dans le paragraphe 2.2.2.5.

Tableau 12 : Conséquence de l'expression des gènes *lmo2537* et *tagO1 tagO2* sur la quantité d'acides téichoïques pariétaux après 3h et 48h d'incubation dans du milieu MCDB 202 à 30°C.

Souches	Quantité de ribitol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de cellules ¹) \pm IC ²			
	3h		48h	
	Sans IPTG	Avec IPTG	Sans IPTG	Avec IPTG
EGD-e	16,84 \pm 4,16	ND	8,11 \pm 4,16	ND
Δ <i>lmo2537</i>	1,53 \pm 5,8	20,23 \pm 5,8	0,27 \pm 5,8	9,20 \pm 5,8
Δ <i>tagO1tagO2</i>	ND	ND	5,00	20,0

¹: Poids sec des cellules lyophilisées

²: Intervalle de confiance calculé sur trois mesures indépendantes obtenues à partir d'une même préparation de cellules lyophilisées

3.2.3 Etude de la formation des biofilms et de leurs résistances à un flux laminaire

Les protocoles utilisés pour l'étude de l'adhésion à la formation des biofilms bactériens sont ceux décrits dans les paragraphes 2.2.3.4, 2.2.3.5, 2.2.3.6 et 2.2.4 ainsi que le paragraphe 2.2.5 pour l'application d'un flux laminaire à un débit de 40Pa.

3.3 Analyses statistiques

Des analyses de variance ont été effectuées pour déterminer les différences significatives. Tous les calculs ont été traités avec le logiciel Statgraphics centurion XVI (Sigma plus, Paris, France). La signification statistique a été évaluée à $P < 0,05$ avec P la probabilité limite sous l'hypothèse nulle.

3.4 Résultats

3.4.1 Caractérisations phénotypiques des bactéries

3.4.1.1 Quantification du ribitol pariétal

Le rôle des gènes *lmo2537*, *tagO1* et *tagO2* dans la synthèse des acides téichoïques a été confirmé par la détermination des quantités de ribitol présent dans les parois des mutants et de la souche sauvage EGD-e (tableau 12). Après une incubation de 3 h dans le milieu MCDB 202, la souche sauvage EGD-e contenait 16,84 µg de ribitol par milligramme de cellules. En présence de l'inducteur IPTG, la quantité de ribitol pariétal du mutant $\Delta lmo2537$ était similaire à celle de la souche sauvage EGD-e (20,23 µg par mg de cellules). Par contre, en l'absence de l'inducteur IPTG, une diminution significative des quantités de ribitol pariétal du mutant $\Delta lmo2537$ a été observée (1,53 µg/mg de cellules) ($p < 0,05$).

Les quantités de ribitol pariétal ont diminué de moitié dans la souche sauvage EGD-e comme pour le mutant $\Delta lmo2537$ en présence de l'inducteur IPTG entre les analyses après 3 h

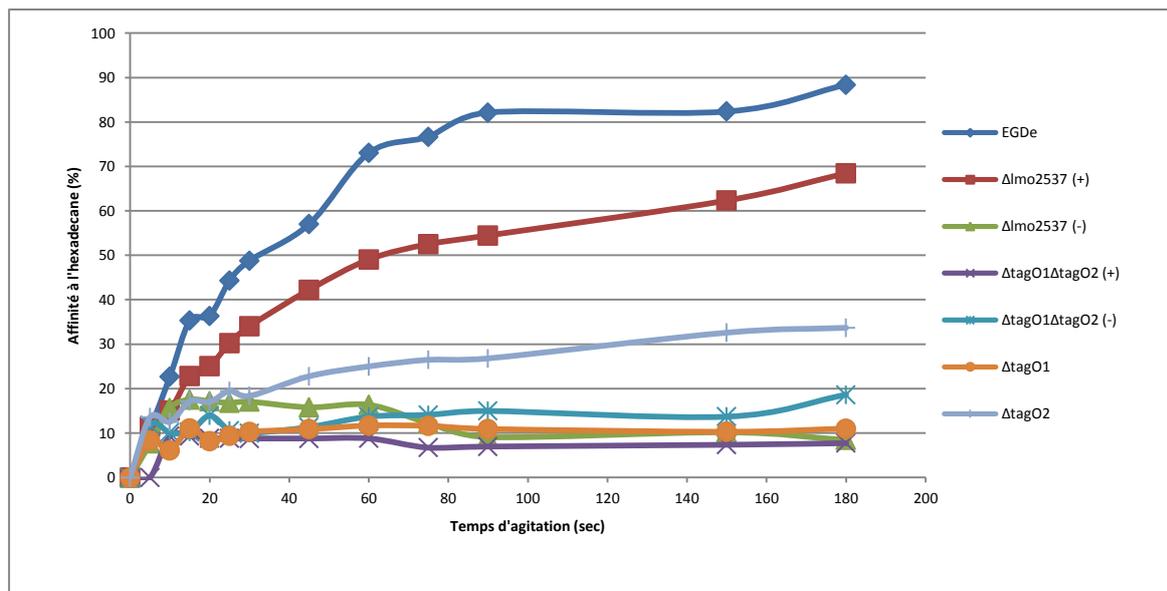


Figure 47 : Affinité à l'hexadécane des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 après 3h d'incubation à 30°C (n = 3).

Tableau 13 : Mobilité électrophorétique et potentiel zéta à pH 7 des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 après 3h d'incubation à 30°C (n = 3).

Souches	Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m/s/V/cm}$)	Ecart type	Potentiel zéta (mV)	Ecart type
EGD-e	-2,86	0,08	-38,99	0,96
$\Delta tagO1tagO2$ (+)	-2,59	0,12	-33,51	0,39
$\Delta tagO1tagO2$ (-)	-2,61	0,07	-35,58	0,97
$\Delta tagO1$	-2,9	0,07	-39,61	0,92
$\Delta tagO2$	-2,69	0,11	-37,04	0,29
$\Delta lmo2537$ (+)	ND ¹	ND	ND	ND
$\Delta lmo2537$ (-)	ND	ND	ND	ND

¹ : Non déterminé

d'incubation et celles après 48 h d'incubation. Par contre, en l'absence de l'inducteur IPTG, la quantité de ribitol pariétal était proche de 0 pour le mutant *Δlmo2537*. Des observations similaires, après 48 h d'incubation, ont été faites avec le mutant *ΔtagO1tagO2* avec 4 fois moins de ribitol en l'absence de l'inducteur IPTG versus en présence de l'inducteur IPTG.

3.4.1.2 *Mesure du caractère hydrophobe/hydrophile des surfaces bactériennes*

Le caractère hydrophobe/ hydrophile des cultures bactériennes a été mesuré sur des cultures planctoniques des souches mutantes *Δlmo2537* et *ΔtagO1tagO2* cultivées en présence ou en l'absence de l'inducteur IPTG ainsi que pour les simples mutants *ΔtagO1* et *ΔtagO2* et la souche sauvage EGD-e (Figure 47). L'affinité à l'hexadécane de la souche sauvage EGD-e était de 0% à t = 0 et de 88,37 % après 180 secondes d'agitation (-R0 = -0,28). Pour le mutant *Δlmo2537* cultivé en présence de l'inducteur IPTG, l'affinité au solvant augmentait, de façon similaire à la souche sauvage EGD-e, avec un passage de 0% à t = 0 à 68,46 % après 180 secondes d'agitation (-R0 = -0,90). Par contre, en l'absence de l'inducteur IPTG, l'affinité du mutant *Δlmo2537* à l'hexadécane restait faible (0% à t = 0 à 8,42 % après 180 secondes d'agitation) (-R0 = -0,28). Le mutant *ΔtagO1tagO2* avait une faible affinité à l'hexadécane qu'il soit cultivé en présence ou non de l'inducteur IPTG (-R0 = -0,18 et -0,14). Pour les mutants *ΔtagO1* et *ΔtagO2*, l'affinité au solvant était faible (-R0 = -0,17 et -0,40).

3.4.1.3 *Mesure du potentiel électrostatique*

La charge électrique des cellules bactériennes a été caractérisée par le potentiel zéta. La mobilité électrophorétique de la souche sauvage EGD-e ainsi que les simples mutants *ΔtagO1* et *ΔtagO2* indiquaient un caractère négatif à pH=7 avec des valeurs légèrement plus basses (-35,58 mV et -33,51 mV) pour le mutant *ΔtagO1tagO2* cultivé en présence ou en absence de l'inducteur IPTG (Tableau 13).

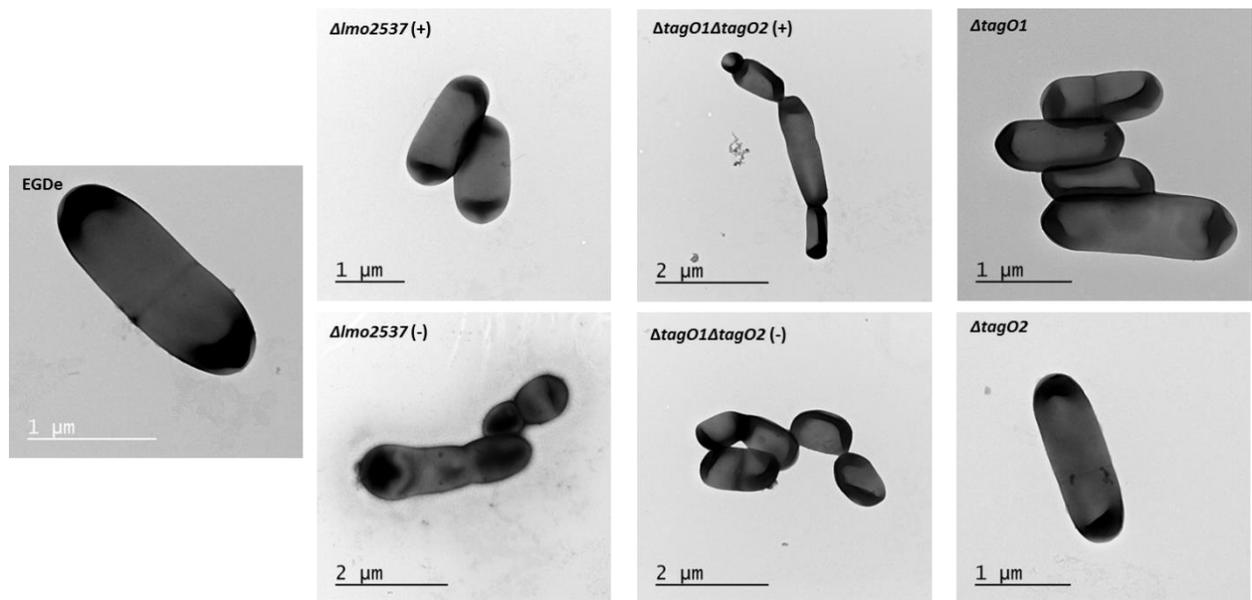


Figure 48 : Observations par microscopie électronique en transmission des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1\Delta tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 après 3h d'incubation à 30°C.

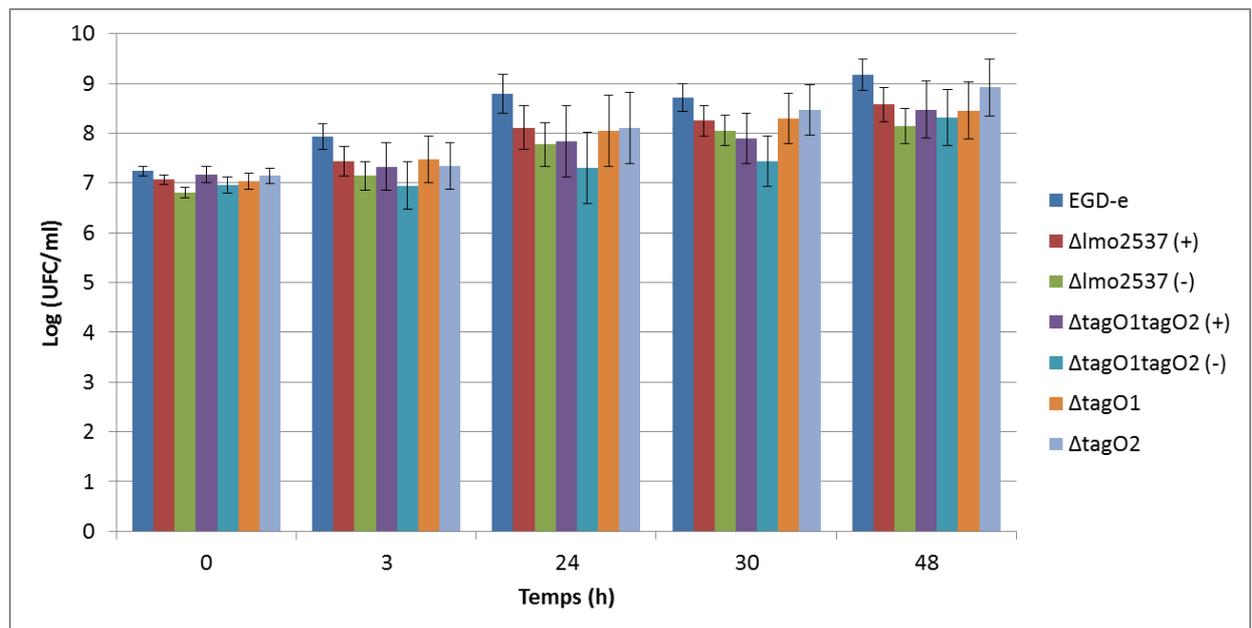


Figure 49 : Suivi de croissance des cultures planctonique des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1\Delta tagO2$ cultivés dans le milieu MCDB 202 avec (+) ou sans (-) IPTG. (EGD-e : n = 10, $\Delta lmo2537 (+)$ et (-) n = 8, $\Delta tagO1tagO2 (+)$ et (-), $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ n = 3).

3.4.1.4 *Morphologie des cellules bactériennes*

La morphologie des mutants a été comparée à celle de la souche sauvage EGD-e par microscopie électronique en transmission (Figure 48). Les cellules de la souche sauvage étaient des bacilles de 2 μm de long et 0,67 μm de large avec la présence d'un septum et une paroi cellulaire lisse, rigide et régulière. Lorsqu'il était cultivé en présence de 1 mM de l'inducteur IPTG, le mutant $\Delta\text{Imo2537}$ avait une morphologie similaire à la souche sauvage EGD-e. Par contre, en l'absence de l'inducteur IPTG, ce même mutant avait une morphologie modifiée avec une forme de bacilles de différente taille qui ont une paroi cellulaire irrégulière et comme « ramollie », et de nombreuses bactéries vraisemblablement bloquées au cours de la division cellulaire. Des observations similaires ont été faites avec le double mutant $\Delta\text{tagO1tagO2}$ cultivé en l'absence de l'inducteur IPTG. Cependant, il semble que les cultures de ce mutant en présence d'IPTG ne restaurent pas le phénotype sauvage. Les mutants ΔtagO1 et ΔtagO2 avaient une morphologie cellulaire similaire à celle de la souche sauvage EGD-e.

3.4.2 *Suivi de croissance bactérienne*

Un suivi de croissance a été réalisé par dénombrement sur milieux gélosés des cultures planctoniques ajustées à 10^7 UFC/ ml dans le milieu MCDB 202 à 30°C pendant 48 h (Figure 49). L'ensemble des souches est restés viable cultivable dans le milieu de culture durant les 48 h. La population bactérienne de la souche sauvage EGD-e a augmenté de 1,77 log UFC/ ml entre $t = 0$ et $t = 24$ h, et ensuite la population était restée à niveau constant jusqu'à $t = 48$ h. Une augmentation significative d'1 log UFC/ ml de la population du mutant $\Delta\text{Imo2537}$ cultivée en présence et en l'absence de l'inducteur IPTG a également été observée entre $t = 0$ et $t = 24$ h. En l'absence de l'inducteur IPTG, la population du mutant $\Delta\text{Imo2537}$ était significativement plus faible que la population de la souche sauvage EGD-e à $t = 24$ h.

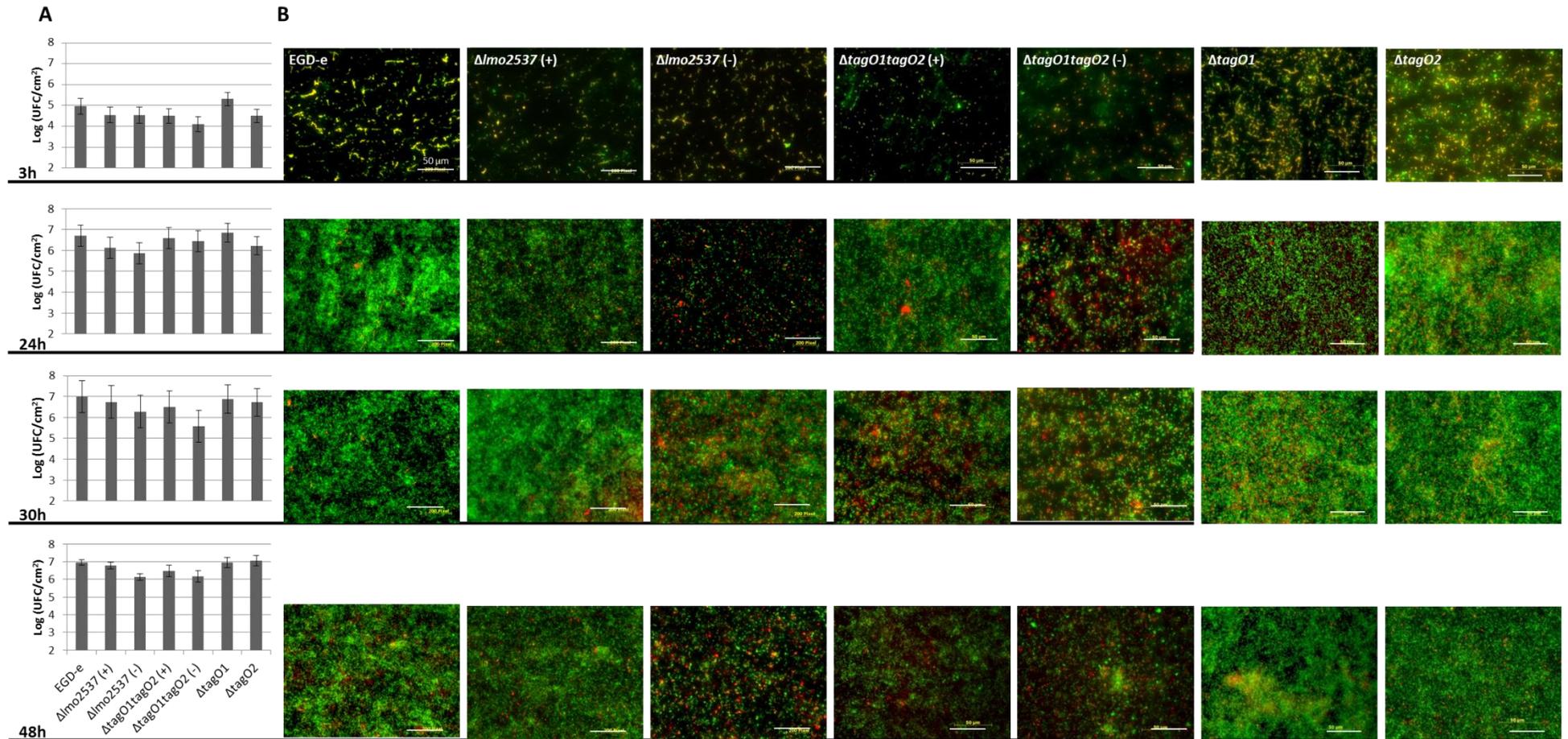


Figure 50 : Cinétique de formation des biofilms mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ cultivés en présence (+) ou en l'absence (-) d'IPTG et de la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable dans le milieu MCDB 202 à 30°C durant 48h A) Dénombrement sur milieux gélosés de la population de cellules viables cultivables à t= 3 h ; 6 h, 24 h, 30 h et 48 h B) Observations par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des cellules à t= 3 h ; 6 h, 24 h, 30 h et 48 h. Les barres blanches représentent l'échelle à 50 μm . Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance (3h : EGD-e et $\Delta lmo2537 (+)$ et (-) n = 5, $\Delta tagO1tagO2 (+)$ et (-), $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ n = 6 ; 24h et 30h : n = 4 ; 48h : EGD-e : n = 25, $\Delta lmo2537 (+)$ et (-) n = 13, $\Delta tagO1tagO2 (+)$ et (-), $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ n = 6).

Après 30 h d'incubation dans le milieu MCDB 202, les populations bactériennes du mutant $\Delta lmo2537$ cultivées en présence et en l'absence de l'inducteur IPTG étaient restées stables (environ 8,2 log UFC/ ml).

La population du mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé en présence ou en absence de l'inducteur IPTG n'a pas augmenté significativement entre $t = 0$ et $t = 30$ h. A 48 h, la population en présence ou en absence de l'inducteur IPTG n'était pas significativement différente de celle de la population de la souche sauvage EGD-e ($P < 0,05$).

Une augmentation significative des populations pour les mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ a également été observée entre $t = 0$ et $t = 24$ h de 1,01 à 0,96 log UFC/ ml ($P < 0,05$). Après 30 h d'incubation dans le milieu MCDB 202, les populations bactériennes étaient de 8,45 et 8,92 log UFC/ml.

3.4.3 Etude de l'adhésion bactérienne à la formation du biofilm

Des quantifications de la population viable cultivable (VC) ont été réalisées de l'étape d'adhésion ($t = 3$ h) jusqu'à la formation d'un biofilm mature ($t = 48$ h) avec en parallèle, des observations microscopiques en épifluorescence avec la coloration Live/Dead® Bac Light™ (Figure 50).

En phase d'adhésion à $t = 3$ h, la souche sauvage EGD-e avait une population de cellules VC adhérentes de 4,96 log UFC/ cm^2 . Le mutant $\Delta lmo2537$ cultivé en présence ou en l'absence de l'inducteur IPTG, le double mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé en présence de l'inducteur IPTG et les simples mutants $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ avaient des populations adhérentes significativement identiques à celle de la souche sauvage EGD-e ($P > 0,05$). Par contre, en l'absence de l'inducteur IPTG, la population adhérente du double mutant $\Delta tagO1tagO2$ était

significativement inférieure à celle de la souche sauvage EGD-e. (0,86 log UFC/ cm² de différence). Les observations avec le colorant Live/Dead® Bac Light™ ont permis de confirmer que toutes les souches étudiées étaient capables d'adhérer à l'acier inoxydable principalement en cellules isolées. Des différences étaient visibles dans la densité cellulaire qui apparaissait plus importante avec la souche sauvage EGD-e et les simples mutants *ΔtagO1*, *ΔtagO2*. La viabilité des cellules n'a pas pu être déterminée du fait d'une coloration simultanée des cellules en rouge et vert.

A t = 24 h, il n'y avait aucune différence significative entre les populations des biofilms de la souche sauvage EGD-e (6,71 log UFC/ cm²), le mutant *ΔtagO1tagO2* cultivé avec et sans l'inducteur IPTG ainsi que les simples mutants *ΔtagO1* et *ΔtagO2* (de 6,23 à 6,85 log UFC/ cm²) et le mutant *Δlmo2537* en présence de l'inducteur IPTG. Par contre, le mutant *Δlmo2537* cultivé en l'absence de l'inducteur IPTG avait une population significativement plus basse que la population de la souche sauvage EGD-e avec 5,86 log UFC/ cm² ($P < 0,05$). Les observations avec le colorant Live/Dead® Bac Light™ ont permis de mettre en évidence que la souche sauvage EGD-e formait un biofilm avec un tapis cellulaire dense réparti de manière assez uniforme sur l'acier inoxydable avec des petits agrégats cellulaires. Des architectures similaires ont été observées pour l'ensemble des biofilms pour tous les mutants étudiés. Par contre, la densité cellulaire des biofilms formés par les mutants *Δlmo2537* et *ΔtagO1tagO2* cultivés sans l'inducteur IPTG apparaissait moins importante avec toutefois plus de cellules mortes que dans les autres conditions.

A t = 30 h, aucune différence significative n'était visible entre les populations des biofilms de la souche sauvage EGD-e, le mutant *Δlmo2537* cultivé avec et sans l'inducteur IPTG ainsi que les simples mutants *ΔtagO1* et *ΔtagO2* et le mutant *ΔtagO1tagO2* cultivé en

présence de l'inducteur IPTG. Par contre, le mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé en l'absence de l'inducteur IPTG avait une population significativement plus basse que la population de la souche sauvage EGD-e avec $5,57 \log \text{ UFC/ cm}^2$ ($P < 0,05$). Les observations avec le colorant Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 30 h étaient identiques aux observations des biofilms de 24 h pour la souche sauvage EGD-e, les simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ et le mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec de l'inducteur IPTG. Par contre, les biofilms du mutant $\Delta lmo2537$ cultivé sans l'inducteur IPTG étaient plus denses qu'après 24 h d'incubation avec une population de cellules mortes plus importantes. Concernant le double mutant $\Delta tagO1tagO2$, les biofilms présentaient une architecture similaire qu'il y ait présence ou non de l'inducteur IPTG avec une proportion importante de cellules mortes.

A $t = 48$ h, aucune différence significative n'était visible entre les populations des biofilms de la souche sauvage EGD-e ($6,95 \log \text{ UFC/ cm}^2$) et les simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ (de $6,95$ et $7,05 \log \text{ UFC/ cm}^2$), et les mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés en présence de l'inducteur IPTG. Les mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés en l'absence de l'inducteur IPTG avaient des populations significativement plus basses que la population de la souche sauvage EGD-e ($6,14$ et $6,17 \log \text{ UFC/ cm}^2$) ($P < 0,05$). Concernant les observations microscopiques, les biofilms de la souche sauvage EGD-e, du mutant $\Delta lmo2537$ cultivés avec l'inducteur IPTG et du mutant $\Delta tagO2$ avaient une architecture similaire aux observations faites à 24 h. Par contre, de grosses micro-colonies sont apparues dans les biofilms du mutant $\Delta tagO1$. Concernant le mutant $\Delta lmo2537$, les biofilms cultivés sans l'inducteur IPTG sont apparus beaucoup moins denses que celui de la souche sauvage EGD-e avec une population de cellules mortes plus importantes. Concernant le double mutant $\Delta tagO1tagO2$, le biofilm cultivé en présence de l'inducteur IPTG était moins dense que le biofilm de la souche sauvage EGD-e. En l'absence de l'inducteur IPTG, les biofilms du

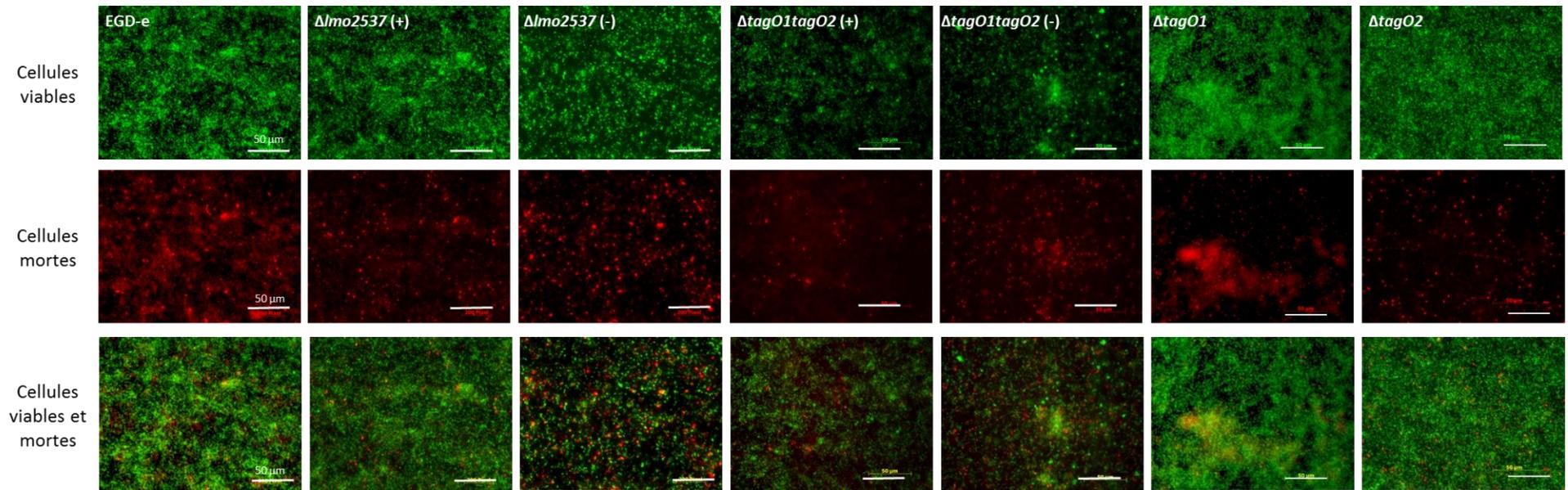


Figure 51 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 sur acier inoxydable à 30°C.

double mutant $\Delta tagO1tagO2$ étaient également moins denses avec de nombreuses micro-colonies visibles et une population importante de cellules mortes.

Ces résultats de cinétique ont été confirmés par des observations par microscopie en épifluorescence après coloration en OA des bactéries adhérentes (Annexe 14)

3.4.4 *Caractérisation des biofilms matures de 48 h*

3.4.4.1 *Etude de l'architecture des biofilms de 48 h par microscopie optique en épifluorescence*

Les observations réalisées avec les différents colorants (Live/ Dead® Bac Light™, DAPI et OA) ont donné des informations complémentaires. En effet, le colorant Live/ Dead® Bac Light™ est plutôt utilisé pour observer la viabilité cellulaire, le colorant DAPI pour visualiser les cellules bactériennes et leur répartition sur le matériau alors que le colorant OA sert pour observer la biomasse (cellules +matrice extracellulaire).

Nous avons présenté les photographies qui permettent de visualiser la coloration avec le syto 9 et avec l'iodure de propidium et la photographie combinée des deux observations (Figure 51). Pour la souche sauvage EGD-e, nous avons 2 populations de cellules (mortes et viables) isolées réparties assez uniformément sur la surface et formant deux tapis cellulaires denses. Pour les autres mutants et les autres conditions de culture, les quantités de cellules viables apparaîtraient en plus grande quantité par rapport aux cellules mortes. De plus, les cellules mortes étaient plutôt soit en cellules isolées soit réparties à la périphérie des agrégats bactériens pour le double mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec l'inducteur IPTG et le simple mutant $\Delta tagO1$.

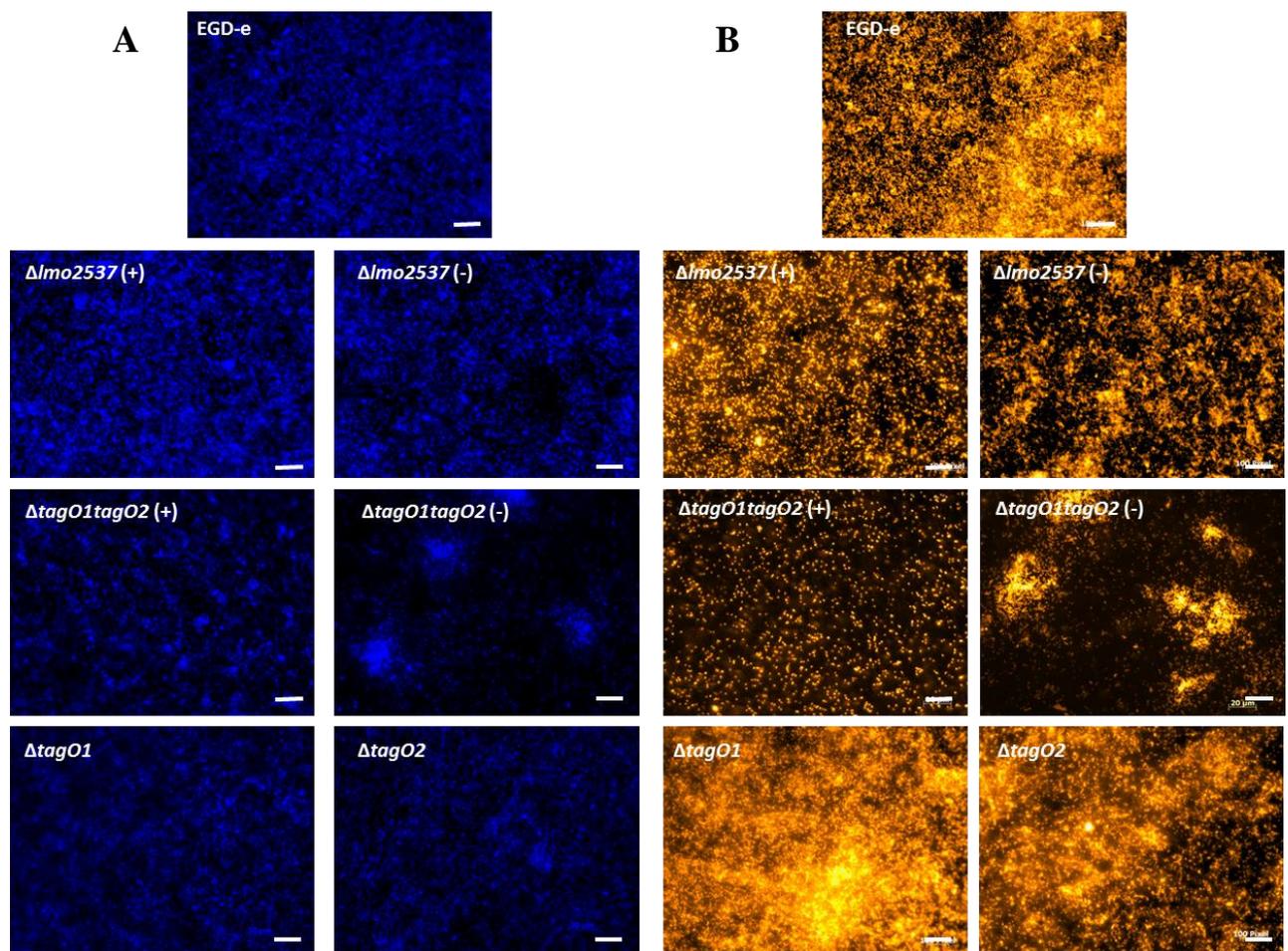


Figure 52 : Observations par microscopie en épifluorescence après coloration au DAPI (A) et à l'orangé d'acridine (B) des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 sur acier inoxydable à 30°C. Les barres blanches représentent l'échelle à 20 μm .

Nous avons observé la biomasse (cellules + matrice) des biofilms de 48 h par microscopie en épifluorescence après coloration à l'OA (Figure 52). Les architectures des biofilms étaient proches de celles observées avec la coloration Live/ Dead® Bac Light™ mais elle a permis de visualiser en plus des agrégats bactériens avec la présence de matrice extracellulaire. La souche sauvage EGD-e et le mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec de l'inducteur IPTG formaient des biofilms avec une architecture en tapis cellulaire dense réparti de manière assez uniforme sur l'acier inoxydable avec des petits amas cellulaires et de la matrice extracellulaire. Par contre, pour le mutant $\Delta lmo2537$ cultivé sans l'inducteur IPTG, il y avait la formation de petites micro-colonies composées de cellules bactériennes et de matrice extracellulaire. Le double mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec de l'inducteur IPTG faisait des biofilms avec une architecture en tapis cellulaire moins dense que la souche sauvage EGD-e. En l'absence de l'inducteur IPTG, le biofilm de ce mutant était composé de nombreuses micro-colonies. Concernant les simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$, les biofilms présentaient une forte densité cellulaire similaire à celle de la souche sauvage avec une architecture en tapis cellulaire réparti de manière assez uniforme sur l'acier inoxydable avec des amas cellulaires et de la matrice extracellulaire.

3.4.4.2 *Etude de l'architecture des biofilms de 48 h par microscopie électronique à balayage*

Pour compléter les analyses réalisées par microscopie optique, des observations ont été réalisées par microscopie électronique à balayage (MEB) pour la visualisation en relief des bactéries isolées ou regroupées (amas, agrégats, micro-colonies) (Figure 53). Un tapis de cellules isolées réparties de manière assez uniforme sur la surface a été observé, de l'acier inoxydable était visible, pour les biofilms de 48 h de la souche sauvage EGD-e, du mutant $\Delta tagO2$ et pour les mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés en présence de l'inducteur IPTG mais en densité cellulaire moins élevée. Par contre, pour ces deux derniers mutants en

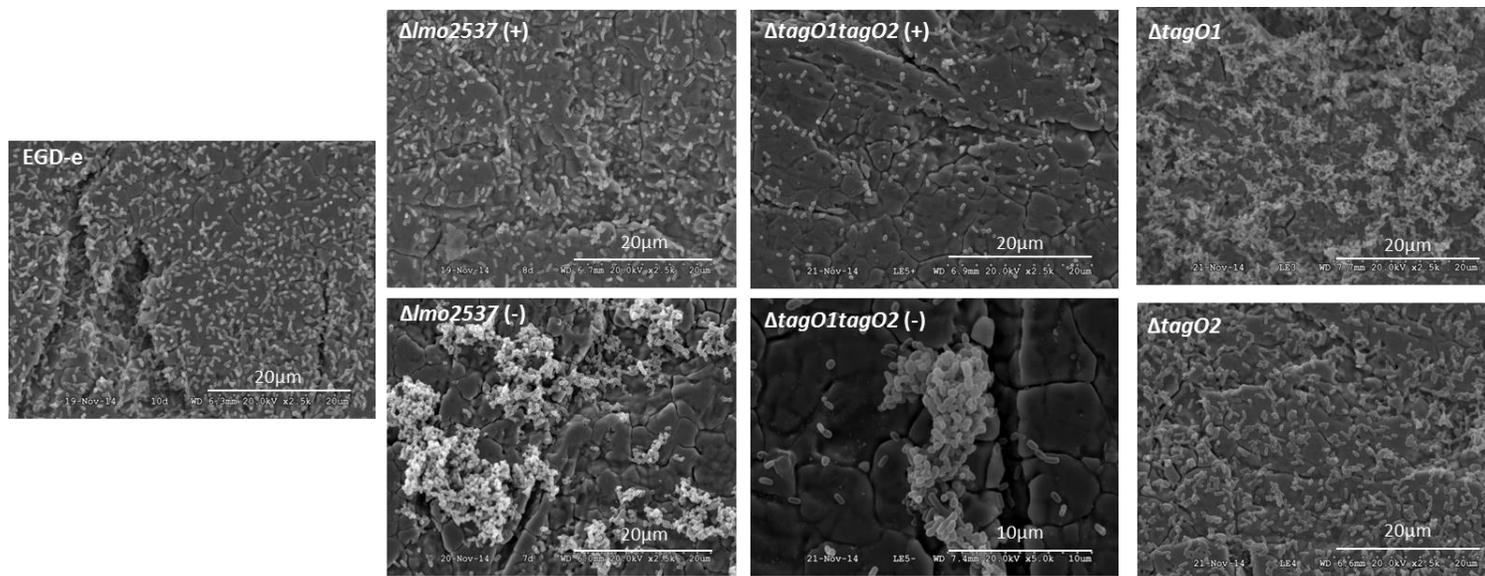


Figure 53 : Observations par microscopie électronique à balayage des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 sur acier inoxydable à 30°C.

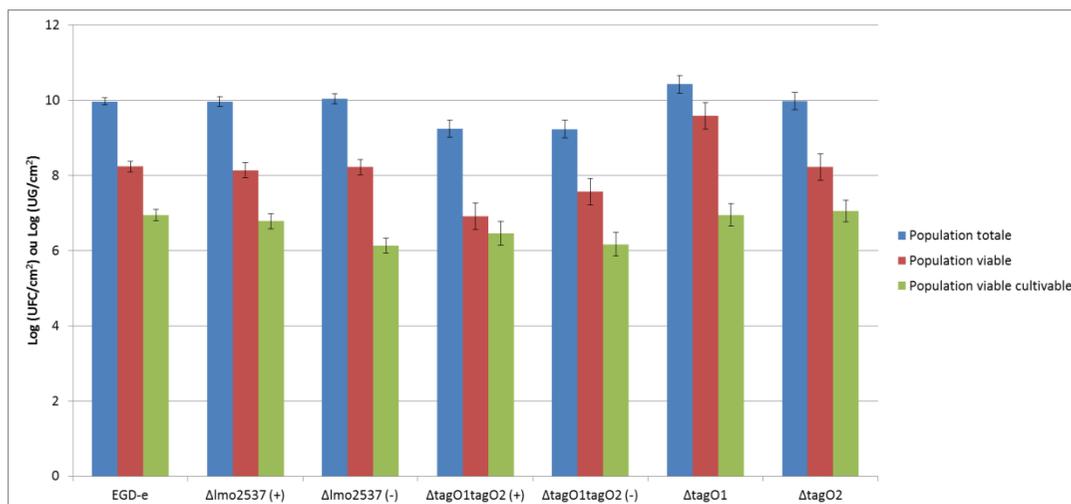


Figure 54 : Quantification des populations totales, viables et viables cultivables des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 sur acier inoxydable à 30°C (VC : EGD-e : n = 25, $\Delta lmo2537 (+)$ et $(-)$ n = 13, $\Delta tagO1tagO2 (+)$ et $(-)$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ n = 6 ; PMAqPCR et qPCR: EGD-e : n = 24, $\Delta lmo2537 (+)$ et $(-)$ n = 12, $\Delta tagO1tagO2 (+)$ et $(-)$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ n = 5)

l'absence de l'inducteur IPTG, nous avons observé la présence de nombreuses micro-colonies ainsi que des cellules isolées réparties sur tout le matériau de façon assez uniforme ce qui a confirmé les observations par microscopie en épifluorescence. Pour le mutant $\Delta tagO1$, nous avons observé un tapis d'agrégats de cellules reliées entre elles comme un réseau « connecté » réparti sur tout le matériau assez uniformément. De la matrice extracellulaire était également visible.

3.4.4.3 *Dénombrement de la population viable et de la population totale des biofilms de 48 h*

Des quantifications des populations viables (VC et VNC) et totales (VC, VNC et mortes) des biofilms de 48 h ont été réalisées par PMA-qPCR et qPCR puis comparées aux populations de cellules VC quantifiées précédemment dans les biofilms de 48 h (Figure 54). La population totale quantifiée par qPCR dans les biofilms de 48 h de la souche de référence EGD-e était similaire aux populations totales quantifiées dans les biofilms de 48 h formés par les mutants $\Delta lmo2537$ cultivés avec ou sans l'inducteur IPTG et les simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ ($P > 0,05$). Par contre, la population totale du double mutant $\Delta tagO1tagO2$ était significativement plus basse par rapport à la population totale du biofilm de la souche sauvage EGD-e (perte de 0,73 log UG/ cm²).

Pour les populations viables quantifiées par PMA-qPCR, elles étaient similaires entre la souche sauvage EGD-e et le mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec ou sans l'inducteur IPTG et le mutant $\Delta tagO2$. Concernant le double mutant $\Delta tagO1tagO2$, la population viable était significativement réduite lorsque le mutant était cultivé avec ou sans l'inducteur IPTG ($P < 0,05$). Le mutant $\Delta tagO1$ avait une population viable présente dans ces biofilms significativement plus importante par rapport à la souche sauvage EGD-e (9,58 log UG/ cm²).

Concernant les populations VC, l'ensemble des mutants avait une population VC similaire à celle de la souche sauvage sauf pour les mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés sans l'inducteur IPTG qui avaient des populations VC significativement plus faibles ($P < 0,05$).

Les différences de populations obtenues entre les 3 méthodes de quantifications (qPCR, PMA-qPCR et gélose) ont permis de montrer la présence de populations VC, VNC et mortes dans les biofilms de 48 h formés par toutes les souches étudiées. Il y avait un écart (environ $1,30 \log \text{UG/ cm}^2$) entre la quantification effectuée par PMA-qPCR et le dénombrement sur milieux gélosés ce qui montre la présence d'une population de VNC dans les biofilms de la souche sauvage EGD-e, du simple mutant $\Delta tagO2$, double mutant $\Delta tagO1tagO2$ sans l'inducteur IPTG et du mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec l'inducteur IPTG. Elle était significativement supérieure à celle de la souche sauvage dans les cultures du mutant $\Delta lmo2537$ sans l'inducteur IPTG ($2,09 \log \text{UG/ cm}^2$) ($P < 0,05$). Concernant le double mutant $\Delta tagO1tagO2$, la population VNC était quasiment nulle dans les biofilms cultivés avec l'inducteur IPTG. Par contre, le simple mutant $\Delta tagO1$ avait une proportion de cellules VNC significativement plus élevée par rapport à la souche sauvage EGD-e ($P < 0,05$) et aux autres mutants.

La différence ($1,73 \log \text{UG/ cm}^2$) entre la quantification effectuée par qPCR et par PMA-qPCR a permis de montrer la présence d'une population morte pour la souche sauvage EGD-e. La quantité de cellules mortes était similaire entre les biofilms de la souche sauvage EGD-e et ceux des mutants $\Delta tagO2$, $\Delta lmo2537$ cultivé avec et sans l'inducteur IPTG et le $\Delta tagO1tagO2$ cultivé sans l'inducteur IPTG. Par contre, lorsqu'il était cultivé avec de l'inducteur IPTG, le biofilm du double mutant $\Delta tagO1tagO2$ avait une population de cellules

Tableau 14 : Quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG dans le milieu MCDB 202 sur acier inoxydable à 30°C.

Souches	ADNe ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm IC ^A	Protéine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm IC ^B	Glucides ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm IC ^C
EGD-e	4,09 \pm 0,77	1,56 \pm 0,20	7,64 \pm 1,98
$\Delta lmo2537$ (+)	3,38 \pm 0,77	1,06 \pm 0,20	3,52 \pm 1,98
$\Delta lmo2537$ (-)	ND ^D	ND	ND
$\Delta tagO1\Delta tagO2$ (+)	2,47 \pm 0,77	0,25 \pm 0,20	3,45 \pm 1,98
$\Delta tagO1\Delta tagO2$ (-)	2,11 \pm 0,77	0,36 \pm 0,20	5,24 \pm 1,98
$\Delta tagO1$	3,45 \pm 0,77	0,90 \pm 0,20	5,01 \pm 1,98
$\Delta tagO2$	3,44 \pm 0,77	0,99 \pm 0,20	5,51 \pm 1,98

^A: Intervalle de confiance n = 6

^B: Intervalle de confiance n = 10

^C: Intervalle de confiance n = 9

^D: Non déterminé

mortes significativement supérieure par rapport à la souche sauvage EGD-e ($P < 0,05$). Au contraire, cette proportion de cellules mortes était significativement plus basse dans les biofilms du mutant $\Delta tagO1$ ($P < 0,05$).

3.4.4.4 *Quantification de la matrice extracellulaire*

La quantification des composants de la matrice extracellulaire (ADNe, protéines et glucides) a permis de montrer que le composé majoritaire était les glucides puis l'ADNe et en dernier les protéines pour toutes les souches étudiées (Tableau 14). Le composant majoritaire de la matrice extracellulaire des biofilms de la souche sauvage EGD-e était les glucides avec une concentration de $7,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ suivi de l'ADNe avec une concentration de $4,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ puis des protéines avec une concentration de $1,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les composants de la matrice extracellulaire des biofilms du mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec l'inducteur IPTG étaient significativement identiques par rapport à la souche sauvage EGD-e sauf pour les glucides qui étaient 2 fois moins concentrés. Le double mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec ou sans de l'inducteur IPTG avait également une quantité moins importante de protéines, de glucides et d'ADNe par rapport à la souche sauvage EGD-e. Concernant les simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$, les quantités de composants extracellulaires étaient significativement identiques par rapport au double mutant $\Delta tagO1tagO2$.

3.4.5 *Résistance des biofilms matures de 48 h à des flux laminaires*

3.4.5.1 *Population résiduelle après un flux d'eau laminaire*

Afin d'évaluer leur résistance à un décrochage mécanique, les biofilms de 48 h formés par la souche sauvage EGD-e et les mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ ont été soumis à un flux d'eau à température ambiante avec une contrainte de 40 Pa. (Figure 55). Ensuite, les populations résiduelles VC, viables et totales ont été quantifiées (Figure 55A).

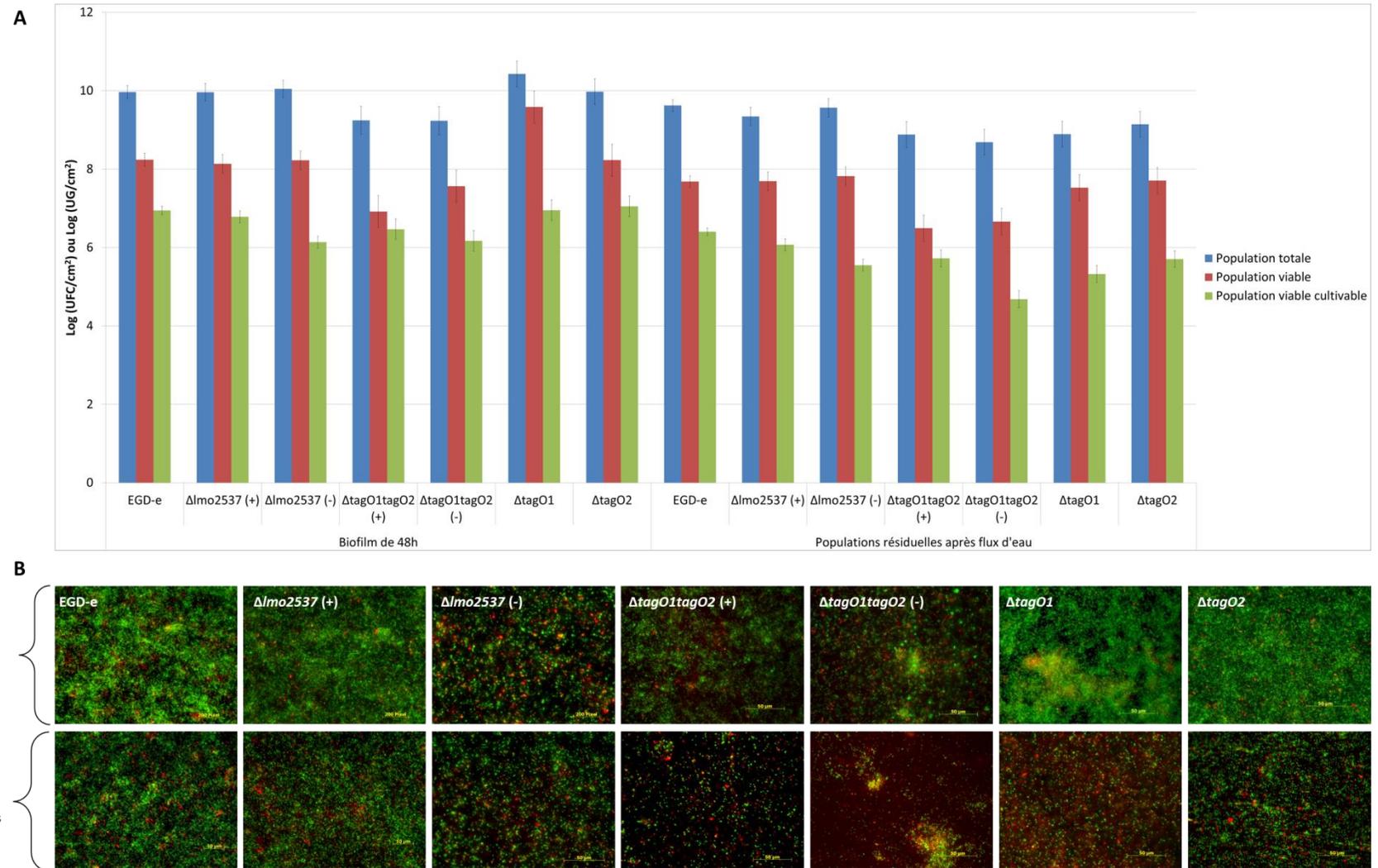


Figure 55 : Résistance des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 à un flux d'eau à un débit de 40 Pa. A) Dénombrement des populations résiduelles totales, viables et viables cultivables. B) Observations microscopiques des populations résiduelles après coloration au Live/Dead® Bac Light™. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. EGD-e : n = 24, $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG n = 12.

La quantification réalisée par qPCR a montré que la population totale des biofilms de la souche sauvage EGD-e et du mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec ou sans l'inducteur IPTG n'était pas décrochée par le flux d'eau. Par contre, il y avait une diminution significative (entre 1,6 log UG/ cm² et 0,8 log UG/ cm²) de la population totale pour les biofilms des mutants $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$, $\Delta tagO1tagO2$ cultivés avec ou sans l'inducteur IPTG ($P < 0,05$).

La population viable (VC et VNC) du biofilm de la souche sauvage EGD-e n'était pas significativement différente avant et après passage du flux d'eau. Des observations similaires ont été faites sur les populations viables des biofilms des mutants $\Delta lmo2537$ cultivés avec et sans l'inducteur IPTG, des simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$. Par contre, pour le double mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec ou sans l'inducteur IPTG, il y avait une diminution significative de sa population viable (environ 1 log UG/ cm²) ($P < 0,05$).

La population VC du biofilm de la souche sauvage EGD-e a diminué de 0,56 log UFC/ cm² après le passage du flux d'eau. Les populations VC des biofilms formés par le mutant $\Delta lmo2537$ cultivés avec ou sans l'inducteur IPTG et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés avec l'inducteur IPTG ont subi des pertes similaires (0,71 log UG/ cm², 0,59 log UG/ cm² et 0,74 log UG/ cm²). Par contre, les populations VC des biofilms du double mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivés sans l'inducteur IPTG et des simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ ont subi un décrochage significatif avec une baisse d'environ 1,50 log UFC/ cm² ($P < 0,05$).

La proportion de cellules VNC et de cellules mortes n'est pas apparue significativement affectée par le passage du flux d'eau sur les biofilms de l'ensemble des mutants sauf pour le simple mutant $\Delta tagO2$ où une augmentation significative de cette population a été observée ($P < 0,05$).

Les observations microscopiques étaient en accord avec les données de quantification (Figure 55B). La population totale (vivante et morte) des biofilms résiduels de la souche de référence EGD-e et des mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés avec et sans l'inducteur IPTG avait une très faible diminution de leur densité cellulaire après le passage du flux d'eau. Par contre, les populations totales résiduelles du biofilm des mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ étaient moins importantes après passage du flux d'eau.

Concernant la viabilité, les cellules viables du biofilm de la souche sauvage EGD-e étaient toujours visibles après le passage du flux d'eau dans des proportions quasi similaires comme pour les mutants $\Delta lmo2537$ cultivés avec et sans l'inducteur IPTG, $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec l'inducteur IPTG et $\Delta tagO2$. Par contre, les proportions de cellules dans les biofilms résiduels des mutants $\Delta tagO1tagO2$ cultivés sans l'inducteur IPTG et $\Delta tagO1$ avaient fortement diminué ce qui était en accord avec les données de quantification. Enfin, la coloration rouge des populations résiduelles indiquaient que la densité de cellules mortes n'avait pas été affectée par le passage d'un flux d'eau sur les biofilms de la souche sauvage EGD-e et des mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés avec et sans l'inducteur IPTG et du simple mutant $\Delta tagO2$. Par contre, le biofilm résiduel du mutant $\Delta tagO1$ contenait plus de cellules mortes ce qui était également en accord avec les données de quantification.

3.4.5.2 Population résiduelle après un flux de soude à 0,05%

Afin d'évaluer la résistance à un décrochage mécanique couplé à un traitement chimique, les biofilms de 48 h de la souche sauvage EGD-e et des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ ont été soumis à un flux laminaire d'une solution de soude à 0,05% pendant 10 minutes avec une contrainte de 40 Pa (Figure 56). Ensuite, les populations résiduelles VC, viables et totales ont été quantifiées (Figure 56A).

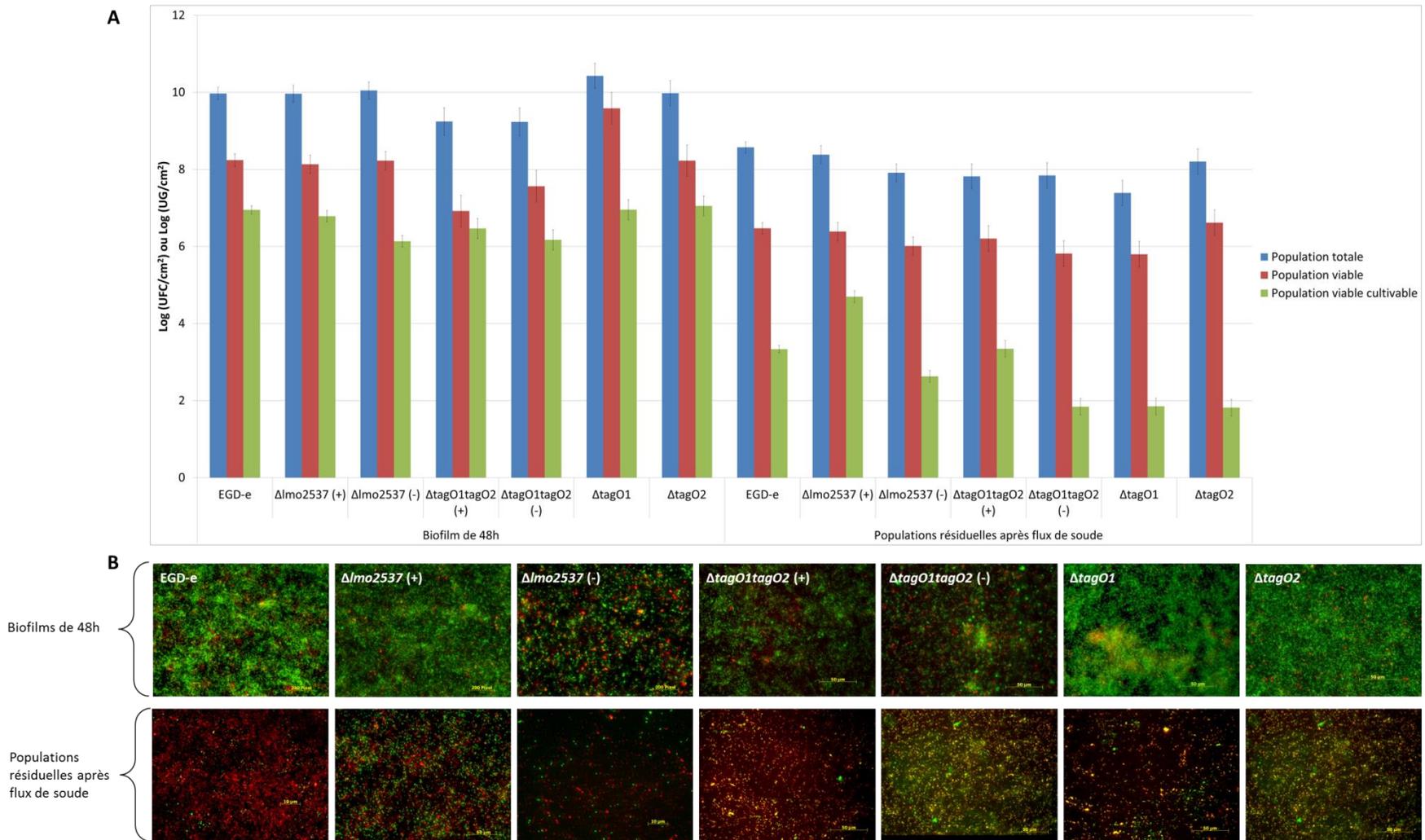


Figure 56 : Résistance des biofilms de 48h des mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 à un flux de soude à un débit de 40 Pa. A) Dénombrement des populations résiduelles totales, viable et viable cultivable. B) Observations microscopiques des populations résiduelles après coloration au Live/Dead® Bac Light™. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. EGD-e : n = 24, $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ cultivés avec (+) ou sans (-) IPTG n = 12.

Une partie de la population totale (qPCR) des biofilms de la souche sauvage EGD-e a été décrochée par le flux de soude avec une diminution de 1,40 log UG/ cm². Pour les autres souches étudiées, il y avait également une baisse significative de la population totale résiduelle allant de 1,39 log UG/ cm² à 3,04 log UG/ cm² ($P < 0,05$).

Les populations viables résiduelles (VC et VNC) des biofilms de la souche sauvage EGD-e ont également diminué significativement de 1,77 log UG/ cm² comme pour les autres souches étudiées (1,61 à 3,79 log UG/ cm²) ($P < 0,05$).

Des diminutions significatives ont également été observées pour les populations VC de la souche sauvage EGD-e et des mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ cultivés avec l'inducteur IPTG (2,09 à 3,61 log UFC/ cm²) ($P < 0,05$). Cultivé sans l'inducteur IPTG, les mutants $\Delta lmo2537$ et $\Delta tagO1tagO2$ ont subi une perte de leurs populations VC plus importante (3,51 log UFC/ cm² et 4,33 log UFC/ cm²). En ce qui concerne les simples mutants $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$, la perte de population VC a été la plus importante (5,10 log UFC/ cm² et 5,23 log UFC/ cm²).

La proportion de cellules VNC résiduelles a fortement augmenté après le passage du flux de soude sur les biofilms de la souche de référence EGD-e et des autres souches étudiées. Par contre, les proportions de cellules mortes sont restées inchangées dans les biofilms formés par la souche sauvage EGD-e, le mutant $\Delta lmo2537$ cultivé avec et sans l'inducteur IPTG et le simple mutant $\Delta tagO2$. Par contre, pour les autres souches ou conditions, il y a eu une diminution dans le biofilm résiduel du mutant $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec l'inducteur IPTG alors que sans l'inducteur IPTG les biofilms résiduels ont vu leur proportion de cellules mortes augmenter comme pour le mutant $\Delta tagO2$.

Les observations microscopiques nous ont indiqué que la densité cellulaire des biofilms de la souche de référence EGD-e et de l'ensemble des mutants après le passage du flux de soude était moins importante que dans le biofilm initial avec principalement la présence de cellules isolées réparties sur toute la surface (Figure 56B). Concernant la viabilité, les populations résiduelles de la souche de référence EGD-e étaient principalement composées de cellules mortes. Des observations similaires ont été faites sur les biofilms résiduels des mutants $\Delta lmo2537$ cultivés sans l'inducteur IPTG, $\Delta tagO1tagO2$ cultivé avec l'inducteur IPTG et $\Delta tagO1$. Par contre, en plus d'une proportion importante de cellules mortes, les biofilms résiduels du mutant $\Delta lmo2537$ cultivés avec l'inducteur IPTG avaient une population importante de cellules viables. Concernant les biofilms résiduels des mutants $\Delta tagO1tagO2$ cultivés sans l'inducteur IPTG et le mutant $\Delta tagO1$, la viabilité n'a pas pu être déterminée du fait d'une coloration simultanément en rouge et en vert des cellules bactériennes.

3.5 Discussion

Dans ces travaux, nous avons étudié le comportement de souches mutées dans la voie de biosynthèse des acides téichoïques versus la souche sauvage EGD-e. Pour cela, nous avons regardé l'impact de ces mutations de l'adhésion à la formation et au détachement des biofilms de *L. monocytogenes* sur acier inoxydable.

Nous avons confirmé que dans nos conditions expérimentales, l'inactivation des gènes *lmo2537* et *tagO1 tagO2* entraînait bien une sous-production d'acides téichoïques. La quantification de ribitol pariétal, un sucre spécifique des acides téichoïques, nous a permis de confirmer qu'après 3 h et 48 h de culture dans le milieu de culture MCDB 202 à 30°C sans inducteur IPTG, les mutations entraînaient bien une sous-production d'acides téichoïques. Les cultures réalisées en présence de l'inducteur IPTG ont également confirmé la restauration de la production d'acides téichoïques pariétaux similaire voire supérieure à celle de la souche

sauvage EGD-e. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Dubail, et al. (2006) qui avaient mis en évidence qu'après une nuit de culture dans un bouillon cœur-cerveille sans inducteur IPTG à 30°C, le mutant *Δlmo2537* exprimait une quantité de phosphate pariétal diminué (0,77 μmol de phosphate/ mg de paroi cellulaire) par rapport aux conditions de culture avec de l'inducteur IPTG (1,35 μmol de phosphate/ mg de paroi cellulaire) et à la souche sauvage (1,49 μmol de phosphate/ mg de paroi cellulaire). Dans des conditions identiques, les travaux de Eugster et Loessner (2012) ont montré qu'il y avait une diminution de 70% du phosphate pariétal pour le double mutant *ΔtagO1tagO2* après une culture sans inducteur IPTG alors qu'en présence de l'inducteur IPTG, il y avait une diminution de seulement 10%. Il est intéressant de noter que les quantités d'acides téichoïques étaient beaucoup plus importantes après 3 h de culture dans le milieu MCDB 202 qu'après 48 h d'incubation. On peut émettre l'hypothèse que la production d'acides téichoïques pouvait être surexprimée dans la phase exponentielle de croissance.

La forte affinité à l'hexadécane de la souche EGD-e traduit un caractère faiblement hydrophile qui est cohérent avec la valeur $-R_0$ de cette souche de -1,3 secondes. Le mutant *Δlmo2537* a le même caractère faiblement hydrophile que la souche sauvage EGD-e lorsqu'il est cultivé avec l'inducteur IPTG. Par contre, comme les simples mutants *ΔtagO1* et *ΔtagO2* et le mutant *ΔtagO1tagO2* (avec ou sans inducteur IPTG), le mutant *Δlmo2537* a un caractère plus fortement hydrophile lorsqu'il est cultivé en absence de l'inducteur IPTG. La sous expression des acides téichoïques a entraîné une augmentation du caractère hydrophile des parois bactériennes. Dans nos travaux sur les mutants obtenus par mutagenèse dirigée sur les gènes *lmo2549* et *lmo2550*, nous avons également montré que l'absence du résidu GlcNAc rendait les souches plus hydrophiles que la souche sauvage EGD-e. Les acides teichoïques étant des polymères hydrophiles, leur absence devrait donc entraîner une diminution du

caractère hydrophile comme ce qui a été observé par Holland, et al. (2011) lors de l'étude d'une souche de *Staphylococcus epidermidis* inactivée pour le gène *tagO*. Une explication pourrait être que l'absence d'acides téichoïques serait compensée par la surproduction d'acides lipotéichoïques qui sont également des molécules à caractère hydrophile. Comme dans nos travaux avec les mutants $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$, nous avons montré que les souches de *L. monocytogenes* inactivées dans leur voie de biosynthèse des acides téichoïques avaient une charge négative élevée, et une mobilité électrophorétique à pH 7 identique à celles obtenues par Briandet, et al. (1999) et cela était cohérent puisque la charge bactérienne est attribuée aux constituants de la paroi cellulaire (Pelletier, et al., 1997).

Les observations réalisées en microscopie électronique à transmission ont révélé un rôle essentiel de l'expression des acides téichoïques pour le maintien de la morphologie bactérienne. Ces observations viennent ainsi confirmer les observations faites par Dubail, et al. (2006) par microscopie électronique à transmission du mutant $\Delta lmo2537$ et Eugster et Loessner (2012) par microscopie confocale à balayage laser du double mutant $\Delta tagO1tagO2$. Lors de la caractérisation cellulaire, l'induction à l'IPTG du double mutant $\Delta tagO1tagO2$ n'a pas restauré le phénotype observé avec la souche sauvage EGD-e (caractère hydrophobe/hydrophile, propriétés électrostatiques, morphologie cellulaire). Une hypothèse pourrait être que le promoteur porté par le plasmide pLIV2 serait muté et incapable de reconnaître les inducteurs à l'IPTG. De plus, nos observations ont également mis en évidence que les mutations indépendantes des gènes *tagO1* et *tagO2* entraînaient des changements du potentiel électrostatique.

Nos travaux ont permis de montrer que le blocage de la synthèse des acides téichoïques dans *L. monocytogenes* n'a pas affecté la formation des biofilms de 48 h mais a

impacté le niveau de la population VC et a provoqué un changement de leur architecture avec la présence de nombreuses micro-colonies et de matrice extracellulaire. Cela est cohérent avec les travaux de Holland, et al. (2011) qui ont mis en évidence par une coloration au cristal violet qu'une souche de *S. epidermidis* mutée sur le gène *tagO* avait une capacité diminuée à former un biofilm après une nuit à 37°C dans un bouillon cœur-cervelle. Danese, et al. (2000) ont également montré la formation de micro-colonies en microscopie confocale sur des mutants *Escherichia coli* K-12 inactivés dans leur voie de biosynthèse de l'acide colanic, un EPS majeur de cette bactérie. En plus des cellules VC, la quantification des populations viables et totales des biofilms de 48 h formés par les mutants $\Delta lmo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$ et $\Delta tagO2$ n'ont pas révélé de différence dans la proportion de cellules viables, VNC et mortes. Par contre, les biofilms formés par le simple mutant *tagO1* étaient composés d'une population viable et VNC significativement plus importante et d'une population de cellules mortes significativement moins importante par rapport aux autres souches étudiées ($p < 0,05$). Cette mutation du gène *tagO1* a également eu un impact sur l'architecture des biofilms avec des agrégats en réseau et la présence de matrice extracellulaire. Les quantifications des EPS ont permis de mettre en évidence une sous-production marquée des composants de la matrice extracellulaire pour tous les mutants par rapport à la souche sauvage EGD-e.

L'application d'un flux d'eau sur des biofilms de souches qui sous-expriment des acides téichoïques a entraîné le décrochement d'environ 1 log UG/ cm² de chaque population (VC, VNC, morte). Ce décrochement fut encore plus important lors de l'application d'un flux laminaire couplé à de la soude avec en plus l'apparition d'une plus grande proportion de cellules VNC. Nous avons montré que les acides téichoïques étaient des composants polysaccharidiques majeurs de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*, dans nos chapitres précédents. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une production

diminuée d'acides téichoïques au niveau de la matrice extracellulaire entraînerait une fragilisation du biofilm favorisant donc le décrochage de ce dernier. Cette adaptation de la viabilité lors d'une procédure NEP peut présenter un avantage mitigé pour les cellules de *L. monocytogenes* puisque l'état VNC n'est pas détectable par les techniques classiques de microbiologie mais entraîne une incapacité des cellules à provoquer des infections (Cappelier, et al., 2005, Lindback, et al., 2010).

3.6 Conclusion

Dans nos travaux, nous avons montré qu'une sous-production d'acides téichoïques entraînait un changement de l'architecture des biofilms de 48 h ainsi qu'une diminution de la population bactérienne VC et une sensibilité à un flux. La proportion de cellules VNC dans les biofilms résiduels a également été accentuée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La persistance de *Listeria monocytogenes* représente une menace permanente dans les industries agro-alimentaires le plus souvent liée à la présence de bactéries en biofilm. Ces biofilms sont composé de bactéries adhérentes et de matrice extracellulaire conférant aux cellules bactériennes une protection face aux agressions environnementales comme par exemple les process et les procédures de nettoyage-désinfection. Il est admis qu'un des composants majeurs de la matrice extracellulaire des biofilms bactériens sont les exopolysaccharides. L'objectif de ce travail a donc été d'étudier le rôle des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire dans la formation des biofilms de *L. monocytogenes* et dans leur résistance face à des procédures de nettoyage rencontrées en entreprise dans des circuits fermés.

Dans un premier temps nous avons caractérisé les exopolysaccharides présents dans la matrice extracellulaire et le milieu de culture des biofilms de *L. monocytogenes* de sérotype 4b et 1/2a versus les polysaccharides pariétaux. Nous avons montré que l'exopolysaccharide majeur dans la matrice extracellulaire était l'acide téichoïque et qu'il était de structure identique à l'acide téichoïque pariétal. De plus, nous avons identifié dans la matrice extracellulaire des biofilms de la souche DSS 1130 BFA2 de sérotype 1/2a, de l'acide téichoïque dépourvu du résidu GlcNAc en raison d'une mutation du gène *lmo2550* qui est essentiel dans la glycosylation de cet exopolysaccharide. Cette mutation a également été retrouvée sur les acides téichoïques pariétaux et après le séquençage de ce gène dans 93 souches de *L. monocytogenes* provenant majoritairement de l'industrie des produits de la pêche, il s'est avéré qu'il avait une fréquence de mutation élevée. En effet, 49/ 93 souches avaient une mutation dans ce gène dont 11 étaient une mutation non-sens ou faux sens bloquant la glycosylation de leurs acides téichoïques pariétaux ou extracellulaires avec le

résidu GlcNAc. Il faut également noter que 50% des souches qui avaient une mutation faux sens ont perdu leur capacité à ramifier l'acide téichoïque de GlcNAc. Il serait intéressant d'élargir cette étude de caractérisation des exopolysaccharides dans les biofilms de *L. monocytogenes* appartenant à d'autres sérotypes et sur un panel de souches plus important. Ensuite, il faudrait également regarder la fréquence de mutation des gènes impliqués dans les ramifications des structures des exopolysaccharides sur un large panel de souches en tenant compte de facteurs comme la notion de bactéries transitoires et persistantes en entreprise, de filière agro-alimentaire versus des souches sporadiques dans des cas de listérioses et des souches isolées d'épidémies. En effet, vu la fréquence de mutation importante identifiée dans ces travaux, on peut se poser la question de l'impact de la perte de résidu glycosidique sur la virulence de *L. monocytogenes* et le lien avec le faible nombre de TIAC dans la filière des produits de la pêche. Nous pourrions nous baser sur les travaux de Dubail, et al. (2006) qui a étudié la souche EGD-*elmo2537/pLiv-lmo2537* afin d'évaluer le rôle des acides téichoïques dans la virulence de *L. monocytogenes*. Ils ont montré que le mutant conditionnel était rapidement éliminé des organes cibles et qu'il était totalement avirulent comme la souche DSS 1130 BFA2 isolée de poisson et qui a une mutation sur le gène *lmo2550*. Un protocole similaire à ces travaux pourra donc être utilisé avec une étude de la capacité des différents mutants à adhérer et pénétrer des cultures de cellules Caco2 puis dans un second temps de réaliser des tests de virulence *in vivo* avec un modèle murin.

Une autre perspective serait d'étudier la classification des sérotypes de *L. monocytogenes*. Il est acquis que les composés somatiques présents sur la paroi bactérienne, qui sont des antigènes essentiels au sérotypage de *Listeria*, sont principalement des acides téichoïques qui ont différentes structures et compositions. Le sérotype 1/2 exprime des acides téichoïques ramifiés de GlcNAc et Rha alors que le sérotype 3 exprime des acides

téichoïques exclusivement porteur d'une ramification GlcNAc et que le séroroupe 7 ne porte aucune ramification glycosidique. Une des hypothèses que nous pouvons émettre est que les sérogroupe 3 et 7 seraient des variants géniques du séroroupe 1/2 issus de différentes mutations des gènes de glycosylation. Il serait donc intéressant de réaliser une corrélation entre la variation génétique des gènes de glycosylation et la composition des acides téichoïques des sérogroupe 1/2, 3 et 7. Cette hypothèse est fortement probable puisqu'avec la PCR sérogroupage (Doumith, et al., 2004), les profils d'amplification sont exactement identiques entre les souches du séroroupe 1/2, les souches du séroroupe 3 et les souches du séroroupe 7. En effet, cela suggère que le sérotype 3a est un variant du sérotype 1/2a, le sérotype 3b et 7, des variants du sérotype 1/2b, et le sérotype 3c un variant du sérotype 1/2c. Cette hypothèse peut être étendue au séroroupe 4. En effet, le sérotype 4b exprime des acides téichoïques de composition GlcNAc, Glc et Gal alors que le sérotype 4d exprime des acides téichoïques de composition GlcNAc et Glc et le sérotype 4e des acides téichoïques de composition GlcNAc et Gal. Or ces 3 sérotypes ont des profils d'amplification identiques en PCR sérogroupage. Il apparaît donc fort probable que les sérotypes 4d et 4e n'existent pas mais sont issus de mutations des gènes codant des protéines impliquées dans la glycosylation des acides téichoïques du séroroupe. De même, il apparaît fort probable que le sérotype 4c provienne d'une mutation du sérotype 4a ou inversement. Au final, il n'existerait donc pas 13 sérotypes de *L. monocytogenes* mais seulement 5 : les sérotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a et 4b. Il serait donc intéressant de réaliser une corrélation entre la variation génétique des gènes de glycosylation et la composition des acides téichoïques de l'ensemble des sérotypes de *L. monocytogenes* puis de proposer un nouveau protocole de PCR pour le sérotypage qui pourrait se baser sur ces gènes de glycosylation et sur des gènes de virulence.

Nous avons ensuite voulu regarder l'impact de la mutation des gènes impliqués dans la ramification des composés glycosidiques sur l'acide téichoïque. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'absence de résidu GlcNAc sur les acides téichoïques pariétaux et extracellulaires de l'adhésion à la formation et au détachement des biofilms de *L. monocytogenes*. La délétion des gènes *lmo2549* ou *lmo2550* dans la souche de référence EGD-e nous a permis de mettre en évidence que l'absence de résidu GlcNAc sur les acides téichoïques avait modifié d'une part, les propriétés de surface de *L. monocytogenes* et d'autre part, diminué l'adhésion des bactéries à l'acier inoxydable et modifié l'architecture des biofilms de 48 h. Par ailleurs, les biofilms des mutants qui synthétisaient de l'acide téichoïque dépourvu de GlcNAc, sont apparus plus sensibles à une procédure de nettoyage en circuit fermé rencontré en entreprise avec un détachement plus important et une modification de l'architecture des biofilms versus la souche sauvage EGD-e. Nous avons également observé la présence uniquement de cellules VNC et mortes après passage du flux de soude.

Suite à ces observations, nous avons voulu regarder le rôle des acides téichoïques dans leur globalité de l'adhésion à la formation et au détachement des biofilms de *L. monocytogenes*. L'inactivation des gènes *lmo2537* et *tagO1tagO2* de la souche de référence EGD-e nous ont permis de mettre en évidence que l'absence d'acides téichoïques entraînait une augmentation du caractère hydrophile des parois ainsi qu'une diminution de la population bactérienne des biofilms de 48 h et un changement de leur architecture. Comme pour les mutants synthétisant de l'acide téichoïque sans GlcNAc, les mutants sans acides téichoïques se décrochaient après le passage d'un flux de soude de manière plus importante que la souche sauvage EGD-e. Les agrégats de bactéries présentes dans le biofilm initial de ces mutants se décrochèrent lors du passage du flux de soude et il reste principalement des cellules résiduelles isolées sur la surface. Ces cellules étaient principalement passées dans un état

VNC mais il restait également une proportion de cellules VC et mortes. Par contre, pour les mutants avec de l'acide téichoïque sans ramification GlcNAc, toutes les cellules résiduelles étaient passées dans un état VNC ou morte après le passage du flux de soude.

Lors de nos travaux, nous avons observé que la contrainte de flux d'eau de 40 Pa n'avait pas permis de décrocher beaucoup de bactéries présentes dans les biofilms de 48 h de *L. monocytogenes* qu'ils soient formés par des mutants ou par la souche sauvage EGD-e. Il serait donc intéressant de répéter cette manipulation en appliquant des contraintes de flux d'eau croissantes jusqu'à un décrochage totale des cellules viables du biofilm bactérien. Il serait également intéressant de le faire en couplant un décrochement mécanique et un décrochement chimique en augmentant le débit du flux. Dans ces deux cas, il faudrait suivre les populations VC, viables et mortes pour modéliser le phénomène de décrochement de *L. monocytogenes* dans des circuits fermés. Il serait également judicieux de regarder dans quel laps de temps, en étudiant plusieurs conditions (température, milieu de culture...), les populations VNC redeviendraient VC et si elles se décrocheraient toujours de la même manière face à l'application d'un nouveau flux dans le but de modéliser ce qui se passe dans les environnements industriels. En plus des circuits fermés, il faudrait appliquer le même type d'approche pour modéliser des phénomènes d'encrassement et de nettoyage sur des surfaces ouvertes car il a été souvent montré que *L. monocytogenes* posait des problèmes dans les ateliers aussi bien dans des circuits fermés que sur des surfaces ouvertes.

En parallèle des travaux en circuit fermé ou sur une surface ouverte, il faudrait suivre l'expression des acides téichoïques de la phase d'adhésion au biofilm mature soit en quantifiant le ribitol pariétal comme décrit dans notre travaux expérimentaux et/ou en développant une technique de RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain

reaction) pour suivre l'expression des gènes. Il faudrait relier ces résultats avec l'état de viabilité des bactéries pour compléter la modélisation de la persistance de *L. monocytogenes* dans les ateliers.

A plus long terme, il serait important d'appliquer toute cette démarche décrite au-dessus à des biofilms mixtes en appliquant des protocoles de réalisation de biofilm qui soient les plus proches des conditions rencontrées dans les industries agro-alimentaires. En effet, la problématique des biofilms mixtes est encore peu étudiée car elle est très complexe mais c'est ce qui se rapproche le plus des conditions de terrain. Pour continuer dans cette réflexion, une autre des perspectives est la lutte contre les biofilms de *L. monocytogenes* dans les entreprises qu'elle soit seule ou en biofilm mixte. Dans nos travaux, nous avons mis en évidence que les acides téichoïques étaient les composants polysaccharidiques majeurs de la matrice extracellulaire des biofilms de *L. monocytogenes*. À l'instar de la DNase I pour l'ADNe ou de la protéinase K pour les protéines extracellulaires, il serait intéressant de tester une ou des enzymes capables d'hydrolyser les acides téichoïques ce qui n'a jamais été fait. Les acides téichoïques étant porteur de liaisons phosphodiester, l'utilisation d'une phosphodiesterase paraît la plus appropriée. La phosphodiesterase commercialisée par la société Sigma-Aldrich sous la référence P3134 pourrait être testée. En revanche, l'ADNe étant également porteur de liaison phosphodiester, les observations effectuées suite à un traitement à la phosphodiesterase ne serait pas seulement imputable à l'hydrolyse des acides téichoïques mais également à l'hydrolyse de l'ADNe. Il serait donc intéressant de réaliser un traitement à la phosphodiesterase avec un traitement au préalable à la DNaseI. Récemment, une équipe d'Irlande aurait découvert une enzyme provenant d'un bactériophage et qui dégraderait spécifiquement les acides téichoïques. Cependant, nous n'avons pas de référence pouvant valider ces déclarations. Un autre moyen de lutte innovant est l'utilisation de bactériophages.

acides téichoïques de *L. monocytogenes*, il serait donc intéressant de vérifier si les acides téichoïques présents dans la matrice extracellulaire ne confèrent pas une protection des cellules bactériennes en bloquant les récepteurs phagiques. Pour cela, nous pourrions effectuer des comparaisons de sensibilité face à ce bactériophage entre des cultures planctoniques et des cultures de biofilms de 48 h de la souche de référence EGD-e. Ces travaux pourraient également être accompagnés d'observations microscopiques afin de voir si les bactériophages seraient bloqués dans les couches superficielles du biofilm ou s'ils seraient capables de pénétrer le biofilm. Le but final de tous ces travaux étant de mieux comprendre et mieux modéliser la persistance de *L. monocytogenes* dans les entreprises agro-alimentaires pour ensuite trouver le meilleur moyen de l'éradiquer dans l'environnement industriel pour une meilleure sécurité sanitaire des aliments et pour la santé du consommateur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adkins, S., et M. Burmeister. "Visualization of DNA in Agarose Gels as Migrating Colored Bands: Applications for Preparative Gels and Educational Demonstrations." *Anal Biochem* 240, no. 1 (1996): 17-23.
- Allison, D. G., B. Ruiz, C. SanJose, A. Jaspe, et P. Gilbert. "Extracellular Products as Mediators of the Formation and Detachment of *Pseudomonas Fluorescens* Biofilms." *FEMS Microbiol Lett* 167, no. 2 (1998): 179-84.
- ANSES. "*Listeria Monocytogenes*." *Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0171Fi.pdf> (2011).
- Aureli, P., G. C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone, et S. Salmaso. "An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria Monocytogenes*." *N Engl J Med* 342, no. 17 (2000): 1236-41.
- Autret, N., I. Dubail, P. Trieu-Cuot, P. Berche, et A. Charbit. "Identification of New Genes Involved in the Virulence of *Listeria Monocytogenes* by Signature-Tagged Transposon Mutagenesis." *Infect Immun* 69, no. 4 (2001): 2054-65.
- Batz, M. B., S. Hoffmann, et J. G. Morris, Jr. "Ranking the Disease Burden of 14 Pathogens in Food Sources in the United States Using Attribution Data from Outbreak Investigations and Expert Elicitation." *J Food Prot* 75, no. 7 (2012): 1278-91.
- Beaufort, A., S. Rudelle, N. Gnanou-Besse, M. T. Toquin, A. Kerouanton, H. Bergis, G. Salvat, et M. Cornu. "Prevalence and Growth of *Listeria Monocytogenes* in Naturally Contaminated Cold-Smoked Salmon." *Lett Appl Microbiol* 44, no. 4 (2007): 406-11.
- Bereksi, N., F. Gavini, T. Benezech, et C. Faille. "Growth, Morphology and Surface Properties of *Listeria Monocytogenes* Scott A and LO28 under Saline and Acid Environments." *J Appl Microbiol* 92, no. 3 (2002): 556-65.
- Beresford, M. R., P. W. Andrew, et G. Shama. "*Listeria Monocytogenes* Adheres to Many Materials Found in Food-Processing Environments." *J Appl Microbiol* 90, no. 6 (2001): 1000-5.
- Bertsch, D., J. Rau, M. R. Eugster, M. C. Haug, P. A. Lawson, C. Lacroix, et L. Meile. "*Listeria Fleischmannii* Sp. Nov., Isolated from Cheese." *Int J Syst Evol Microbiol* 63, no. Pt 2 (2013): 526-32.

- Besnard, V., M. Federighi, et J. M. Cappelier. "Evidence of Viable but Non-Culturable State in *Listeria Monocytogenes* by Direct Viable Count and Ctc-Dapi Double Staining." *Food Microbiol* 17, no. 6 (2000): 697-704.
- Blatter, S., N. Giezendanner, R. Stephan, et C. Zweifel. "Phenotypic and Molecular Typing of *Listeria Monocytogenes* Isolated from the Processing Environment and Products of a Sandwich-Producing Plant." *Food Control* 21, no. 11 (2010): 1519-23.
- Boerlin, P., F. Boerlin-Petzold, E. Bannerman, J. Bille, et T. Jemmi. "Typing *Listeria Monocytogenes* Isolates from Fish Products and Human Listeriosis Cases." *Appl Environ Microbiol* 63, no. 4 (1997): 1338-43.
- Boerlin, P., J. Rocourt, F. Grimont, P. A. D. Grimont, C. Jacquet, et J. C. Piffaretti. "*Listeria Ivanovii* Subsp. *Londoniensis* Subsp. Nov." *Int J Syst Bacteriol* 42, no. 1 (1992): 69-73.
- Bonsaglia, E. C. R., N. C. C. Silva, A. Fernades Júnior, J. P. Araújo Júnior, M. H. Tsunemi, et V. L. M. Rall. "Production of Biofilm by *Listeria Monocytogenes* in Different Materials and Temperatures." *Food Control* 35, no. 1 (2014): 386-91.
- Borucki, M. K., et D. R. Call. "*Listeria Monocytogenes* Serotype Identification by Pcr." *J Clin Microbiol* 41, no. 12 (2003): 5537-40.
- Borucki, M. K., J. D. Peppin, D. White, F. Loge, et D. R. Call. "Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria Monocytogenes*." *Appl Environ Microbiol* 69, no. 12 (2003): 7336-42.
- Branda, S. S., Å. Vik, L. Friedman, et R. Kolter. "Biofilms: The Matrix Revisited." *Trends Microbiol* 13, no. 1 (2005): 20-26.
- Branger, A. "Chapitre 7: Quelques systèmes microbiens." *Microbiochimie Et Alimentation*. Educagri Editions, 2012.
- Brett, M. S., P. Short, et J. McLauchlin. "A Small Outbreak of Listeriosis Associated with Smoked Mussels." *Int J Food Microbiol* 43, no. 3 (1998): 223-9.
- Briandet, R., T. Meylheuc, C. Maher, et M. N. Bellon-Fontaine. "*Listeria Monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions." *Appl Environ Microbiol* 65, no. 12 (1999): 5328-33.
- Busscher, H. J., W. Norde, et H. C. van der Mei. "Specific Molecular Recognition and Nonspecific Contributions to Bacterial Interaction Forces." *Appl Environ Microbiol* 74, no. 9 (2008): 2559-64.

- Cappelier, J. M., V. Besnard, S. Roche, N. Garrec, E. Zundel, P. Velge, et M. Federighi. "Avirulence of Viable but Non-Culturable *Listeria Monocytogenes* Cells Demonstrated by in Vitro and in Vivo Models." *Vet Res* 36, no. 4 (2005): 589-99.
- Carpentier, B., et O. Cerf. "Biofilms and Their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in the Food Industry." *J Appl Bacteriol* 75, no. 6 (1993): 499-511.
- Carpentier, B., et O. Cerf. "Persistence of *Listeria Monocytogenes* in Food Industry Equipment and Premises." *Int J Food Microbiol* 145, no. 1 (2011): 1-8.
- Carpentier, B., et D. Chassaing. "Interactions in Biofilms between *Listeria Monocytogenes* and Resident Microorganisms from Food Industry Premises." *Int J Food Microbiol* 97, no. 2 (2004): 111-22.
- Carvalho, F., M. L. Atilano, R. Pombinho, G. Covas, R. L. Gallo, S. R. Filipe, S. Sousa, et D. Cabanes. "L-Rhamnosylation of *Listeria Monocytogenes* Wall Teichoic Acids Promotes Resistance to Antimicrobial Peptides by Delaying Interaction with the Membrane." *PLoS Pathog* 11, no. 5 (2015).
- Casanova, J Mazaiia. "Bacteria and Their Dyes: Hans Christian Joachim Gram." *Historia de La Immunologia* 11, no. 4 (1992).
- Casarin, L. S., A. Brandelli, F. de Oliveira Casarin, P. A. Soave, C. H. Wanke, et E. C. Tondo. "Adhesion of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria Monocytogenes* on Stainless Steel Welds." *Int J Food Microbiol* 191 (2014): 103-8.
- CDC. "Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Blue Bell Creameries Products (Final Update)." <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/>.
- Chae, M. .k., H. Schraft, L. T. Hansen, et R. Mackereth. "Effects of Physicochemical Surface Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Strains on Attachment to Glass." *Food Microbiol* 23 (2006): 250-59.
- Challan Belval, S., L. Gal, S. Margiewes, D. Garmyn, P. Piveteau, et J. Guzzo. "Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e." *Appl Environ Microbiol* 72, no. 4 (2006): 2644-50.
- Chen, Gang, et Keith A. Strevett. "Microbial Surface Thermodynamics and Interactions in Aqueous Media." *J. Colloid Interface Sci* 261, no. 2 (2003): 283-90.
- Chen, L. H., V. K. Koseoglu, Z. T. Guvener, T. Myers-Morales, J. M. Reed, S. E. D'Orazio, K. W. Miller, et M. Gomelsky. "Cyclic Di-Gmp-Dependent Signaling Pathways in the Pathogenic Firmicute *Listeria Monocytogenes*." *PLoS Pathog* 10, no. 8 (2014).

- Cheng, Y., L. Yue, D. Elhanafi, et S. Kathariou. "Absence of Serotype-Specific Surface Antigen in Laboratory Variants of Epidemic-Associated *Listeria Monocytogenes* Strains." *Appl Environ Microb* 73, no. 19 (2007): 6313-16.
- CMEBA. "La Microscopie Électronique À Balayage." <http://www.cmeba.univ-rennes1.fr/>.
- Combrouse, T., I. Sadvovskaya, C. Faille, O. Kol, Y. Guérardel, et G. Midelet-Bourdin. "Quantification of the Extracellular Matrix of the *Listeria Monocytogenes* Biofilms of Different Phylogenetic Lineages with Optimization of Culture Conditions." *J Appl Microbiol* 114 (2013): 1120-31.
- Compere, C. "Biofilms En Mileu Marin."
<http://rechercheisidore.eu/search/resource/?uri=10670/1.69ms5kfiles/8/resource.html>.
- Conrad, A., M. K. Suutari, M. M. Keinanen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault, et J. C. Block. "Fatty Acids of Lipid Fractions in Extracellular Polymeric Substances of Activated Sludge Flocs." *Lipids* 38, no. 10 (2003): 1093-105.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, et H. M. Lappin-Scott. "Microbial Biofilms." *Annu Rev Microbiol* 49 (1995): 711-45.
- Crim, S. M., M. Iwamoto, J. Y. Huang, P. M. Griffin, D. Gilliss, A. B. Cronquist, M. Cartter, et al. "Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly through Food—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 Us Sites, 2006–2013." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 63, no. 15 (2014): 328-32.
- Currie, A., J. M. Farber, C. Nadon, D. Sharma, Y. Whitfield, C. Gaulin, E. Galanis, et al. "Multi-Province Listeriosis Outbreak Linked to Contaminated Deli Meat Consumed Primarily in Institutional Settings, Canada, 2008." *Foodborne Pathog Dis* 12, no. 8 (2015): 645-52.
- Cywes-Bentley, C., D. Skurnik, T. Zaidi, D. Roux, R. B. Deoliveira, W. S. Garrett, X. Lu, et al. "Antibody to a Conserved Antigenic Target Is Protective against Diverse Prokaryotic and Eukaryotic Pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, no. 24 (2013): 28.
- Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, et P. M. Griffin. "An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria Monocytogenes* in Milk." *N Engl J Med* 336, no. 2 (1997): 100-5.
- Danese, P. N., L. A. Pratt, et R. Kolter. "Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia Coli* K-12 Biofilm Architecture." *J Bacteriol* 182, no. 12 (2000): 3593-6.

- de Noordhout, C. M., B. Devleeschauwer, F. J. Angulo, G. Verbeke, J. Haagsma, M. Kirk, A. Havelaar, et N. Speybroeck. "The Global Burden of Listeriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Lancet Infect Dis* 14, no. 11 (2014): 1073-82.
- Dell'Era, S., C. Buchrieser, E. Couve, B. Schnell, Y. Briers, M. Schuppler, et M. J. Loessner. "*Listeria Monocytogenes* L-Forms Respond to Cell Wall Deficiency by Modifying Gene Expression and the Mode of Division." *Mol Microbiol* 73, no. 2 (2009): 306-22.
- Delmas, G, A Gallay, E Espié, S Haeghebaert, N Pihier, FX Weill, H De Valk, V Vaillant, et JC Désenclos. "Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives En France Entre 1996 Et 2005." *Bull. Epidemio. Hebd* (2006): 51-52.
- Delmas, G., N. J. da Silva, N. Pihier, F-X Weill, V. Vaillant, et H. de Valk. "Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives En France Entre 2006 Et 2008." *BEH* 31-32 (2010): 344-48.
- den Bakker, H. C., S. Warchocki, E. M. Wright, A. F. Allred, C. Ahlstrom, C. S. Manuel, M. J. Stasiewicz, et al. "*Listeria Floridensis* Sp. Nov., *Listeria Aquatica* Sp. Nov., *Listeria Cornellensis* Sp. Nov., *Listeria Riparia* Sp. Nov. And *Listeria Grandensis* Sp. Nov., from Agricultural and Natural Environments." *Int J Syst Evol Microbiol* 64, no. Pt 6 (2014): 1882-9.
- Denes, T., H. C. den Bakker, J. I. Tokman, C. Guldemann, et M. Wiedmann. "Selection and Characterization of Phage-Resistant Mutant Strains of *Listeria Monocytogenes* Reveal Host Genes Linked to Phage Adsorption." *Appl Environ Microbiol* 81, no. 13 (2015): 4295-305.
- Deng, X., A. M. Phillippy, Z. Li, S. L. Salzberg, et W. Zhang. "Probing the Pan-Genome of *Listeria Monocytogenes*: New Insights into Intraspecific Niche Expansion and Genomic Diversification." *BMC Genomics* 11, no. 500 (2010): 1471-2164.
- Deupree, S. M., et M. H. Schoenfish. "Quantitative Method for Determining the Lateral Strength of Bacterial Adhesion and Application for Characterizing Adhesion Kinetics." *Langmuir* 24, no. 9 (2008): 4700-7.
- Di Bonaventura, G., R. Piccolomini, D. Paludi, V. D'Orto, A. Vergara, M. Conter, et A. Ianieri. "Influence of Temperature on Biofilm Formation by *Listeria Monocytogenes* on Various Food-Contact Surfaces: Relationship with Motility and Cell Surface Hydrophobicity." *J Appl Microbiol* 104, no. 6 (2008): 1552-61.
- Djordjevic, D., M. Wiedmann, et L. A. McLandsborough. "Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation." *Appl Environ Microb* 68 (2002): 2950-58.

- Donlan, R. M. "Biofilms: Microbial Life on Surfaces." *Emerg Infect Dis* 8, no. 9 (2002): 881-90.
- Donovan, Summer. "Listeriosis: A Rare but Deadly Disease." *Clin Microbiol Newsletter* 37, no. 17 (2015): 135-40.
- Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, et P. Martin. "Differentiation of the Major *Listeria Monocytogenes* Serovars by Multiplex Pcr." *J Clin Microbiol* 42, no. 8 (2004): 3819-22.
- Dubail, A. Bigot, V. Lazarevic, B. Soldo, D. Euphrasie, M. Dupuis, et A. Charbit. "Identification of an Essential Gene of *Listeria Monocytogenes* Involved in Teichoic Acid Biogenesis." *J Bacteriol* 188 (2006): 6580-91.
- DuBois, Michel., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, et Fred. Smith. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Anal Chem* 28 (1956): 350-56.
- Duffy, L. L., et G. A. Dykes. "The Ability of *Campylobacter Jejuni* Cells to Attach to Stainless Steel Does Not Change as They Become Nonculturable." *Foodborne Pathog Dis* 6, no. 5 (2009): 631-4.
- Dumont, J, et Li Cotoni. "Bacille Semblable À Celui Du Rouget Du Porc Rencontré Dans Le Lcr D'un Méningitique." *Ann. Inst. Pasteur* 35 (1921): 625-33.
- Dunne, W. M., Jr. "Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?". *Clin Microbiol Rev* 15, no. 2 (2002): 155-66.
- EFSA-ECDC. "Rapport Efsa-Ecdc: Campylobactériose Stable, Listériose En Augmentation." <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/150128>.
- Elizaquível, P., G. Sánchez, et R. Aznar. "Quantitative Detection of Viable Foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella* in Fresh-Cut Vegetables Combining Propidium Monoazide and Real-Time Pcr." *Food Control* 25, no. 2 (2012): 704-08.
- Ericsson, H., A. Eklow, M. L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L. O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad, et W. Tham. "An Outbreak of Listeriosis Suspected to Have Been Caused by Rainbow Trout." *J Clin Microbiol* 35, no. 11 (1997): 2904-7.
- Eugster, M. R., et M. J. Loessner. "The *Listeria* Cell Wall and Associated Carbohydrate Polymers." *Methods Mol Biol* (2014): 129-40.
- Eugster, M. R., et M. J. Loessner. "Rapid Analysis of *Listeria Monocytogenes* Cell Wall Teichoic Acid Carbohydrates by Esi-Ms/Ms." *PLoS ONE* 6, no. 6 (2011).

- Eugster, M. R., L. S. Morax, V. J. Huls, S. G. Huwiler, A. Leclercq, M. Lecuit, et M. J. Loessner. "Bacteriophage Predation Promotes Serovar Diversification in *Listeria Monocytogenes*." *Mol Microbiol* 30, no. 10 (2015): 13009.
- Eugster, M. R., M. C. Haug, S. G. Huwiler, et M. J. Loessner. "The Cell Wall Binding Domain of *Listeria* Bacteriophage Endolysin Plyp35 Recognizes Terminal GlcnaC Residues in Cell Wall Teichoic Acid." *Molecular Microbiology* 81 (2011): 1419-32.
- Eugster, M. R., et M. J. Loessner. "Wall Teichoic Acids Restrict Access of Bacteriophage Endolysin Ply118, Ply511, and Plyp40 Cell Wall Binding Domains to the *Listeria Monocytogenes* Peptidoglycan." *J Bacteriol* 194 (2012): 6498-506.
- European Food Safety Authority. "Efsa-Cdc Annual Report on Animal Infections Transmissible to Humans *Salmonella* Infections in Humans in the Eu Down, *Listeria* Infections up *Campylobacter* Still Most Frequently Reported Animal Infection Transmissible to Humans." www.efsa-europa.eu/EFSA/News_PR/pr_zoonoses_efsa-ecdc_en,1.pdf (2007a).
- European Food Safety Authority. "Request for Updating the Former Scvph Opinon on *Listeria Monocytogenes* Risk Related to Ready-to-Eat Foods and Scientific Advice on Different Levels of *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods and the Related Risk for Human Illness." www.efsa-europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/biohaz_op_ej599_listeria_en.pdf (2007b).
- Faille, C., T. Benezech, W. Blel, A. Ronse, G. Ronse, M. Clarisse, et C. Slomianny. "Role of Mechanical Vs. Chemical Action in the Removal of Adherent *Bacillus* Spores During Cip Procedures." *Food Microbiol* 33, no. 2 (2013): 149-57.
- Faille, C., Y. Lequette, A. Ronse, C. Slomianny, E. Garenaux, et Y. Guerardel. "Morphology and Physico-Chemical Properties of *Bacillus* Spores Surrounded or Not with an Exosporium: Consequences on Their Ability to Adhere to Stainless Steel." *Int J Food Microbiol* 143, no. 3 (2010): 125-35.
- Faith, N., S. Kathariou, Y. Cheng, N. Promadej, B. L. Neudeck, Q. Zhang, J. Luchansky, et C. Czuprynski. "The Role of *L. Monocytogenes* Serotype 4b Gtca in Gastrointestinal Listeriosis in a/J Mice." *Foodborne Pathog Dis* 6, no. 1 (2009): 39-48.
- Fang, H. H., K. Y. Chan, et L. C. Xu. "Quantification of Bacterial Adhesion Forces Using Atomic Force Microscopy (Afm)." *J Microbiol Methods* 40, no. 1 (2000): 89-97.
- Fassel, T. A., et C. E. Edmiston, Jr. "Ruthenium Red and the Bacterial Glycocalyx." *Biotech Histochem* 74, no. 4 (1999): 194-212.

- Fiedler, F. "Biochemistry of the Cell Surface of *Listeria* Strains: A Locating General View." *Infection* 16 Suppl 2 (1988): S92-97.
- Fiedler, F., J. Seger, A. Schrettenbrunner, et H. P. R. Seeliger. "The Biochemistry of Murein and Cell Wall Teichoic Acids in the Genus *Listeria*." *Syst Appl Microbiol* 5 (1984): 360-76.
- Fittipaldi, M., F. Codony, B. Adrados, A. K. Camper, et J. Morato. "Viable Real-Time Pcr in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly ?". *Microb Ecol* 61, no. 1 (2011): 7-12.
- Flemming, H. C., et J. Wingender. "The Biofilm Matrix." . *Nature Rev Microbiol* 8 (2010): 623-33.
- Fong, J. C., et F. H. Yildiz. "The Rbmbcdef Gene Cluster Modulates Development of Rugose Colony Morphology and Biofilm Formation in *Vibrio Cholerae*." *J Bacteriol* 189, no. 6 (2007): 2319-30.
- Franciosa, G., A. Maugliani, C. Scalfaro, F. Floridi, et P. Aureli. "Expression of Internalin a and Biofilm Formation among *Listeria Monocytogenes* Clinical Isolates." *Int J Immunopathol Pharmacol* 22, no. 1 (2009): 183-93.
- Fretz, R., J. Pichler, U. Sagel, P. Much, W. Ruppitsch, A. T. Pietzka, A. Stoger, et al. "Update: Multinational Listeriosis Outbreak Due to 'Quargel', a Sour Milk Curd Cheese, Caused by Two Different *L. Monocytogenes* Serotype 1/2a Strains, 2009-2010." *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin* 15, no. 16 (2010a).
- Fretz, R., U. Sagel, W. Ruppitsch, A. Pietzka, A. Stoger, S. Huhulescu, S. Heuberger, et al. "Listeriosis Outbreak Caused by Acid Curd Cheese Quargel , Austria and Germany 2009." *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin* 15, no. 5 (2010b).
- Frølund, Bo, Rikke Palmgren, Kristian Keiding, et Per Halkjær Nielsen. "Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange Resin." *Water Research* 30, no. 8 (1996): 1749-58.
- Fujii, H., K. Kamisango, M. Nagaoka, K. Uchikawa, I. Sekikawa, K. Yamamoto, et I. Azuma. "Structural Study on Teichoic Acids of *Listeria Monocytogenes* Types 4a and 4d." *J Biochem* 97 (1985): 883-91.
- Gamble, R., et P. M. Muriana. "Microplate Fluorescence Assay for Measurement of the Ability of Strains of *Listeria Monocytogenes* from Meat and Meat-Processing Plants to Adhere to Abiotic Surfaces." *Appl Environ Microb* 73, no. 16 (2007): 5235-44.

- Garmyn, D., L. Gal, J. P. Lemaitre, A. Hartmann, et P. Piveteau. "Communication and Autoinduction in the Species *Listeria Monocytogenes*: A Central Role for the Agr System." *Commun Integr Biol* 2, no. 4 (2009): 371-4.
- Garrett, Trevor Roger, Manmohan Bhakoo, et Zhibing Zhang. "Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces." *Prog Nat Sci* 18, no. 9 (2008): 1049-56.
- Gaulin, Colette, Danielle Ramsay, et Sadjia Bekal. "Widespread Listeriosis Outbreak Attributable to Pasteurized Cheese, Which Led to Extensive Cross-Contamination Affecting Cheese Retailers, Quebec, Canada, 2008." *J Food Protect* 75, no. 1 (2012): 71-78.
- Giao, M. S., et C. W. Keevil. "Hydrodynamic Shear Stress to Remove *Listeria Monocytogenes* Biofilms from Stainless Steel and Polytetrafluoroethylene Surfaces." *J Appl Microbiol* 114, no. 1 (2013): 256-65.
- Giaouris, E., N. Chorianopoulos, et G. J. Nychas. "Effect of Temperature, Ph, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella Enterica Enteritidis* Pt4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements." *J Food Prot* 68, no. 10 (2005): 2149-54.
- Gibson, H., J. H. Taylor, K. E. Hall, et J. T. Holah. "Effectiveness of Cleaning Techniques Used in the Food Industry in Terms of the Removal of Bacterial Biofilms." *J Appl Microbiol* 87, no. 1 (1999): 41-8.
- Giotis, E. S., I. S. Blair, et D. A. McDowell. "Morphological Changes in *Listeria Monocytogenes* Subjected to Sublethal Alkaline Stress." *Int J Food Microbiol* 120, no. 3 (2007): 250-8.
- Gjermansen, M., P. Ragas, C. Sternberg, S. Molin, et T. Tolker-Nielsen. "Characterization of Starvation-Induced Dispersion in *Pseudomonas Putida* Biofilms." *Environ Microbiol* 7, no. 6 (2005): 894-906.
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, et al. "Comparative Genomics of *Listeria* Species." *Science* 294, no. 5543 (2001): 849-52.
- Goulet, Véronique, Craig Hedberg, Alban Le Monnier, et Henriette de Valk. "Increasing Incidence of Listeriosis in France and Other European Countries." *Emerg Infect Dis* 14 (2008): 734-40.
- Grasso, D., K. Subramaniam, M. Butkus, K. Strevett, et J. Bergendahl. "A Review of Non-Dlvo Interactions in Environmental Colloidal Systems." *Rev Environ Sci Biotechnol* 1, no. 1 (2002): 17-38.

- Graves, L. M., L. O. Hesel, A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, M. I. Daneshvar, S. E. Roof, R. H. Orsi, *et al.* "*Listeria Marthii* Sp. Nov., Isolated from the Natural Environment, Finger Lakes National Forest." *Int J Syst Evol Micr* 60, no. 6 (2010): 1280-88.
- Gueriri, I., C. Cyncynatus, S. Dubrac, A. T. Arana, O. Dussurget, et T. Msadek. "The Degu Orphan Response Regulator of *Listeria Monocytogenes* Autorepresses Its Own Synthesis and Is Required for Bacterial Motility, Virulence and Biofilm Formation." *Microbiology* 154, no. Pt 8 (2008): 2251-64.
- Guilbaud, M., P. Piveteau, M. Desvaux, S. Brisse, et R. Briandet. "Exploring the Diversity of *Listeria Monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype." *Appl Environ Microbiol* 81, no. 5 (2015): 1813-9.
- Guillet, C., O. Join-Lambert, A. Le Monnier, A. Leclercq, F. Mechaï, M. F. Mamzer-Bruneel, M. K. Bielecka, *et al.* "Human Listeriosis Caused by *Listeria Ivanovii*." *Emerg infect Dis* 16, no. 1 (2010): 136.
- Haeghebaert, S, F Le Querrec, V Vaillant, E Delarocque Astagneau, et P Bouvet. "Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives En France En 1998." *BEH* 15 (2001): 1-12.
- Harmsen, M., M. Lappann, S. KnÄchel, et S. Molin. "Role of Extracellular DNA During Biofilm Formation by *Listeria Monocytogenes*." *Appl Environ Microb* 76, no. 7 (2010): 2271-79.
- Hazeleger, W. C., M. Dalvoorde, et R. R. Beumer. "Fluorescence Microscopy of NaCl-Stressed, Elongated *Salmonella* and *Listeria* Cells Reveals the Presence of Septa in Filaments." *Int J Food Microbiol* 112, no. 3 (2006): 288-90.
- Hébraud, M., et J. Guzzo. "The Main Cold Shock Protein of *Listeria Monocytogenes* Belongs to the Family of Ferritin-Like Proteins." *FEMS Microbiol Lett* 190 (2000): 29-34.
- Hefford, M. A., S. D'Aoust, T. D. Cyr, J. W. Austin, G. Sanders, E. Kheradpir, et M. L. Kalmokoff. "Proteomic and Microscopic Analysis of Biofilms Formed by *Listeria Monocytogenes* 568." *Can J Microbiol* 51, no. 3 (2005): 197-208.
- Herald, P. J., et E. A. Zottola. "Attachment of *Listeria Monocytogenes* to Stainless Steel Surfaces at Various Temperatures and Ph Values." *J Food Sci* 53, no. 5 (1988): 1549-62.
- Hermansson, M. "The DLvo Theory in Microbial Adhesion." *Colloid surface B* 14, no. 1-4 (1999): 105-19.

- Heukelekian, H., et A. Heller. "Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth." *J Bacteriol* 40, no. 4 (1940): 547-58.
- Hof, H., et J. Rocourt. "Is Any Strain of *Listeria Monocytogenes* Detected in Food a Health Risk?". *Int J Food Microbiol* 16, no. 3 (1992): 173-82.
- Hoffman, A. D., K. L. Gall, D. M. Norton, et M. Wiedmann. "*Listeria Monocytogenes* Contamination Patterns for the Smoked Fish Processing Environment and for Raw Fish." *J Food Prot* 66, no. 1 (2003): 52-60.
- Hoiby, N. "A Personal History of Research on Microbial Biofilms and Biofilm Infections." *Pathog Dis* 70, no. 3 (2014): 205-11.
- Holah, J. T., J. Bird, et K. E. Hall. "The Microbial Ecology of High-Risk, Chilled Food Factories; Evidence for Persistent *Listeria* Spp. And *Escherichia Coli* Strains." *J Appl Microbiol* 97, no. 1 (2004): 68-77.
- Holland, L. M., B. Conlon, et J. P. O'Gara. "Mutation of *Tago* Reveals an Essential Role for Wall Teichoic Acids in *Staphylococcus Epidermidis* Biofilm Development." *Microbiology* 157, no. Pt 2 (2011): 408-18.
- Hood, S. K., et E. A. Zottola. "Biofilms in Food Processing." *Food Control* 6, no. 1 (1995): 9-18.
- Hori, K., et S. Matsumoto. "Bacterial Adhesion: From Mechanism to Control." *Biochem Eng J* 48, no. 3 (2010): 424-34.
- Houry, A., R. Briandet, S. Aymerich, et M. Gohar. "Involvement of Motility and Flagella in *Bacillus Cereus* Biofilm Formation." *Microbiology* 156, no. Pt 4 (2010): 1009-18.
- Huang, Xuejun, et John D Helmann. "Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* sigma X factor using a consensus-directed search.." *J Mol Biol* 279, no. 1 (1998): 165-73.
- Hussain, M., J. G. Hastings, et P. J. White. "Comparison of Cell-Wall Teichoic Acid with High-Molecular-Weight Extracellular Slime Material from *Staphylococcus Epidermidis*." *J Med Microbiol* 37 (1992): 368-75.
- Institut de veille sanitaire. "Listériose."
<http://www.invs.sante.fr/Dossierthematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Listeriose/Donnees-epidemiologiques>.
- Jabbouri, S., et I. Sadovskaya. "Characteristics of the Biofilm Matrix and Its Role as a Possible Target for the Detection and Eradication of *Staphylococcus Epidermidis* Associated with Medical Implant Infections." *FEMS Immunol Med Microbiol* 59 (2010): 280-91.

- Jackson, D. W., K. Suzuki, L. Oakford, J. W. Simecka, M. E. Hart, et T. Romeo. "Biofilm Formation and Dispersal under the Influence of the Global Regulator Csra of *Escherichia Coli*." *J Bacteriol* 184, no. 1 (2002): 290-301.
- Jacobs, A., F. Lafolie, J. M. Herry, et M. Debroux. "Kinetic Adhesion of Bacterial Cells to Sand: Cell Surface Properties and Adhesion Rate." *Colloids Surf B Biointerfaces* 59, no. 1 (2007): 35-45.
- Jahn, A., T. Griebe, et P. H. Nielsen. "Composition of *Pseudomonas Putida* Biofilms: Accumulation of Protein in the Biofilm Matrix." *Biofouling* 14, no. 1 (1999): 49-57.
- Jordan, S. J., S. Perni, S. Glenn, I. Fernandes, M. Barbosa, M. Sol, R. P. Tenreiro, et al. "*Listeria Monocytogenes* Biofilm-Associated Protein (Bapl) May Contribute to Surface Attachment of *L. Monocytogenes* but Is Absent from Many Field Isolates." *Appl Environ Microbiol* 74, no. 17 (2008): 5451-6.
- Juste, A., B. P. Thomma, et B. Lievens. "Recent Advances in Molecular Techniques to Study Microbial Communities in Food-Associated Matrices and Processes." *Food Microbiol* 25, no. 6 (2008): 745-61.
- Kachlany, S. C., S. B. Levery, J. S. Kim, B. L. Reuhs, L. W. Lion, et W. C. Ghiorse. "Structure and Carbohydrate Analysis of the Exopolysaccharide Capsule of *Pseudomonas Putida* G7." *Environ Microbiol* 3, no. 12 (2001): 774-84.
- Kadam, S. R., H. M. den Besten, S. van der Veen, M. H. Zwietering, R. Moezelaar, et T. Abee. "Diversity Assessment of *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation: Impact of Growth Condition, Serotype and Strain Origin." *Int J Food Microbiol* 165, no. 3 (2013): 259-64.
- Kamisango, K., H. Fujii, H. Okumura, I. Saiki, Y. Araki, Y. Yamamura, et I. Azuma. "Structural and Immunochemical Studies of Teichoic Acid of *Listeria Monocytogenes*." *J Biochem* 93 (1983): 1401-09.
- Kamisango, K., M. Nagaoka, H. Fujii, et I. Azuma. "Enzyme Immunoassay of Teichoic Acids from *Listeria Monocytogenes*." *J Clin Microbiol* 21, no. 1 (1985): 135-37.
- Kathariou, S. "*Listeria Monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective." *J Food Protect* 65 (2002): 1811-29.
- Khamisse, E. "Etude Du Microbiote Susceptible De Persister Sur Les Surfaces D'un Atelier De La Filière Viande Bovine." (2012).
- Kogan, G., I. Sadovskaya, P. Chaignon, A. Chokr, et S. Jabbouri. "Biofilms of Clinical Strains of *Staphylococcus* That Do Not Contain Polysaccharide Intercellular Adhesin." *FEMS Microbiol Lett* 255, no. 1 (2006): 11-16.

- Koo, H., J. Xiao, M. I. Klein, et J. G. Jeon. "Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus Mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms." *J Bacteriol* 192, no. 12 (2010): 3024-32.
- Koseoglu, V. K., C. Heiss, P. Azadi, E. Topchiy, Z. T. Guvener, T. E. Lehmann, K. W. Miller, et M. Gomelsky. "*Listeria Monocytogenes* Exopolysaccharide: Origin, Structure, Biosynthetic Machinery and C-Di-Gmp-Dependent Regulation." *Mol Microbiol* 96, no. 4 (2015): 728-43.
- Kumar, C. G., et S. K. Anand. "Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: A Review." *Int J Food Microbiol* 42, no. 1-2 (1998): 9-27.
- Lang Halter, E., K. Neuhaus, et S. Scherer. "*Listeria Weihenstephanensis* Sp. Nov., Isolated from the Water Plant Lemna Trisulca Taken from a Freshwater Pond." *Int J Syst Evol Microbiol* 63, no. Pt 2 (2013): 641-7.
- Lappi, V. R., J. Thimothe, K. K. Nightingale, K. Gall, V. N. Scott, et M. Wiedmann. "Longitudinal Studies on *Listeria* in Smoked Fish Plants: Impact of Intervention Strategies on Contamination Patterns." *J Food Prot* 67, no. 11 (2004): 2500-14.
- Larousse. "Antonie Van Leeuwenhoek."
http://www.larousse.fr/encyclopedie/personnage/Antonie_Van_Leeuwenhoek/148268.
- Lasa, I., et J. R. Penades. "Bap: A Family of Surface Proteins Involved in Biofilm Formation." *Res Microbiol* 157, no. 2 (2006): 99-107.
- Latasa, C., C. Solano, J. R. Penades, et I. Lasa. "Biofilm-Associated Proteins." *C R Biol* 329, no. 11 (2006): 849-57.
- Lawrence, J. R., D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton, et D. E. Caldwell. "Optical Sectioning of Microbial Biofilms." *J Bacteriol* 173, no. 20 (1991): 6558-67.
- Leclercq, A., D. Clermont, C. Bizet, P. A. Grimont, A. Le Fleche-Mateos, S. M. Roche, C. Buchrieser, et al. "*Listeria Rocourtiae* Sp. Nov." *Int J Syst Evol Microbiol* 60, no. Pt 9 (2010): 2210-4.
- Lei, X. H., F. Fiedler, Z. Lan, et S. Kathariou. "A Novel Serotype-Specific Gene Cassette (*GltA-GltB*) Is Required for Expression of Teichoic Acid-Associated Surface Antigens in *Listeria Monocytogenes* of Serotype 4b." *J Bacteriol* 183, no. 4 (2001): 1133-9.
- Lemon, K. P., N. E. Freitag, et R. Kolter. "The Virulence Regulator Prfa Promotes Biofilm Formation by *Listeria Monocytogenes*." *J Bacteriol* 192, no. 15 (2010): 3969-76.
- Lemon, K. P., D. E. Higgins, et R. Kolter. "Flagellar Motility Is Critical for *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation." *J Bacteriol* 189, no. 12 (2007): 4418-24.

- Leriche, V., et B. Carpentier. "Viable but Non Culturable *Salmonella Typhimurium* within Single and Binary Species Biofilms in Response to Chlorine Treatment." *J Food Protect* 58 (1995): 1186-91.
- Lindback, T., M. E. Rottenberg, S. M. Roche, et L. M. Rorvik. "The Ability to Enter into an Avirulent Viable but Non-Culturable (Vbnc) Form Is Widespread among *Listeria Monocytogenes* Isolates from Salmon, Patients and Environment." *Vet Res* 41, no. 1 (2010): 10-1051
- Lindsay, D., V. S. Brozel, J. F. Mostert, et A. von Holy. "Differential Efficacy of a Chlorine Dioxide-Containing Sanitizer against Single Species and Binary Biofilms of a Dairy-Associated *Bacillus Cereus* and a *Pseudomonas Fluorescens* Isolate." *J Appl Microbiol* 92, no. 2 (2002): 352-61.
- Loncarevic, S., M.L. Danielsson-Tham, P. Gerner-Smidt, L. Sahlstrom, et W. Tham. "Potential Sources of Human Listeriosis in Sweden." *Food Microbiol* 15 (1998): 65-69.
- Longhi, C., G. L. Scoarughi, F. Poggiali, A. Cellini, A. Carpentieri, L. Seganti, P. Pucci, et al. "Protease Treatment Affects Both Invasion Ability and Biofilm Formation in *Listeria Monocytogenes*." *Microb Pathog* 45, no. 1 (2008): 45-52.
- Lorite, G. S., C. M. Rodrigues, A. A. de Souza, C. Kranz, B. Mizaikoff, et M. A. Cotta. "The Role of Conditioning Film Formation and Surface Chemical Changes on *Xylella Fastidiosa* Adhesion and Biofilm Evolution." *J Colloid Interface Sci* 359, no. 1 (2011): 289-95.
- Lunden, J., T. Autio, A. Markkula, S. Hellstrom, et H. Korkeala. "Adaptive and Cross-Adaptive Responses of Persistent and Non-Persistent *Listeria Monocytogenes* Strains to Disinfectants." *Int J Food Microbiol* 82, no. 3 (2003): 265-72.
- Lunden, J. M., M. K. Miettinen, T. J. Autio, et H. J. Korkeala. "Persistent *Listeria Monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface after Short Contact Times." *J Food Protect* 63, no. 9 (2000): 1204-07.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M. R. Parsek, K. Bayles, et D. J. Wozniak. "Assembly and Development of the *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Matrix." *PLoS Pathog* 5, no. 3 (2009): 27.
- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, et R. Laufs. "The Intercellular Adhesin Involved in Biofilm Accumulation of *Staphylococcus Epidermidis* Is a Linear Beta-1,6-Linked Glucosaminoglycan: Purification and Structural Analysis." *J Bacteriol* 178 (1996): 175-83.

- Maes, E. "La Résonance Magnétique Nucléaire."
<http://glycobase.univlille1.fr/documents/livreRMN.PDF>.
- Mai, T. L., et D. E. Conner. "Effect of Temperature and Growth Media on the Attachment of *Listeria Monocytogenes* to Stainless Steel." *Int J Food Microbiol* 120, no. 3 (2007): 282-6.
- Marsh, E. J., H. Luo, et H. Wang. "A Three-Tiered Approach to Differentiate *Listeria Monocytogenes* Biofilm-Forming Abilities." *FEMS Microbiol Lett* 228, no. 2 (2003): 203-10.
- Marshall, K. C., R. Stout, et R. Mitchell. "Selective Sorption of Bacteria from Seawater." *Can J Microbiol* 17, no. 11 (1971): 1413-6.
- Matsukawa, M., et E. P. Greenberg. "Putative Exopolysaccharide Synthesis Genes Influence *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Development." *J Bacteriol* 186, no. 14 (2004): 4449-56.
- McCollum, J. T., A. B. Cronquist, B. J. Silk, K. A. Jackson, K. A. O'Connor, S. Cosgrove, J. P. Gossack, et al. "Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Cantaloupe." *N Engl J Med* 369, no. 10 (2013): 944-53.
- McSwain, B. S., R. L. Irvine, M. Hausner, et P. A. Wilderer. "Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge." *Appl Environ Microbiol* 71, no. 2 (2005): 1051-7.
- Medeiros, Patricia M., et Bernd R. T. Simoneit. "Analysis of Sugars in Environmental Samples by Gas Chromatography–Mass Spectrometry." *J Chromatogr A* 1141, no. 2 (2007): 271-78.
- Midelet-Bourdin, G., G. Leleu, S. Copin, S. M. Roche, P. Velge, et P. Malle. "Modification of a Virulence-Associated Phenotype after Growth of *Listeria Monocytogenes* on Food." *J Appl Microbiol* 101, no. 2 (2006): 300-8.
- Midelet-Bourdin, G., G. Leleu, et P. Malle. "Evaluation of the International Reference Methods Nf En Iso 11290-1 and 11290-2 and an in-House Method for the Isolation of *Listeria Monocytogenes* from Retail Seafood Products in France." *J Food Protect* 70 (2007): 891-900.
- Midelet, G., et B. Carpentier. "Impact of Cleaning and Disinfection Agents on Biofilm Structure and on Microbial Transfer to a Solid Model Food." *J Appl Microbiol* 97, no. 2 (2004): 262-70.

- Milanov, D., R. Ašanin, B. Vidic', V. Katic', et N. Plavša. "Examination of the Capabilities of Attachment and Biofilm Formation of Different *Listeria Monocytogenes* Strains." *Biotech Anim Husbandry* 25, no. 5/6 (2009): 1255-65.
- Milillo, S. R., et M. Wiedmann. "Contributions of Six Lineage-Specific Internalin-Like Genes to Invasion Efficiency of *Listeria Monocytogenes*." *Foodborne Pathog Dis* 6, no. 1 (2009): 57-70.
- Moltz, Andrew G. "Formation of Biofilms by *Listeria Monocytogenes* under Various Growth Conditions." *J Food Protect* 68, no. 1 (2005): 92-97.
- Monk, I. R., G. M. Cook, B. C. Monk, et P. J. Bremer. "Morphotypic Conversion in *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation: Biological Significance of Rough Colony Isolates." *Appl Environ Microbiol* 70, no. 11 (2004): 6686-94.
- Møretrø, T., et S. Langsrud. "*Listeria Monocytogenes*: Biofilm Formation and Persistence in Food-Processing Environments." *Biofilms* 1, no. 02 (2004): 107-21.
- Morra, M., et C. Cassinelli. "Bacterial Adhesion to Polymer Surfaces: A Critical Review of Surface Thermodynamic Approaches." *J Biomater Sci Polym Ed* 9, no. 1 (1997): 55-74.
- Murray, E. G. D., R. A. Webb, et M. B. R. Swann. "A Disease of Rabbits Characterised by a Large Mononuclear Leucocytosis, Caused by a Hitherto Undescribed Bacillus *Bacterium Monocytogenes* (N. Sp.)." (1926): 407-439
- Nelson, K. E., D. E. Fouts, E. F. Mongodin, J. Ravel, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, D. A. Rasko, et al. "Whole Genome Comparisons of Serotype 4b and 1/2a Strains of the Food-Borne Pathogen *Listeria Monocytogenes* Reveal New Insights into the Core Genome Components of This Species." *Nucleic Acids Research* 32, no. 8 (2004): 2386-95.
- Neuhaus, F. C., et J. Baddiley. "A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria." *Microbiol Mol Biol Rev* 67, no. 4 (2003): 686-723.
- Nguyen, U. T., et L. L. Burrows. "Dnase I and Proteinase K Impair *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation and Induce Dispersal of Pre-Existing Biofilms." *Int J Food Microbiol* 187 (2014): 26-32.
- Nielsen, P. H., A. Jahn, et R. Palmgren. "Conceptual Model for Production and Composition of Exopolymers in Biofilms." *Water Sci Technol* 36, no. 1 (1997): 11-19.

- Nilsson, R. E., T. Ross, et J. P. Bowman. "Variability in Biofilm Production by *Listeria Monocytogenes* Correlated to Strain Origin and Growth Conditions." *Int J Food Microbiol* 150, no. 1 (2011): 14-24.
- Nocker, A., et A. K. Camper. "Novel Approaches toward Preferential Detection of Viable Cells Using Nucleic Acid Amplification Techniques." *FEMS Microbiol Lett* 291, no. 2 (2009): 137-42.
- Nocker, A., C. Y. Cheung, et A. K. Camper. "Comparison of Propidium Monoazide with Ethidium Monoazide for Differentiation of Live Vs. Dead Bacteria by Selective Removal of DNA from Dead Cells." *J Microbiol Methods* 67, no. 2 (2006): 310-20.
- Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, et D. Lillehaug. "Application of 5'-Nuclease Pcr for Quantitative Detection of *Listeria Monocytogenes* in Pure Cultures, Water, Skim Milk, and Unpasteurized Whole Milk." *Appl Environ Microbiol* 66, no. 10 (2000): 4266-71.
- Norwood, D. E., et A. Gilmour. "Adherence of *Listeria Monocytogenes* Strains to Stainless Steel Coupons." *J Appl Microbiol* 86, no. 4 (1999): 576-82.
- Norwood, D. E., et A. Gilmour. "The Differential Adherence Capabilities of Two *Listeria Monocytogenes* Strains in Monoculture and Multispecies Biofilms as a Function of Temperature." *Lett Appl Microbiol* 33, no. 4 (2001): 320-4.
- Nyfelt, A. "Etiologie De La Mononucléose Infectieuse." *C. R. Soc. Biol* 101 (1929): 590-91.
- O'Gara, James P. "Ica and Beyond: Biofilm Mechanisms and Regulation in *Staphylococcus Epidermidis* and *Staphylococcus Aureus*." *FEMS Microbiol Lett* 270 (2007): 179-88.
- Ochiai, Y., F. Yamada, M. Mochizuki, T. Takano, R. Hondo, et F. Ueda. "Biofilm Formation under Different Temperature Conditions by a Single Genotype of Persistent *Listeria Monocytogenes* Strains." *J Food Protect* 77 (2014): 133-40.
- Oliver, J. D. "The Viable but Nonculturable State in Bacteria." *J Microbiol* 43 (2005): 93-100.
- Palmer, J., S. Flint, et J. Brooks. "Bacterial Cell Attachment, the Beginning of a Biofilm." *J Ind Microbiol Biotechnol* 34, no. 9 (2007): 577-88.
- Pan, Y., et F. Breidt. "Enumeration of Viable *Listeria Monocytogenes* Cells by Real-Time Pcr with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells." *Appl Environ Microb* 73, no. 24 (2007): 8028-31.
- Pan, Y., F. Breidt, et S. Kathariou. "Competition of *Listeria Monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains in Mixed-Culture Biofilms." *Appl Environ Microb* 75 (2009): 5846-52.

- Paterson, J Stuart. "The Antigenic Structure of Organisms of the Genus *Listerella*." *J Pathol* 51, no. 3 (1940): 427-36.
- Patrone, V., R. Campana, L. Vallorani, S. Dominici, S. Federici, L. Casadei, A. M. Gioacchini, V. Stocchi, et W. Baffone. "Cadf Expression in *Campylobacter Jejuni* Strains Incubated under Low-Temperature Water Microcosm Conditions Which Induce the Viable but Non-Culturable (Vbnc) State." *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, no. 5 (2013): 979-88.
- Pelletier, C., C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux, et M. N. Bellon-Fontaine. "Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus Casei* Subsp. *Casei*, *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei*, and *Lactobacillus Rhamnosus* Strains." *Appl Environ Microbiol* 63, no. 5 (1997): 1725-31.
- Percival, S., S. Malic, H. Cruz, et D. Williams. "Introduction to Biofilms." Chap. 2 In *Biofilms and Veterinary Medicine* (2011): 41-68
- Perni, S., T. G. Aldsworth, S. J. Jordan, I. Fernandes, M. Barbosa, M. Sol, R. P. Tenreiro, et al. "The Resistance to Detachment of Dairy Strains of *Listeria Monocytogenes* from Stainless Steel by Shear Stress Is Related to the Fluid Dynamic Characteristics of the Location of Isolation." *Int J Food Microbiol* 116, no. 3 (2007): 384-90.
- Pirie, J. H. "The Genus *Listerella* Pirie." *Science* 91, no. 2364 (1940): 383.
- Poinsot, V., M.A. Carpéné, et F. Couderc. "Coupled Mass Spectrometric Strategies for the Determination of Carbohydrates at Very Low Concentrations: The Case of Polysaccharides Involved in the Molecular Dialogue between Plants and Rhizobia." *The Complex World of Polysaccharides*. (2012). doi:40581.
- Postollec, F., H. Falentin, S. Pavan, J. Combrisson, et D. Sohier. "Recent Advances in Quantitative Pcr (Qpcr) Applications in Food Microbiology." *Food Microbiol* 28, no. 5 (2011): 848-61.
- Priester, J. H., A. M. Horst, L. C. Van De Werfhorst, J. L. Saleta, L. A. K. Mertes, et P. A. Holden. "Enhanced Visualization of Microbial Biofilms by Staining and Environmental Scanning Electron Microscopy." *J Microbiol Meth* 68, no. 3 (2007): 577-87.
- Promadej, N., F. Fiedler, P. Cossart, S. Dramsi, et S. Kathariou. "Cell Wall Teichoic Acid Glycosylation in *Listeria Monocytogenes* Serotype 4b Requires *Gtca*, a Novel, Serogroup-Specific Gene." *J Bacteriol* 181 (1999): 418-25.

- Renier, S., M. Hebraud, et M. Desvaux. "Molecular Biology of Surface Colonization by *Listeria Monocytogenes*: An Additional Facet of an Opportunistic Gram-Positive Foodborne Pathogen." *Environ Microbiol* 13, no. 4 (2011): 835-50.
- Riedel, C. U., I. R. Monk, P. G. Casey, M. S. Waidmann, C. G. Gahan, et C. Hill. "Agr-Dependent Quorum Sensing Affects Biofilm Formation, Invasion, Virulence and Global Gene Expression Profiles in *Listeria Monocytogenes*." *Mol Microbiol* 71, no. 5 (2009): 1177-89.
- Rieu, A., R. Briandet, O. Habimana, D. Garmyn, J. Guzzo, et P. Piveteau. "*Listeria Monocytogenes* Egd-E Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains." *Appl Environ Microbiol* 74, no. 14 (2008): 4491-7.
- Rieu, A., S. Weidmann, D. Garmyn, P. Piveteau, et J. Guzzo. "Agr System of *Listeria Monocytogenes* Egd-E: Role in Adherence and Differential Expression Pattern." *Appl Environ Microbiol* 73, no. 19 (2007): 6125-33.
- Rocourt, J., Ch Jacquet, et A. Reilly. "Epidemiology of Human Listeriosis and Seafoods." *Int J Food Microbiol* 62, no. 3 (2000): 197-209.
- Rocourt, J., A. Schrettenbrunner, et H. P. Seeliger. "[Biochemical Differentiation of the "*Listeria Monocytogenes*" (Sensu Lato) Genomic Groups]." *Ann Microbiol* 1 (1983): 65-71.
- Roux, Agnès, et Jean-Marc Ghigo. "Bacterial Biofilms."
<http://hdl.handle.net/2042/47842files/18/47842.html>.
- Ruiz-Matute, A. I., O. Hernandez-Hernandez, S. Rodriguez-Sanchez, M. L. Sanz, et I. Martinez-Castro. "Derivatization of Carbohydrates for Gc and Gc-Ms Analyses." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, no. 17-18 (2011): 1226-40.
- Russell, A. D., et N. J. Russell. "Biocides: Activity, Action and Resistance." Paper presented at the Symposia society for general microbiology, 1995.
- Ryder, Cynthia, Matthew Byrd, et Daniel J. Wozniak. "Role of Polysaccharides in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Development." *Curr Opin Microbiol* 10 (2007): 644-48.
- Sadovskaya, I. "Exopolysaccharide Quantification." *Methods Mol Biol* (2014): 0473-0_29.
- Sadovskaya, I., E. Vinogradov, J. Li, et S. Jabbouri. "Structural Elucidation of the Extracellular and Cell-Wall Teichoic Acids of *Staphylococcus Epidermidis* Rp62a, a Reference Biofilm-Positive Strain." *Carbohydr Res* 339, no. 8 (2004): 1467-73.

- Sadovskaya, I, E. Vinogradov, S. Flahaut, G. Kogan, et S. Jabbouri. "Extracellular Carbohydrate-Containing Polymers of a Model Biofilm-Producing Strain, *Staphylococcus Epidermidis* Rp62a." *Infection and Immunity* 73 (2005): 3007-17.
- Salamina, G., E. Dalle Donne, A. Niccolini, G. Poda, D. Cesaroni, M. Bucci, R. Fini, *et al.* "A Foodborne Outbreak of Gastroenteritis Involving *Listeria Monocytogenes*." *Epidemiol Infect* 117, no. 3 (1996): 429-36.
- Salazar, J. K., Z. Wu, W. Yang, N. E. Freitag, M. L. Tortorello, H. Wang, et W. Zhang. "Roles of a Novel Crp/Fnr Family Transcription Factor Lmo0753 in Soil Survival, Biofilm Production and Surface Attachment to Fresh Produce of *Listeria Monocytogenes*." *PLoS One* 8, no. 9 (2013).
- Sand, W., et T. Gehrke. "Extracellular Polymeric Substances Mediate Biobleaching/Biocorrosion Via Interfacial Processes Involving Iron(III) Ions and Acidophilic Bacteria." *Res Microbiol* 157, no. 1 (2006): 49-56.
- Sauer, K., M. C. Cullen, A. H. Rickard, L. A. Zeef, D. G. Davies, et P. Gilbert. "Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas Aeruginosa* Pao1 Biofilm." *J Bacteriol* 186, no. 21 (2004): 7312-26.
- Scallan, Elaine, Patricia M Griffin, Frederick J Angulo, Robert V Tauxe, et Robert M Hoekstra. "Foodborne Illness Acquired in the United States Unspecified Agents." *Emerg infect Dis* 17, no. 1 (2011): 16.
- Schmitt, J., et H. C. Flemming. "Water Binding in Biofilms." *Wat Sci Tech* 39, no. 7 (1999): 77-82.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, et K. W. Eliceiri. "Nih Image to Imagej: 25 Years of Image Analysis." *Nat Methods* 9, no. 7 (2012): 671-5.
- Seeliger, H. P. R., et K. Hohne. "Chapter II Serotyping of *Listeria Monocytogenes* and Related Species." *Method Microbiol* (1979): 31-49,.
- Sela, S., S. Frank, E. Belausov, et R. Pinto. "A Mutation in the *Luxs* Gene Influences *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation." *Appl Environ Microbiol* 72, no. 8 (2006): 5653-8.
- Sheng, X., Y. P. Ting, et S. O. Pehkonen. "Force Measurements of Bacterial Adhesion on Metals Using a Cell Probe Atomic Force Microscope." *J Colloid Interface Sci* 310, no. 2 (2007): 661-9.
- Signoretto, C., G. Burlacchini, M. M. Lleo, C. Pruzzo, M. Zampini, L. Pane, G. Franzini, et P. Canepari. "Adhesion of *Enterococcus Faecalis* in the Nonculturable State to Plankton

- Is the Main Mechanism Responsible for Persistence of This Bacterium in Both Lake and Seawater." *Appl Environ Microbiol* 70, no. 11 (2004): 6892-6.
- Smoot, L. M., et M. D. Pierson. "Effect of Environmental Stress on the Ability of *Listeria Monocytogenes* Scott a to Attach to Food Contact Surfaces." *J Food Prot* 61, no. 10 (1998): 1293-8.
- Spears, P. A., M. M. Suyemoto, A. M. Palermo, J. R. Horton, T. S. Hamrick, E. A. Havell, et P. E. Orndorff. "A *Listeria Monocytogenes* Mutant Defective in Bacteriophage Attachment Is Attenuated in Orally Inoculated Mice and Impaired in Enterocyte Intracellular Growth." *Infect Immun* 76, no. 9 (2008): 4046-54.
- Stephan, Roger, Denise Althaus, Sabine Kiefer, Angelika Lehner, Christoph Hatz, Claudia Schmutz, Marianne Jost, et al. "Foodborne Transmission of *Listeria Monocytogenes* Via Ready-to-Eat Salad: A Nationwide Outbreak in Switzerland, 2013–2014." *Food Control* 57, no. 0 (2015): 14-17.
- Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs, et P. R. Reeves. "Organization of the *Escherichia Coli* K-12 Gene Cluster Responsible for Production of the Extracellular Polysaccharide Colanic Acid." *J Bacteriol* 178, no. 16 (1996): 4885-93.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, et J. W. Costerton. "Biofilms as Complex Differentiated Communities." *Annu Rev Microbiol* 56 (2002): 187-209.
- Sulaeman, S., M. Hernould, A. Schaumann, L. Coquet, J. M. Bolla, E. De, et O. Tresse. "Enhanced Adhesion of *Campylobacter Jejuni* to Abiotic Surfaces Is Mediated by Membrane Proteins in Oxygen-Enriched Conditions." *PLoS One* 7, no. 9 (2012): 28.
- Sutherland, I. "Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework." *Microbiology* 147 (2001a): 3-9.
- Sutherland, I. W. "The Biofilm Matrix--an Immobilized but Dynamic Microbial Environment." *Trends Microbiol* 9, no. 5 (2001b): 222-7.
- Swaminathan, Bala, et Peter Gerner-Smidt. "The Epidemiology of Human Listeriosis." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 9 (2007): 1236-43.
- Swoboda, J. G., J. Campbell, T. C. Meredith, et S. Walker. "Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition." *ChemBiochem* 11, no. 1 (2010): 35-45.
- Sylla, Yahaya. "Nettoyage En Place Des Lignes Agro-Industrielles : Etude Cinétique D'élimination Des Biofilms Négatifs Au Sein Des Installations Fermées Dans Les Industries Agroalimentaires." (2011).

- Tabak, M., K. Scher, E. Hartog, U. Romling, K. R. Matthews, M. L. Chikindas, et S. Yaron. "Effect of Triclosan on *Salmonella Typhimurium* at Different Growth Stages and in Biofilms." *FEMS Microbiol Lett* 267, no. 2 (2007): 200-6.
- Takahashi, H., S. Miya, K. Igarashi, T. Suda, S. Kuramoto, et B. Kimura. "Biofilm Formation Ability of *Listeria Monocytogenes* Isolates from Raw Ready-to-Eat Seafood." *J Food Prot* 72, no. 7 (2009): 1476-80.
- Tamburini, S., A. Ballarini, G. Ferrentino, A. Moro, P. Foladori, S. Spilimbergo, et O. Jousson. "Comparison of Quantitative Pcr and Flow Cytometry as Cellular Viability Methods to Study Bacterial Membrane Permeabilization Following Supercritical Co2 Treatment." *Microbiology* 159, no. Pt 6 (2013): 1056-66.
- Tham, W., H. Ericsson, S. Loncarevic, H. Unnerstad, et M. L. Danielsson-Tham. "Lessons from an Outbreak of Listeriosis Related to Vacuum-Packed Gravad and Cold-Smoked Fish." *Int J Food Microbiol* 62, no. 3 (2000): 173-5.
- Thomas, V. C., L. R. Thurlow, D. Boyle, et L. E. Hancock. "Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus Faecalis* Extracellular Proteases Influences Biofilm Development." *J Bacteriol* 190, no. 16 (2008): 5690-8.
- Thormann, K. M., R. M. Saville, S. Shukla, et A. M. Spormann. "Induction of Rapid Detachment in *Shewanella Oneidensis* Mr-1 Biofilms." *J Bacteriol* 187, no. 3 (2005): 1014-21.
- Tiensuu, T., C. Andersson, P. Ryden, et J. Johansson. "Cycles of Light and Dark Co-Ordinate Reversible Colony Differentiation in *Listeria Monocytogenes*." *Mol Microbiol* 87, no. 4 (2013): 909-24.
- Todhanakasem, T., et G. M. Young. "Loss of Flagellum-Based Motility by *Listeria Monocytogenes* Results in Formation of Hyperbiofilms." *J Bacteriol* 190, no. 17 (2008): 6030-4.
- Toledo-Arana, A., N. Merino, M. Vergara-Irigaray, M. Debarbouille, J. R. Penades, et I. Lasa. "*Staphylococcus Aureus* Develops an Alternative, Ica-Independent Biofilm in the Absence of the Arlrs Two-Component System." *J Bacteriol* 187, no. 15 (2005): 5318-29.
- Tourdjman, M., E. Laurent, et A. Leclercq. "Listériose Humaine: Une Zoonose D'origine Alimentaire." *Revue Francophone des Laboratoires* 2014, no. 464, Part 1 (2014): 37-44.
- Tresse, O., V. Lebret, T. Benezech, et C. Faille. "Comparative Evaluation of Adhesion, Surface Properties, and Surface Protein Composition of *Listeria Monocytogenes*

- Strains after Cultivation at Constant Ph of 5 and 7." *J Appl Microbiol* 101, no. 1 (2006): 53-62.
- Tresse, O., K. Shannon, A. Pinon, P. Malle, M. Vialette, et G. Midelet-Bourdin. "Variable Adhesion of *Listeria Monocytogenes* Isolates from Food-Processing Facilities and Clinical Cases to Inert Surfaces." *J Food Prot* 70, no. 7 (2007): 1569-78.
- Uchikawa, K., I. Sekikawa, et I. Azuma. "Structural Studies on Teichoic Acids in Cell Walls of Several Serotypes of *Listeria Monocytogenes*." *J Biochem* 99 (1986): 315-27.
- Van Houdt, R., et C. W. Michiels. "Biofilm Formation and the Food Industry, a Focus on the Bacterial Outer Surface." *J Appl Microbiol* 109, no. 4 (2010): 1117-31.
- Van Oss, C. J., R. J. Good, et M. K. Chaudhury. "The Role of Van Der Waals Forces and Hydrogen Bonds in "Hydrophobic Interactions" between Biopolymers and Low Energy Surfaces." *J. Colloid Interface Sci* 111, no. 2 (1986): 378-90.
- van Schaik, E. J., C. L. Giltner, G. F. Audette, D. W. Keizer, D. L. Bautista, C. M. Slupsky, B. D. Sykes, et R. T. Irvin. "DNA Binding: A Novel Function of *Pseudomonas Aeruginosa* Type Iv Pili." *J Bacteriol* 187, no. 4 (2005): 1455-64.
- Vaningelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings, et L. De Vuyst. "Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus Thermophilus* Strains Is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics." *Appl Environ Microbiol* 70, no. 2 (2004): 900-12.
- Vatanyoopaisarn, S., A. Nazli, C. E. Dodd, C. E. Rees, et W. M. Waites. "Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria Monocytogenes* to Stainless Steel." *Appl Environ Microbiol* 66, no. 2 (2000): 860-3.
- Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, et J. Kreft. "*Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants." *Clin Microbiol Rev* 14, no. 3 (2001): 584-640.
- Vergara-Irigaray, M., T. Maira-Litran, N. Merino, G. B. Pier, J. R. Penades, et I. Lasa. "Wall Teichoic Acids Are Dispensable for Anchoring the Pnag Exopolysaccharide to the *Staphylococcus Aureus* Cell Surface." *Microbiology* 154, no. Pt 3 (2008): 865-77.
- Vinogradov, E., F. Valence, E. Maes, I. Jebava, V. Chuat, S. Lortal, T. Grard, Y. Guerardel, et I. Sadvovskaya. "Structural Studies of the Cell Wall Polysaccharides from Three Strains of *Lactobacillus Helveticus* with Different Autolytic Properties: Dpc4571, Broi, and Lh1." *Carbohydr Res* 379 (2013): 7-12.

- Vinogradov, E., I. Sadovskaya, J. Li, et S. Jabbouri. "Structural Elucidation of the Extracellular and Cell-Wall Teichoic Acids of *Staphylococcus Aureus* Mn8m, a Biofilm Forming Strain." *Carbohydr Res* 341 (2006): 738-43.
- Wang, X., J. F. Preston, et T. Romeo. "The Pgaabcd Locus of *Escherichia Coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation." *J Bacteriol* 186 (2004): 2724-34.
- Weidenmaier, C., et A. Peschel. "Teichoic Acids and Related Cell-Wall Glycopolymers in Gram-Positive Physiology and Host Interactions." *Nat Rev Microbiol* 6, no. 4 (2008): 276-87.
- Weller, D., A. Andrus, M. Wiedmann, et H. C. den Bakker. "*Listeria Booriae* Sp. Nov. And *Listeria Newyorkensis* Sp. Nov., from Food Processing Environments in the USA." *Int J Syst Evol Microbiol* 65, no. Pt 1 (2015): 286-92.
- Wendlinger, G., M. J. Loessner, et S. Scherer. "Bacteriophage Receptors on *Listeria Monocytogenes* Cells Are the N-Acetylglucosamine and Rhamnose Substituents of Teichoic Acids or the Peptidoglycan Itself." *Microbiology* 142, no. Pt 4 (1996): 985-92.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, et J. S. Mattick. "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation." *Science* 295, no. 5559 (2002).
- Wiedmann, M. "Molecular Subtyping Methods for *Listeria Monocytogenes*." *Journal of AOAC International* 85, no. 2 (2002): 524-31.
- Wimpenny, J. "An Overview of Biofilms as Functional Communities." *Community Structure and Co-operation in Biofilms* 59, (2000).
- Withers, T. R., Y. Yin, et H. D. Yu. "Identification of Novel Genes Associated with Alginate Production in *Pseudomonas Aeruginosa* Using Mini-Himar1 Mariner Transposon-Mediated Mutagenesis." *J Vis Exp* 10, no. 85 (2014): 51346.
- Wolffs, P., B. Norling, et P. Radstrom. "Risk Assessment of False-Positive Quantitative Real-Time Pcr Results in Food, Due to Detection of DNA Originating from Dead Cells." *J Microbiol Methods* 60, no. 3 (2005): 315-23.
- Wu, J., et C. Xi. "Evaluation of Different Methods for Extracting Extracellular DNA from the Biofilm Matrix." *Appl Environ Microb* 75, no. 16 (2009): 5390-95.
- Wulff, G., L. Gram, P. Ahrens, et B. F. Vogel. "One Group of Genetically Similar *Listeria Monocytogenes* Strains Frequently Dominates and Persists in Several Fish Slaughter- and Smokehouses." *Appl Environ Microbiol* 72, no. 6 (2006): 4313-22.

- Xiaoxia, S., T. Y. Peng, et P. S. Olavi. "Direct Force Measurement of Bacteria Adhesion on Metal in Aqueous Media." *Water Sci Technol* 54, no. 9 (2006): 17-25.
- Yildiz, F., J. Fong, I. Sadvskaya, T. Grard, et E. Vinogradov. "Structural Characterization of the Extracellular Polysaccharide from *Vibrio Cholerae* O1 El-Tor." *PLoS ONE* 9, no. 1 (2014).
- Zameer, F., S. Gopal, G. Krohne, et J. Kreft. "Development of a Biofilm Model for *Listeria Monocytogenes* Egd-E." *World J Microbiol Biotechnol* 26, no. 6 (2010a): 1143-47.
- Zameer, Farhan, Shubha Gopal, Georg Krohne, et Jürgen Kreft. "Development of a Biofilm Model for *Listeria Monocytogenes* EGD-e." *World J Microbiol Biotechnol* 26 (2010b): 1143-47.
- Zhang, Z., H. Liu, Y. Lou, L. Xiao, C. Liao, P. K. Malakar, Y. Pan, et Y. Zhao. "Quantifying Viable *Vibrio Parahaemolyticus* and *Listeria Monocytogenes* Simultaneously in Raw Shrimp." *Appl Microbiol Biotechnol* 99, no. 15 (2015a): 6451-62.
- Zhang, Z., W. Liu, H. Xu, Z. P. Aguilar, N. P. Shah, et H. Wei. "Propidium Monoazide Combined with Real-Time Pcr for Selective Detection of Viable *Staphylococcus Aureus* in Milk Powder and Meat Products." *J Dairy Sci* 98, no. 3 (2015b): 1625-33.
- Zhou, Q., F. Feng, L. Wang, X. Feng, X. Yin, et Q. Luo. "Virulence Regulator Prfa Is Essential for Biofilm Formation in *Listeria Monocytogenes* but Not in *Listeria Innocua*." *Curr Microbiol* 63, no. 2 (2011): 186-92.
- Zobell, C. E. "The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity." *J Bacteriol* 46, no. 1 (1943): 39-56.

ANNEXES

Annexe 1 : Epidémies nationales et internationales de listériose, 1981-2013. Modifié à partir de Tourdjman, et al. (2014).

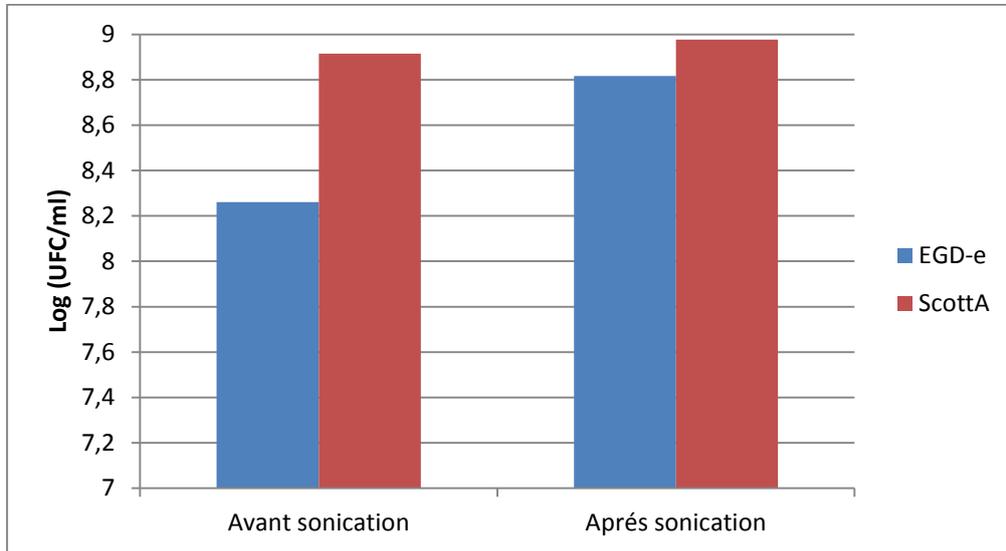
Pays	Année	Nb de cas	Aliment incriminé
Canada	1981	41	Coleslaw
USA	1983	49	Lait pasteurisé
Suisse	1983	122	Vacherin Mont d'Or
USA	1985	142	Fromage mexicain
Royaume-Uni	1987	366	Pâté
USA	1989	10	Crevettes
Danemark	1989	26	Bleu
France	1992	279	Langue de porc en gelée
France	1993	38	Rillettes
Italie	1993	18	Salade de riz
France	1995	36	Brie
France	1997	14	Pont-Lévêque
USA	1998	108	Hot dogs
France	1999	4	Epoisses
Finlande	1999	25	Beurre
France	2000	32	Langue de porc en gelée
Nouvelle-Zélande	2000	32	Jambon
France	2000	10	Rillettes
USA	2000	30	Charcuterie de volaille
USA	2000	13	Fromage mexicain
Suède	2001	48	Fromage
France	2002	11	Tartinette
USA	2002	54	Charcuterie de dinde
Canada	2002	17	Fromage au lait cru
France	2003	4	Mortadelle
USA	2003	12	Fromage mexicain
USA	2006	108	Saucisses
Canada	2008	57	Viande rôti
USA	2011	147	Melons
USA	2012	20	Ricotta
France	2012	10	Brie
France	2013	10	Quenelles

Annexe 2 : Composition du milieu de culture MCDB 202 (Cryo bio System).

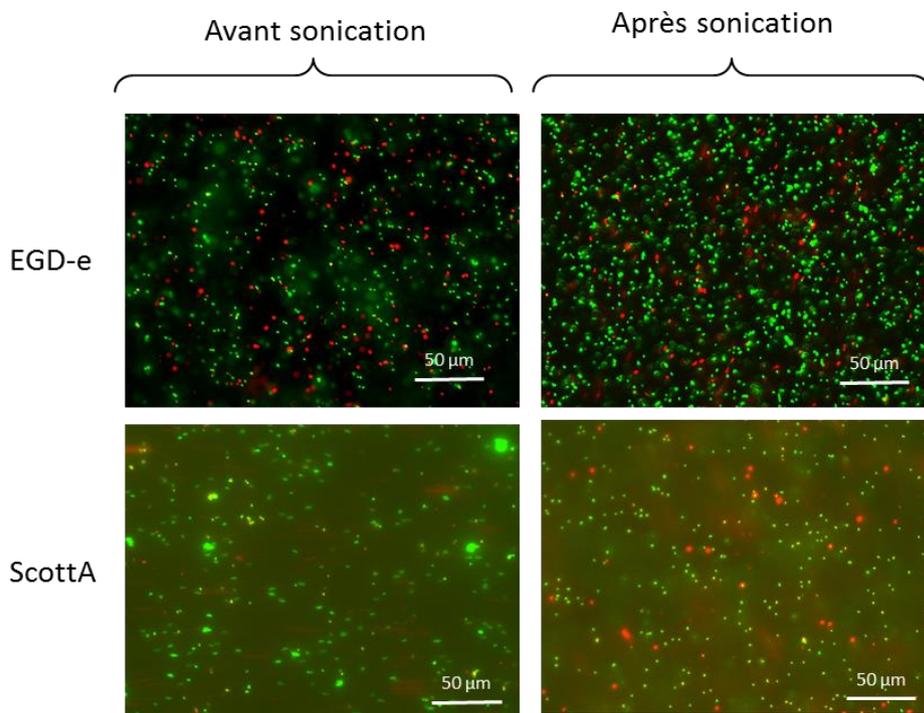
Composants	Formule CryoBioSystem (mg/L)
Ammonium Metavandate	0.000585
Ammonium Molybdate	0.0012359
Calcium Chloride•2H ₂ O	294
Cupric Sulfate •5H ₂ O	0.0002497
Fer sulfate	1,39
Magnesium Sulfate	189
Manganese Sulfate•5H ₂ O	0.0001205
Nickel Chloride Hexahydrate	0.0000011885
Potassium Chloride	224
Potassium Phosphate Mono	68.05
Sodium Chloride	7599
Sodium Metasilicate•9H ₂ O	0.1421
Sodium Phosphate Dibasic	71.05
oxyde de selenium (H ₂ SeO ₃)	0.00789
Stannous Chloride Dihydrate	0.000001128
Zinc Sulfate•7H ₂ O	0.02875
Amino Acids:	
L-Alanine	8.9
L-Arginine	56
L-Asparagine	132.1
L-Aspartic Acid	13.31
50 (Lcysteine monohydrate HCl)	24.44
L-Glutamic Acid	14.71
L-Glutamine	365
Glycine	7.51
L-Histidine	15.52
L-Isoleucine	13.12
L-Leucine	39.36
L-Lysine	29.24
L-Methionine	4.48
L-Phenylalanine	4.96
L-Proline	5.76
L-Serine	31.53
L-Threonine	35.73
L-Tryptophan	6.13
L-Tyrosine	9.06
L-Valine	35.16
Vitamins:	
Biotin	0.00733
Choline Chloride	13.96
Vitamin B12	0.1355
Inositol	18.02
Nicotinamide	6.1
D-Pantothenic Acid•Ca	0.2383
Pyridoxine•HCl	0.0616
Riboflavin	0.1129
Thiamine•HCl	0.337
Autre:	
Adenine	0.1350
Thymidine	0.07266
D-Glucose	1440.0
HEPES Free Acid	7149.0
Linoleic Acid	0.0561
Acide dl tiocique	0,002
Phenol Red, Sodium	1.242
Putrescine•2HCl	0.0001611
Sodium Pyruvate	55.0

Annexe 3: Impact de la sonication du biofilm sur la viabilité des cellules de *L. monocytogenes*. A) Dénombrement des populations bactériennes sur milieux gélosés TSAYe avant et après sonication des biofilms des souches EGD-e et de ScottA. B) Observation par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des biofilms resuspendus avant et après sonication.

A



B



Annexe 4: Composition du milieu de culture MCDB 202 (US Biological).

Corposant (mg/L)	
Inorganic Salts:	
Ammonium Metavandate	0.000585
Ammonium Molybdate	0.0012359
Calcium Chloride•2H2O	22.0
Cupric Sulfate •5H2O	0.0002497
Ferric Nitrate•9H2O	1.39
Magnesium Sulfate	180.57
Manganese Sulfate•5H2O	0.0001205
Nickel Chloride Hexahydrate	0.0000011885
Potassium Chloride	186.25
Potassium Phosphate Mono	68.05
Sodium Chloride	7183.2
Sodium Metasilicate•9H2O	0.1421
Sodium Phosphate Dibasic	71.05
Sodium Selenite	0.00789
Stannous Chloride Dihydrate	0.000001128
Zinc Sulfate•7H2O	0.02875
Amino Acids:	
L-Alanine	8.9
L-Arginine	52.26
L-Asparagine	132.1
L-Aspartic Acid	13.31
L-Cysteine	24.44
L-Glutamic Acid	14.71
L-Glutamine	146.0
Glycine	7.51
L-Histidine	15.52
L-Isoleucine	13.12
L-Leucine	39.36
L-Lysine	29.24
L-Methionine	4.48
L-Phenylalanine	4.96
L-Proline	5.76
L-Serine	31.53
L-Threonine	35.73
L-Tryptophan	6.13
L-Tyrosine	9.06
L-Valine	35.16
Vitamins:	
Biotin	0.00733
Choline Chloride	13.96
Vitamin B12	0.1355
Folinic Acid, Calcium	0.0006016
Myo-Inositol	18.02
Nicotinamide	6.1
D-Pantothenic Acid•Ca	0.2383
Pyridoxine•HCl	0.0616
Riboflavin	0.1129
Thiamine•HCl	0.337
Other:	
Adenine	0.1350
Thymidine	0.07266
D-Glucose	1440.0
HEPES Free Acid	7149.0
Linoleic Acid	0.0561
Lipoic Acid	0.00206
Phenol Red, Sodium	1.242
Putrescine•2HCl	0.0001611
Sodium Pyruvate	55.0
Total:	17.03 g/litre

Annexe 5: Protocole d'extraction d'ADN du kit DNeasy Blood & Tissue.

Matériel nécessaire

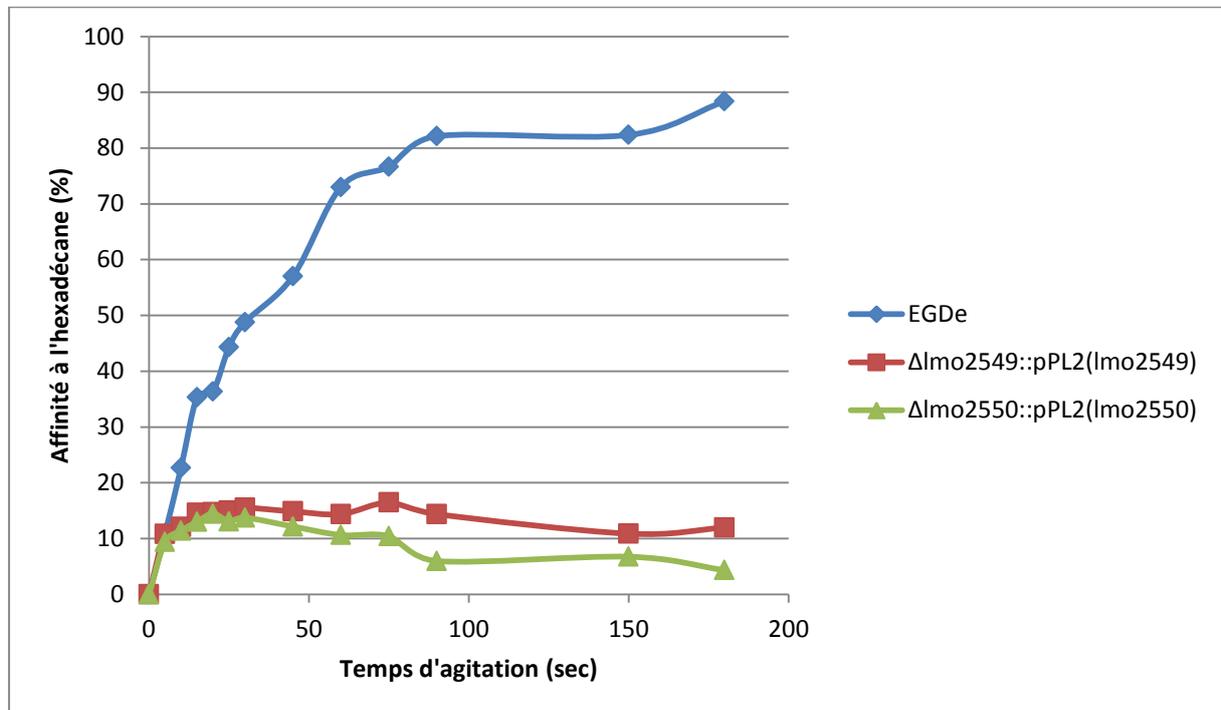
- Tubes microfuges de 2 ml
- Tubes eppendorf de 1,5 ml
- Bain marie à 56°C
- éthanol absolu
- centrifugeuse

A préparer

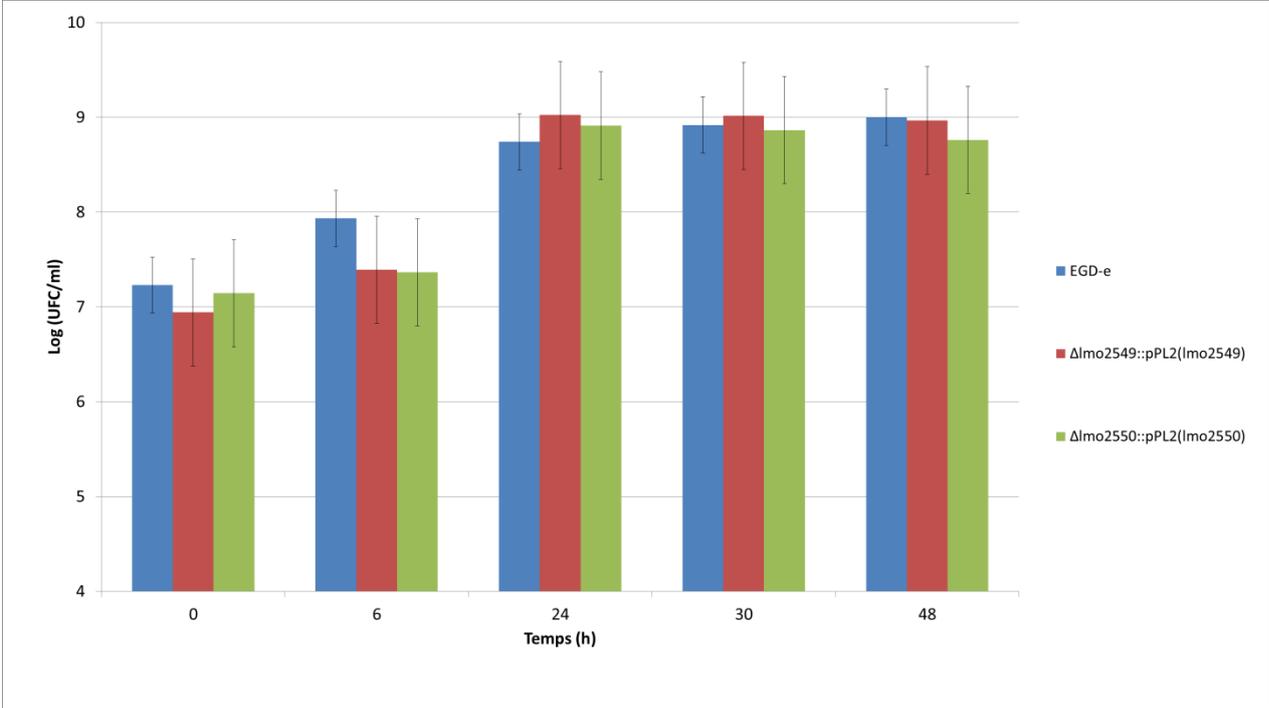
- Tampons AW1 et AW2 doivent être dilués à l'éthanol absolu avant leur première utilisation comme indiqué sur les flacons. Les tampons seront stables pendant 1 an à une température de 15-25°C
- Protéinase K stable à 15-25°C; si la température est >25°C, la stocker à 2-8°C.
 - Resuspendre le culot de bactéries dans 180 µl de tampon ATL.
 - Ajouter 20 µl de Protéinase K
 - Vortexer
 - Incuber à 56 °C 3 H pour une lyse complète
 - Ajouter 4 µl de Rnase A
 - Vortexer et laisser incuber 2 min à T° ambiante
 - Vortexer 15 sec
 - Ajouter 200 µl de tampon AL
 - Vortexer
 - Ajouter 200 µl d'éthanol absolu
 - Vortexer immédiatement après l'ajout de l'éthanol
 - Prélever la mixture et la déposer dans une colonne Dneasy Mini spin placée sur un tube de 2 ml
 - Centrifuger 1 min à 8000 rpm
 - Mettre la colonne dans un nouveau tube de 2 ml
 - Ajouter 500 µl de tampon AW1
 - Centrifuger 1 min à 8000 rpm
 - Mettre la colonne dans un nouveau tube de 2 ml
 - Ajouter 500 µl de tampon AW2
 - Centrifuger 3 min à 14000 rpm pour sécher la membrane
 - Placer la colonne sur un nouveau tube de 1.5 ml (ou 2 ml)
 - Ajouter 50 µl de tampon AE pour éluer l'ADN capté par la colonne
 - Incuber à T° ambiante 1 min
 - Centrifuger 1 min à 8000 rpm
 - Jeter la colonne
 - Fermer le tube qui contient l'ADN

NB : Il est possible de réaliser une 2nde élution dans un nouveau tube pour augmenter la quantité d'ADN extrait (Ajouter 50 µl de tampon AE, incuber à T° ambiante 1 min, centrifuger 1 min à 8000 rpm)

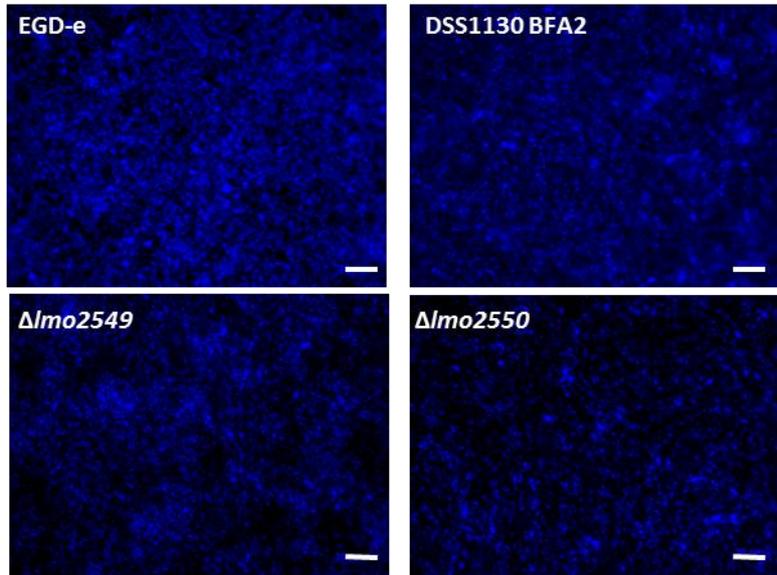
Annexe 6: Affinité à l'hexadécane des mutants complémentés EGD Δ Imo2549::pLIV2(Imo2549) et EGD Δ Imo2550::pLIV2(Imo2550) et de la souche sauvage EGD-e après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202 (supplémenté ou non en Cm à 10 μ g/ml).



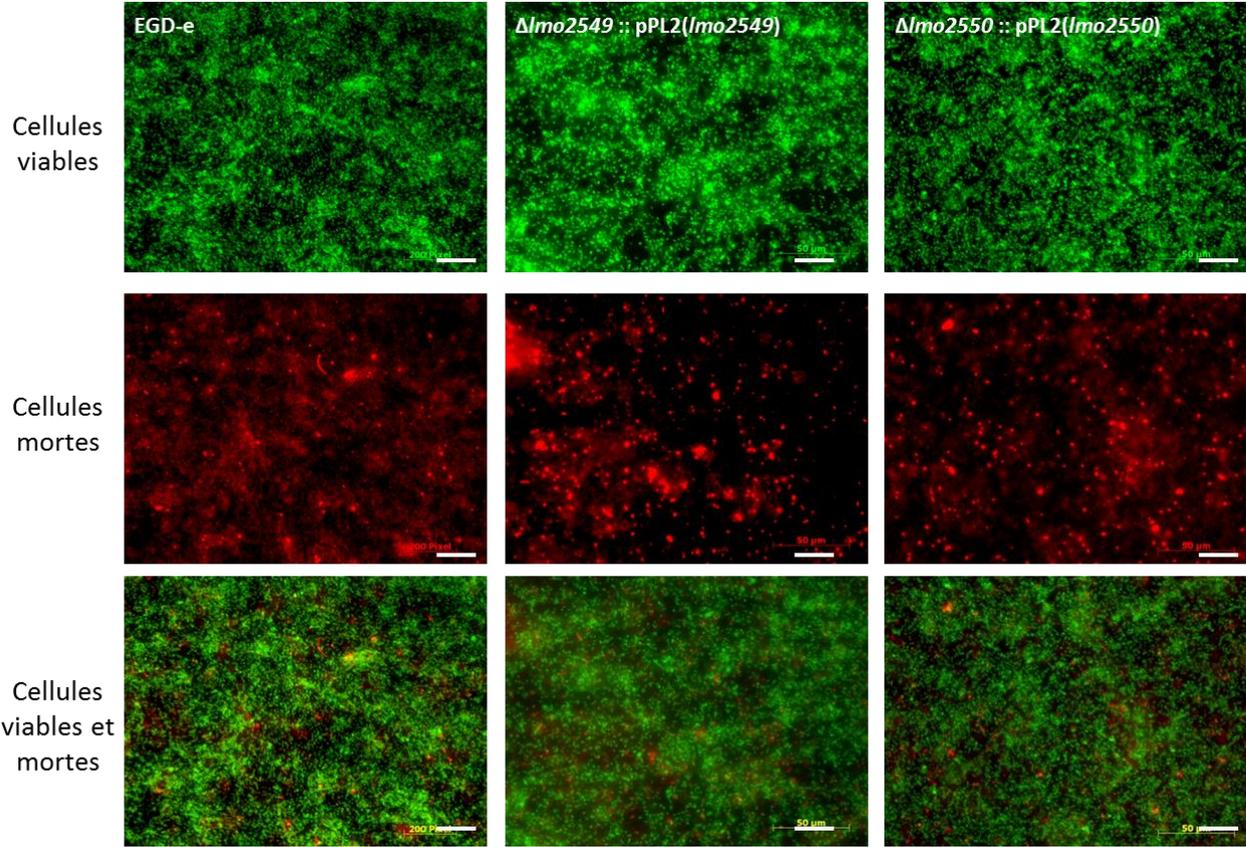
Annexe 7: Suivit de croissance par dénombrement sur milieu gélosé TSAYe (supplémenté ou non en Cm à 10µg/ml) les mutants complémentés EGD*e*Δ*Imo2549*::pLIV2(*Imo2549*) et EGD*e*Δ*Imo2550*::pLIV2(*Imo2550*) et de la souche sauvage EGD-e en culture planctoniques dans le milieu MCDB 202 (supplémenté ou non en Cm à 10µg/ml) durant 48h à 30°C. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance.



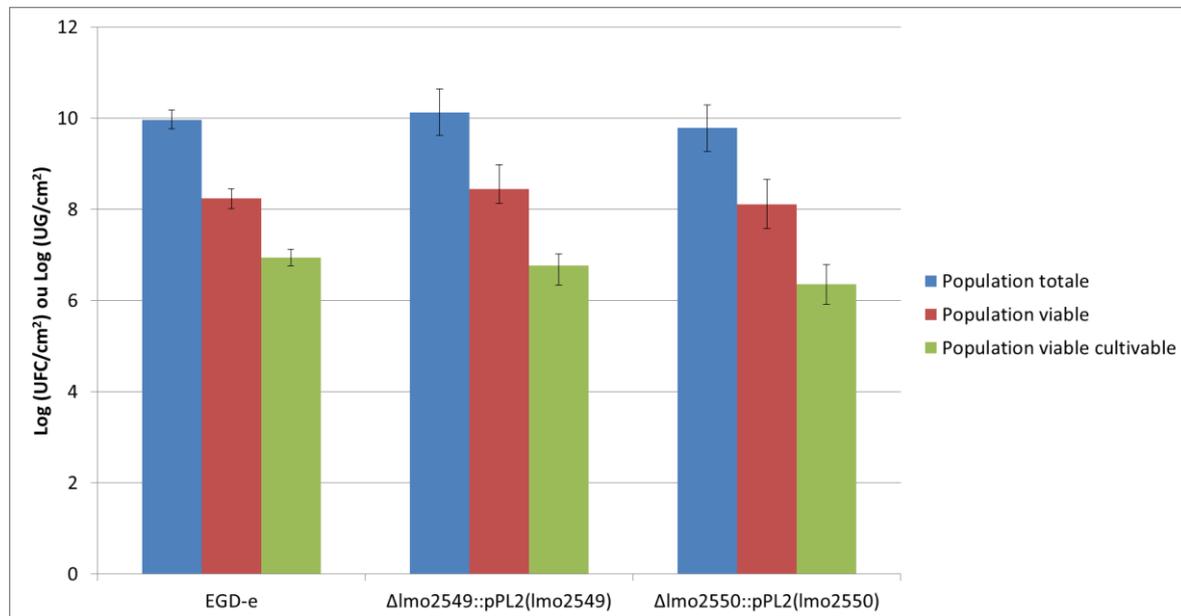
Annexe 8 : Observation par microscopie en épifluorescence après coloration au DAPI des biofilms de 48h des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$ et $\Delta lmo2550$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202. Les barres blanches représentent l'échelle à 20 μm .



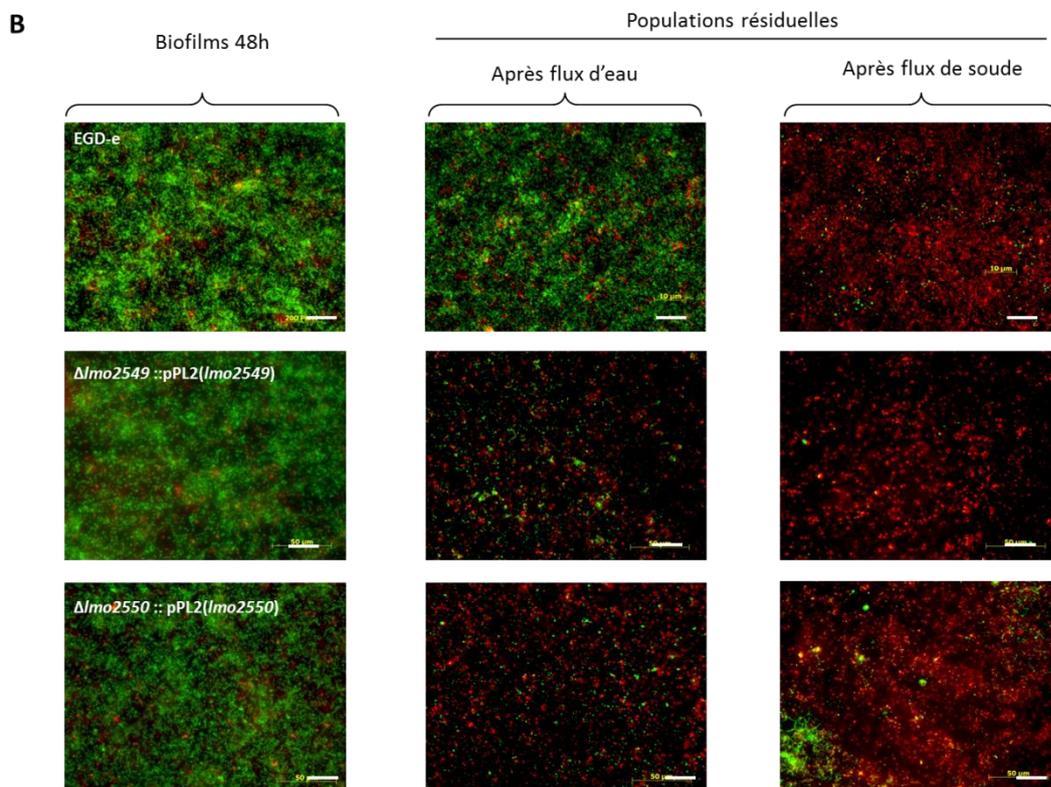
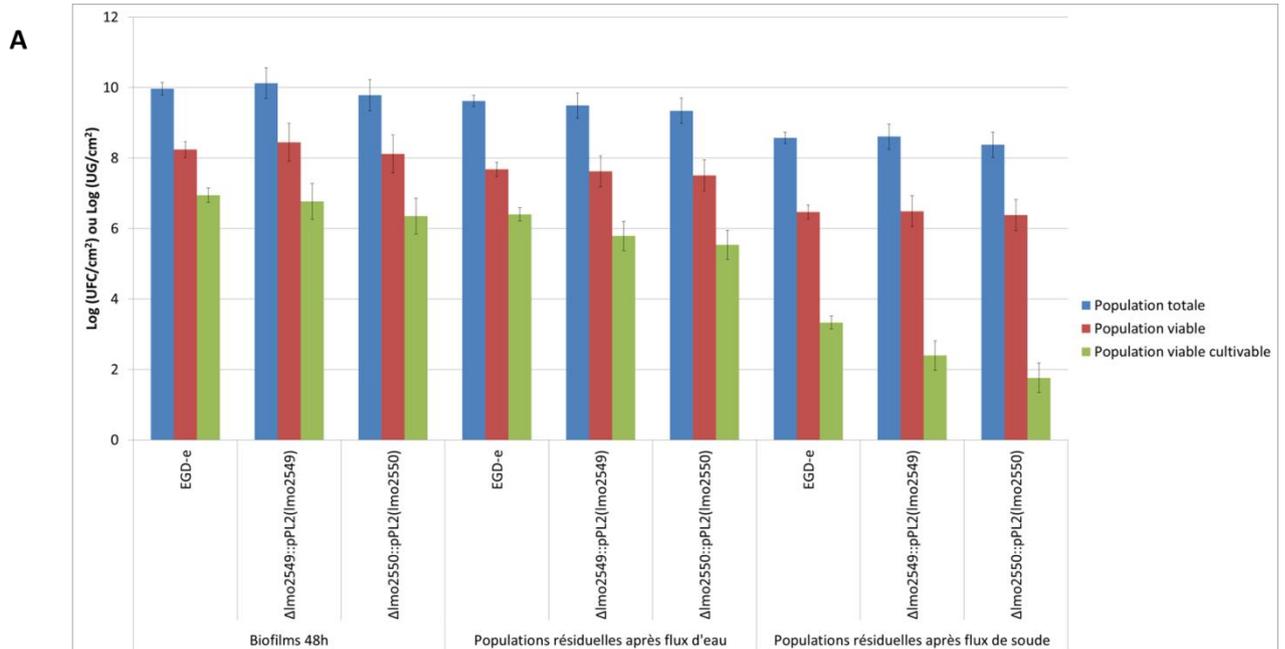
Annexe 9 : Observation par microscopie en épifluorescence après coloration au Live/Dead® Bac Light™ des biofilms de 48h formés par les mutants complémentés EGD-e Δ mo2549::pLIV2(*Imo2549*) et EGD-e Δ mo2550::pLIV2(*Imo2550*) et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202.



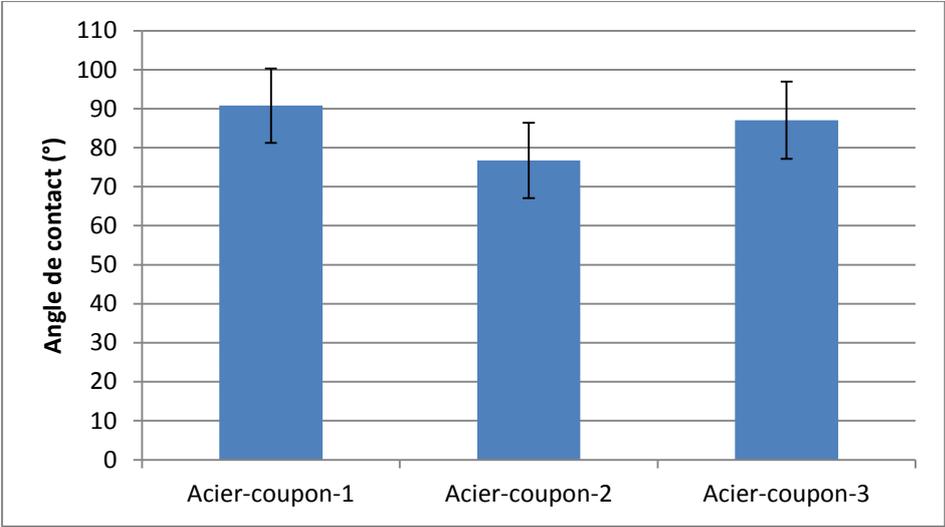
Annexe 10 : Quantification des populations totales, viable et viable cultivable des biofilms de 48h des mutants complémentés $EGDe\Delta mo2549::pLIV2(I mo2549)$ et $EGDe\Delta mo2550::pLIV2(I mo2550)$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. (EGD-e : n = 25, $EGDe\Delta mo2549::pLIV2(I mo2549)$ et $EGDe\Delta mo2550::pLIV2(I mo2550)$ n = 4)



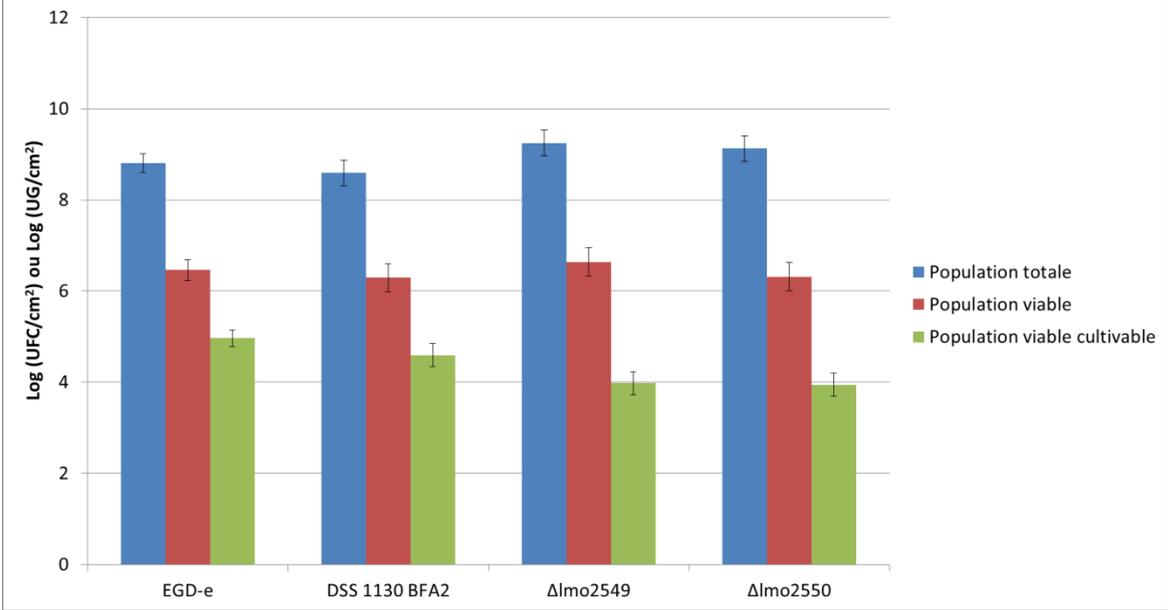
Annexe 11: Résistance des biofilms de 48h des mutants complémentés EGD Δ Imo2549::pLIV2(*Imo2549*) et EGD Δ Imo2550::pLIV2(*Imo2550*) et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 à un flux d'eau et de soude (0,05%) à un débit de 40 Pa. A) Dénombrement des populations résiduelles totales, viable et viable cultivable. B) Observations microscopiques des populations résiduelles après coloration au Live/Dead[®] Bac Light[™]. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. EGD-e : n = 24, EGD Δ Imo2549::pLIV2(*Imo2549*) et EGD Δ Imo2550::pLIV2(*Imo2550*) n = 6.



Annexe 12: Mesure d'angle de contact à l'eau des surfaces d'acier inoxydable. Les mesures ont été effectuées sur 3 coupons d'acier inoxydable (1,2 et 3). Les moyennes sont calculées à partir de 10 mesures. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance.



Annexe 13: Quantification des populations totales, viable et viable cultivable des cellules adhérente à l'acier inoxydable après 3h d'incubation à 30°C dans le milieu MCDB 202 des mutants DSS1130 BFA2, $\Delta lmo2549$, $\Delta lmo2550$ et de la souche sauvage EGD-e. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance. (n=3)



Annexe 14 : Observation par microscopie en épifluorescence après coloration à l'orangé d'acridine de l'adhésion à la formation des biofilms de 48h par les mutants $\Delta mo2537$, $\Delta tagO1tagO2$, $\Delta tagO1$, $\Delta tagO2$ et la souche sauvage EGD-e cultivés sur acier inoxydable à 30°C dans le milieu MCDB 202 avec (+) ou sans (-) IPTG . Les barres blanches représentent l'échelle à 20 μm

