

---

# **Evaluation de l'activité anti-*Listeria* de textiles fonctionnalisés : suivi microbiologique et état physiologique de *Listeria innocua***

**Elise Chadeau, Nadia Oulahal, Emna Jelassi & Pascal Degraeve**

*IUTA – Université Lyon 1  
Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (EA n°3733)  
Département de Génie Biologique, Technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu  
F-01060 Bourg en Bresse CEDEX 9*

*elise.chadeau@iut.univ-lyon1.fr ; nadia.oulahal@iut.univ-lyon1.fr ;  
pascal.degraeve@iut.univ-lyon1.fr*

**Section de rattachement : 64  
Secteur : Secondaire**

## **RÉSUMÉ.**

*Les biofilms présents sur les surfaces de travail et sur les vêtements de travail dans le secteur agro-alimentaire constituent une source de contamination croisée non négligeable pour les aliments. Un textile de composition couramment utilisée en agro-alimentaire (65% coton- 35% polyester) a été fonctionnalisé pour être antimicrobien à l'aide de PHMB ou d'argent. Pour ces 2 textiles fonctionnalisés, l'activité anti- **Listeria innocua** a pu être évaluée en se basant sur la norme ISO 20743/2005 et l'état physiologique des cellules a été suivi par le marquage à l'aide de fluorochromes : kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>. La technique d'épifluorescence nous a permis de mettre en évidence des cellules viables non cultivables dans les 2 cas.*

*MOTS-CLÉS : textiles antimicrobiens, Listeria innocua, activité antimicrobienne, épifluorescence, état physiologique.*

## 1. Introduction

Les biofilms, définis comme une communauté de micro-organismes adhérant entre eux et à une surface, marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice, posent de réels problèmes de contaminations croisées dans les industries agro-alimentaires. *Listeria monocytogenes*, bacille à Gram positif, est un germe pathogène pour l'homme et est responsable de listériose. L'alimentation représente une des causes majeures de contaminations croisées due à la capacité de cette bactérie à adhérer à différentes surfaces. En effet, cette souche a été isolée de différentes sources comme les légumes, la viande ou encore les aliments transformés. Certains auteurs ont démontré que *L. monocytogenes* est capable d'adhérer à divers matériaux comme l'acier inoxydable ou encore le polypropylène et cette adhésion est dépendante du temps (Beresford *et al.*, 2001). Elle est souvent responsable de contaminations croisées (Harvey, 1992). *Listeria innocua* possède, quant à elle, des similitudes par rapport à *L. monocytogenes* et a été retenue dans cette étude. Afin de lutter contre ces contaminations croisées, les textiles à visée antimicrobienne pourraient être une solution. En effet, différents chercheurs travaillent sur ce type de matériaux et la demande est très forte (Ramachandran *et al.* 2004). Différentes méthodes de modification existent dans le but de fonctionnaliser des textiles pour les rendre antimicrobiens. Dans cet article nous développerons 2 méthodes : une utilisant un liant et une autre utilisant un brevet n° EP 0955069 (Chatelin *et al.*, 2006).

Le PHMB (polyhexaméthylène biguanide) est un polymère cationique formé de groupes biguanides liés par des chaînes hexaméthylène. Il est utilisé dans les industries alimentaires et pour la désinfection des piscines (McDonnell *et al.*, 1999). Cette molécule est active sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais n'est pas sporicide. Le PHMB a pour cible les membranes bactériennes (cytoplasmique et externe). Cet agent antimicrobien va entraîner une modification de la perméabilité membranaire et une altération de certaines enzymes associées.

L'activité antimicrobienne de l'argent est connue depuis longtemps, il peut se présenter sous diverses formes : l'argent métallique, l'argent sulfadiazine ou encore fixé à des zéolites, forme la plus couramment utilisée dans les additifs antimicrobiens des emballages actifs (Rai *et al.*, 2009). D'après Matsumura *et al.* (2003) deux hypothèses sont émises quant à l'activité antimicrobienne de l'argent. Tout d'abord, lorsque les cellules bactériennes sont en contact avec des ions argent ceux-ci causent de nombreux dommages dans la cellule ce qui entraîne sa mort. Dans un second temps, il existe une production d'espèces réactives de l'oxygène qui entraîne l'inhibition des enzymes de la chaîne respiratoire et une attaque de la cellule par les ions argent.

Le but de cette étude est de mettre en évidence l'activité anti-*Listeria innocua* de textiles fonctionnalisés soit par du PHMB soit par de l'argent et ce par 2 méthodes. Cette activité est mesurée sur la base de la norme ISO 20743/2005 (Anonyme, 2005) : méthode de dénombrement sur milieu gélosé, avec en parallèle l'étude de l'état physiologique des cellules grâce à la méthode d'épifluorescence.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Préparation des textiles

Les textiles utilisés sont des textiles blancs composés de 65 % coton et 35 % polyester.

Ces textiles ont été fonctionnalisés par l'IFTH (Institut-Français Textile-Habillement, Ecully (69)) dans le but de les rendre antimicrobiens : par le PHMB (Chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide) ou par de l'argent.

- Textile 1 : modification basée sur la base du brevet mis au point par l'IFTH n° EP 0955069, qui met en contact un agent antibactérien (le PHMB) et un agent précipitant, le complexe est ensuite fixé par foulardage. Textile testé après 1 lavage à 90°C.

- Textile 2 : traitement à base d'argent fixé au textile grâce à un liant par foulardage. Textile testé après 1 lavage à 90°C.

En parallèle, un textile témoin non traité a également été utilisé.

## 2.2. Conditions de culture de *Listeria innocua*

*Listeria innocua* LRGIA 01 a été utilisée pour tester les différents textiles antimicrobiens. Cette souche provient d'un environnement laitier et a été choisie pour ses similarités vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*.

1 mL de la culture de collection (conservée à -20°C) a été transféré dans 20 mL de BCC (Bouillon Cœur Cerveille) et la culture incubée 24 h à 30°C. Un isolement sur milieu TSA (Tryptone Soy Agar) est ensuite réalisé puis incubé 24 h à 30°C. Une colonie isolée a servie à ensemercer 20 mL d'un nouveau bouillon BCC et incubé 24h à 30°C.

## 2.3. Protocole de détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des textiles a été évaluée sur la base de la norme ISO 20743/2005 (Anonyme, 2005).

Des dilutions sont réalisées dans du TSB (Tryptone Soy Broth) 1/20ème pour obtenir une suspension bactérienne de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. 200 µL de cette suspension de *Listeria innocua* LRGIA 01 ont été utilisés pour ensemercer 4 éprouvettes de textiles de 0,1 g chacune. L'incubation de ces éprouvettes se fait à 30°C dans des conditions de saturation d'humidité. Les bactéries sont ensuite décrochées puis dénombrées après différents temps de contact : 1h, 4h, 8h et 24h.

Pour décrocher les bactéries, 2 éprouvettes de textiles sont placées dans un sac stomacher avec 20 mL de diluant pharmacopée (VWR, Prolabo, France) puis les sacs sont passés au stomacher 2 min par face. Après décrochage, des dilutions en série sont réalisées afin d'estimer le nombre de cellules cultivables. Le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) est dénombré sur TSA après 24h d'incubation à 30°C. Le dénombrement est ensuite exprimé en UFC.g<sup>-1</sup> de textile.

L'activité antibactérienne peut ensuite être calculée suivant la formule :

$A = (C^{24} - C^0) - (T^{24} - T^0)$  où  $C^{24}$  est le nombre de bactéries dénombrées après décrochage et 24h de contact,  $C^0$  est le nombre de bactéries dénombrées au début de l'expérimentation sur le textile témoin et  $T^{24}$  et  $T^0$  sont respectivement le nombre de bactéries après décrochage du textile traité après 24h de contact et au début de l'expérimentation. Pour qu'un textile soit dit « actif », il faut que  $A > 2$ .

Toutes les expériences ont été répétées trois fois et les résultats exprimés en log (UFC.g<sup>-1</sup> de textile).

#### 2.4. Détermination de l'état physiologique des cellules

L'évaluation de l'état physiologique des cellules bactériennes se fera en utilisant un kit : le Live/Dead<sup>®</sup> Baclight<sup>™</sup> (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ce kit est composé de 2 fluorochromes : le SYTO 9 et l'iodure de propidium qui sont tous 2 des colorants des acides nucléiques (respectivement vert et rouge). Ces 2 colorants diffèrent quant à leurs propriétés spectrales et leur capacité à pénétrer dans la cellule. En effet, le SYTO 9 colore toutes les bactéries que leurs membranes soient intactes ou non. *A contrario*, l'iodure de propidium pénètre seulement dans les cellules dont la membrane est lésée. Dans le cas d'un mélange des 2 colorants, on considère que les cellules vertes sont les cellules intactes (cellules viables) et que les cellules rouges correspondent aux cellules dont la membrane est endommagée (cellules non viables). Les spectres d'excitation/émission sont respectivement pour le SYTO 9 480/500 nm et pour l'iodure de propidium 490/635 nm.

Dans un premier temps un suivi de croissance sur une culture liquide de *L. innocua* a été réalisé. 1 mL d'une culture en BCC de 24 h à 30°C est transféré dans 20 mL d'un BCC frais. Une lecture de densité optique est réalisée toutes les heures avec, en parallèle, une coloration au Live/Dead<sup>®</sup>. La coloration est réalisée sur 1 mL de culture en ajoutant 1 µL de SYTO 9 et 2 µL d'iodure de propidium. Ce mélange est incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité. La suspension est ensuite filtrée sur membrane en polycarbonate noire de diamètre de pores 0,2 µm. La membrane est séchée à l'air puis déposée sur une lame. La préparation est observée à l'objectif X100 grâce au microscope inversé diascopique Axiovert 25 CFL (Carl Zeiss, Allemagne).

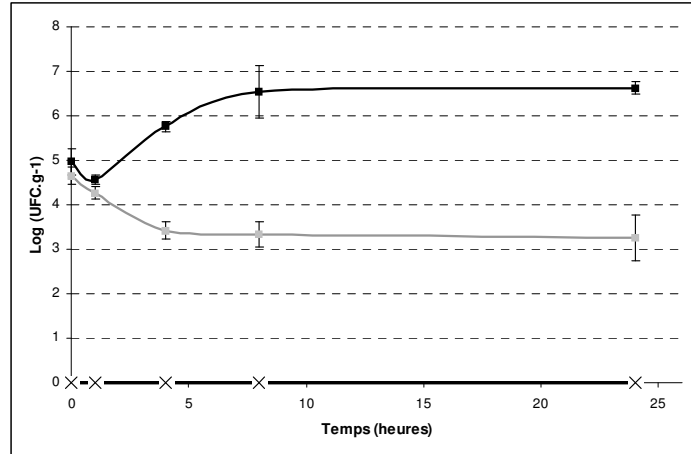
Dans un second temps, une coloration a été réalisée après décrochage des bactéries du textile. Le protocole de décrochage est identique à celui présenté dans le point 2-4. La suspension de décrochage est ensuite centrifugée 10 min à 8500 g à température ambiante. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de Ringer (Merck, Allemagne). Le marquage à l'aide du kit Live/Dead<sup>®</sup> Baclight<sup>™</sup> est ensuite réalisé comme précédemment et la préparation est également observée à l'objectif X100. Toutes les expériences ont été répétées 2 fois et les résultats exprimés en nombre de bactérie.g<sup>-1</sup> de textile.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Activité anti- *Listeria innocua* LRGIA 01

Dans un premier temps, la croissance de *Listeria innocua* sur textiles traités a été comparée à la croissance sur textiles non traités. Les résultats sont présentés dans la figure 1. Cette figure montre une croissance de *Listeria innocua* sur textile non traité avec une augmentation de plus d'1 log en 24 h. Ceci met en évidence la capacité de *Listeria innocua* à adhérer et à croître sur ce type de textile non traité.

Dans le cas du textile traité 2, il y a une diminution de croissance dès 1 h de contact entre les bactéries et le textile. Après 4 h de contact, aucune bactérie n'est retrouvée. Dans le cas du textile traité 1, aucune bactérie n'a été retrouvée dès le dépôt sur textile et ce à tous les temps étudiés.



**Figure 1.** Croissance de *Listeria innocua* sur textile témoin non traité (■), PHMB : textile 1 (×) et textile traité Ag (■) : textile 2.

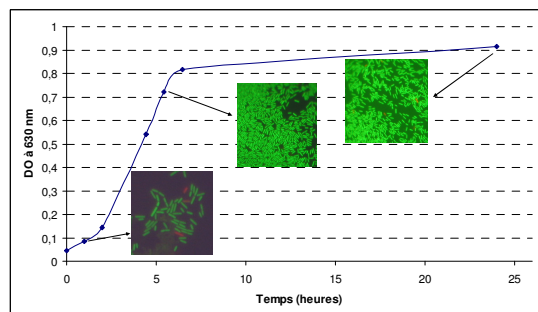
L'activité anti-*Listeria innocua* des textiles testés peut être calculée selon la norme ISO 20743/2005.

Dans le cas du textile 1, on note une activité biocide dès la première heure. Cela met en évidence une très forte efficacité de la molécule sur *Listeria innocua*. Allen *et al.* (2006) ont démontré que pour des concentrations supérieures ou égales à 10 mg.L<sup>-1</sup>, le PHMB possédait une activité biocide vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Lee *et al.* (2004) ont également démontré que la croissance de bactéries à Gram positif et à Gram négatif était inhibée sur des gazes imprégnées de PHMB.

Pour le textile 2, on trouve une activité de 3,3. Ce textile présente donc une bonne efficacité (A>2). Afin de mettre en évidence d'éventuelles bactéries viables mais non cultivables (VNC), ces mêmes textiles ont été testés grâce à un protocole d'épifluorescence.

### 3.2. Evaluation de l'état physiologique des cellules

Dans un premier temps, la corrélation entre couleur observée et état de viabilité des cellules a été faite. Le suivi de croissance est présenté dans la figure 2.



**Figure 2.** Suivi de croissance sur 24 h de *Listeria innocua* en bouillon Cœur Cervelle et suivi de l'état physiologique après coloration avec le kit Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>.

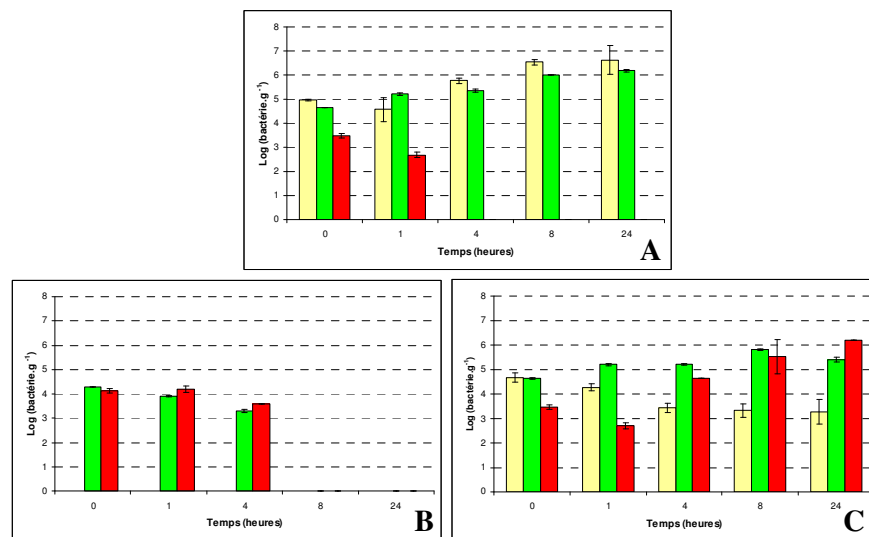
D'après le graphe on distingue donc les phases de croissance de *Listeria innocua* que sont la phase de latence entre 0 et 2 h, une phase de croissance exponentielle entre 2 et

7 h, puis une phase stationnaire jusqu'à 24 h. Des photographies des cellules ont été réalisées après coloration pour chacune des phases de croissance. En phase de latence, la majorité des cellules sont vertes avec quelques cellules rouges. Les images de la phase exponentielle sont représentées par des cellules vertes et aucune cellule rouge. On retrouve ensuite quelques cellules rouges lors de la phase stationnaire. Berney *et al.* (2007) ont démontré que les propriétés de coloration sont dépendantes du stade physiologique de la bactérie : en effet, pendant la phase exponentielle, les cellules d'*Escherichia coli* sont plus vertes que pendant la phase de latence. Les cellules de la phase exponentielle correspondent à des cellules en division cellulaire et donc physiologiquement actives. On peut donc considérer que les cellules vertes correspondent à des cellules viables.

### 3.3. Comparaison des 2 méthodes

Dans le but d'évaluer l'état physiologique des cellules de *Listeria innocua* après contact avec les 2 textiles traités, un protocole de coloration puis des observations au microscope à épifluorescence ont été réalisés. Après contact avec les textiles traités pendant différents temps (0, 1, 4, 8 et 24 h), les cellules bactériennes ont été décrochées puis colorées selon le protocole du paragraphe 2-4.

La figure 3 représente une comparaison des 2 méthodes de dénombrement mises en place pour le textile témoin non traité et les 2 autres textiles à visée antimicrobienne.



**Figure 3.** Comparaison des méthodes de dénombrements sur TSA (■) et dénombrements au microscope à épifluorescence, bactéries viables (■) et bactéries non viables (■). Nombre de bactéries exprimé en log de bactérie.mL<sup>-1</sup> sur textile témoin non traité (A), PHMB : textile 1 (B) et Ag : textile 2 (C).

*Listeria innocua* est capable d'adhérer et de se multiplier sur le textile témoin non traité (A). Ceci est démontré à la fois par la méthode de dénombrement classique sur TSA mais également par le dénombrement par épifluorescence. En effet le nombre de bactéries sur TSA n'est pas significativement différent du nombre de bactéries viables

dénombrées au microscope à épifluorescence après coloration. Dans les 2 cas, il y a une augmentation d'environ 1 log en 24 h. Il faut également noter une diminution du nombre de bactéries non viables qui est expliquée par la phase de croissance : en phase de latence on retrouve quelques bactéries non viables qu'on ne retrouve pas lors de la phase exponentielle.

Sur le textile 1 (PHMB), aucune bactérie n'avait été dénombrée sur TSA. L'utilisation de la microscopie à épifluorescence nous permet ici de dénombrer jusqu'à 4 log de bactéries viables qui correspondent à des bactéries non cultivables car non retrouvées sur le milieu de culture. Des bactéries non viables sont également retrouvées. Il est à noter qu'après 8 h de contact, ni bactéries viables ni bactéries non viables ne sont observées au microscope à épifluorescence. Dans les premières heures de contact, le PHMB induit la formation de cellules viables non cultivables, pour ensuite induire une mort cellulaire de ces cellules à partir de 8 h puisque aucune bactérie n'est observée au microscope.

Le textile 2 (Ag) est un cas intermédiaire. Le nombre de bactéries sur TSA a tendance à diminuer dans le temps mais le nombre de bactéries viables dénombrées au microscope à épifluorescence augmente jusqu'à 6 log. Le nombre de bactéries non viables diminue jusqu'à 1 h puis augmente. On retrouve donc une quantité importante de bactéries viables non cultivables après contact avec ce textile.

Il faut noter que l'augmentation du nombre de bactéries non viables donc rouges peut être soit le fait d'une mort cellulaire par manque de nutriments et/ou l'action de la molécule antimicrobienne fixée sur le textile. En effet, sur le textile témoin, on observe la présence de bactéries rouges au début de l'expérimentation et après 1 h de contact, on peut donc supposer qu'il s'agit de bactéries mortes par manque de nutriments ou issues de la culture de départ. D'après Joux *et al.* (2000), lors d'un stress, au sein d'une population, il existe une forte hétérogénéité de statuts physiologiques dans lesquels se trouvent les cellules.

Dans la nature, les microorganismes sont soumis à différents stress et sont donc capables de s'adapter. La formation de cellules viables non cultivables (VNC) est une stratégie de survie de ces dernières (Besnard *et al.*, 2002). Ces auteurs ont démontré la capacité de *L. monocytogenes* à entrer dans un stade de VNC après avoir subi différents stress environnementaux (pH, température...). Le PHMB et l'argent sont toutes deux des molécules à spectre large et vont donc faire subir un stress à *L. innocua* entraînant la formation de cellules viables non cultivables.

#### **4. Conclusion**

La comparaison de ces 2 méthodes met en évidence une évaluation incomplète de la population microbienne avec la méthode de dénombrement classique en milieu gélosé. En effet, des méthodes complémentaires comme la microscopie à épifluorescence sont indispensables pour évaluer de façon précise la population entière. Bernardeau *et al.* (2001) ont également mis en évidence cette information. La population de bactéries viables non cultivables doit être prise en considération car elle peut être la cause de contaminations croisées.

Un des avantages de la méthode d'épifluorescence est de pouvoir réaliser un suivi dans le temps de l'état physiologique des microorganismes avec un protocole simple et rapide.

## Remerciements

Cette étude fait parti du projet de Recherche & Développement Actiprotex, labélisé par Techtera (pôle de compétitivité des textiles techniques et fonctionnels) financé par le Ministère Français de l'Economie, de l'Industrie et de l'Emploi (DGCIS), la Région Rhône-Alpes, le Conseil Général 38, le conseil Général 42, le Conseil Général 01 et le Grand Lyon. Actiprotex vise à créer des produits textiles de haute technologie pour la prévention de l'adhésion des microorganismes aux textiles.

## Bibliographie

Allen M. J., White G. F., Morby A. P., « The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide », *Microbiology*, Vol. 152, 2006, p. 989-1000.

Anonyme. Norme ISO 20743, « Détermination de l'activité antibactérienne des produits finis antibactériens », 2005.

Beresford M. R., Andrew P. W., Shama G., « *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments », *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 90, 2001, p. 1000-1005.

Bernardeau M., Vernoux J. P., Gueguen M., « Usefulness of epifluorescence for quantitative analysis of lactobacilli in probiotic feed », *Journal of applied microbiology*, Vol. 91, 2001, p. 1103-1109.

Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H. U., Egli T., « Assessment and interpretation of bacterial viability by using the Live/Dead BacLight kit in combination with flow cytometry », *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, 2007, p. 3283-3290.

Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F., Cappelletti J.M., « Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes* », *Veterinary research*, Vol. 33, 2002, p. 359-370.

Chatelin R. J. R., Bourgeois M., « Procédé pour rendre biostatique ou biocide un matériau », 2006, EP Patent 0 955 069 A1.

Harvey J., « Occurrence of listeria species in raw milk and dairy products produced in northern ireland », *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 72, 1992, p. 119-125.

Joux F., « Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level », *Microbes and infection*, Vol. 2, 2000, p. 1523-1535.

Lee W., Tobias K., Bemis D., Rohrbach B., « In vitro efficacy of a polyhexamethylene biguanide-impregnated gauze dressing against bacteria found in veterinary patients », *Veterinary surgery*, Vol. 33, 2004, p. 404-411.

Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S. I., Tsuchido T., « Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate », *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 69, 2003, p. 4278-4281.

McDonnell G., Russell A. D., « Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance », *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, 1999, p. 147-179.

Rai M., Yadav A., Gade A., « Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobial », *Biotechnology advances*, Vol. 27, 2009, p. 76-83.

Ramachandran T., Rajendrakumar K., Rajendran R., « Antimicrobial textiles - an overview ». *IE Journal*, Vol. 84, 2004, p. 42-47.