

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى –جيجل-

Université Mohammed Seddikbenyahia –Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de
Département de Microbiologie Appliquée

Et des Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : المكر وبيولوجيا التطبيقية

و علوم التغذية

Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme

du Master Académique en Biologie

Option : Microorganismes et pathogénicité

Thème

**Etude préliminaire du potentiel d'adhésion des souches pathogènes
et d'altération sur supports abiotiques**

Membre de jury :

Présidente : M^{me} Roula S.

Examineur : M^{me} Bekka F.

Encadreur : Dr Ait Meddour A.

Présenté par :

M^r Tibah Younes

M^{elle} Dib Selma

Année universitaire : 2016-2017

Numéro d'ordre :

Remerciements

Tout d'abord nous remercions Allah pour nous avoir donné la force, la patience et la volonté d'accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements au Dr Ait meddour A, l'encadreur de ce mémoire, pour son aide précieuse, ses encouragements, sa patience et son soutien favorable pour l'aboutissement de ce travail.

Nos vifs remerciements vont à M^{me} Roula S et à M^{me} Bekka F pour l'attention qu'elles nous ont porté à vouloir faire part de ce jury.

Le grand merci est à nos parents et familles qui nous ont soutenus durant toutes ses années d'étude et qui nous ont encouragés sans cesse.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A mon frère Fouad,

*Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection
que je porte pour toi.*

*Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours un
frère idéal.*

Tu es le seul qui comprend ma vie.

Je te demande pardon et encore une fois Merci.

Selma

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui ont sacrifié pour moi

Et

J'espère qu'ils seront toujours fiers de moi.

A ma femme Amira.

A toute personne de ma grande famille.

A mes amis et collègues de la protection civile.

A mes collègues de la promotion de microbiologie 2016/2017

A tous ceux qui ont aimé.

younes

LISTE DES ABREVIATIONS

AISI : American Institute of Steel and Iron

BHI : Brain Heart Infusion

BN : Bouillon Nutritif

EPS: Exocellular Polymeric Substances

GN: Gélose Nutritive

P : *Pseudomonas*

QS : « Quorum Sensing »

S : *Staphylococcus*

UFC : Unité Formant Colonie

L : *Listeria*

E : *Escherichia*

TSB: Trypticase Soja Bouillon

LISTE DES FIGURES

N° de la figure	Titre	Page
Fig. 1	Structure de biofilms	4
Fig. 2	Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation de biofilms	4
Fig. 3	Micrographie électronique de <i>P. aeruginosa</i> adhérent sur une surface d'acier inoxydable	10
Fig. 4	Micrographie électronique d'un biofilm d' <i>E.coli</i> formé dans une microplaque	11
Fig. 5	Micrographie électronique d'un biofilm de <i>L. monocytogenes</i> sur une surface d'acier inoxydable	11
Fig. 6	Micrographie électronique d'un biofilm de <i>S. aureus</i> sur une surface en industrie agroalimentaire	12
Fig. 7	Adhésion des souches indésirables sur l'acier inoxydable AISI 316 L	19
Fig. 8	Adhésion des souches indésirables sur l'acier inoxydable AISI 316 L.	21
Fig. 9	Formation de biofilms sur l'acier inoxydable AISI 316 L	21
Fig.10	Formation de biofilms sur le verre.	22

LISTE DES TABLEAUX

N° du tableau	Titre	Page
Tableau I	Résultat de la vérification de la pureté des souches indésirables	18

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	---

PARTIE THEORIQUE

I. ADHESION ET FORMATION DE BIOFILMS

Historiques	2
1. Définition	2
2. Structure et composition	2
3. Processus de formation de biofilms	4
3.1. Hydrophobicité et topographie du support	7
3.2. Propriétés physico-chimiques de surface des bactéries	8
3.3. Facteurs liés aux fluides environnants et à la présence de matières interférente.....	8

II. BIOFILM DES INDUSTRIE ALIMMENTAIR

1. Biofilm négatif	9
2. Bactéries formant des biofilms « négatifs »	9
2.1. Exemples de bactéries formant des biofilms « négatif »	9
3. Biofilms industriels	12

PARTIE PRATIQUE

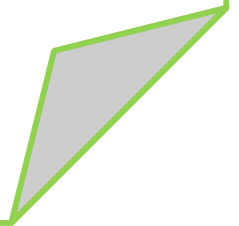
I.MATERIEL ET METHODE EXPERIMENTALE

1. Matériels, milieux de culture et produits chimiques utilisés	14
2. Matériel biologique	15
3. Formation de biofilms	17

II. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Vérification de la pureté	18
2. Adhésion par immersion	18
3. Formation de biofilms	21
Conclusion	24
Références Bibliographiques	25
Annexes	

Introduction



Les biofilms sont le résultat du développement des microorganismes sur une surface vivante ou inerte. Ce mode de vie sessile est très avantageux pour les microorganismes qui y trouvent refuge pour vivre. Les microorganismes peuvent coloniser des surfaces abiotiques très variées (verre, plastique, acier inoxydable...) et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé publique et de l'industrie. Ils sont responsables de la diminution des rendements et de l'augmentation des coûts de production, dues aux altérations des produits transformés et aux détériorations des appareils et des matériaux. Les biofilms sont une source de contamination des aliments s'ils sont formés de bactéries indésirables et sont largement incriminés dans la dégradation de la qualité organoleptique des produits finis et la diminution de leur durée de vie. Les biofilms indésirables (pathogènes et d'altération) sont également responsables de toxi-infections alimentaires du fait de leurs accumulations (*Salmonella* spp. et *Listeria* spp., *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*...) à la surface des équipements (**Guillemot, 2006**).

La prévention et le contrôle de la formation des biofilms indésirables sont donc une priorité en industrie alimentaire (**Giaouris et al., 2014**). L'application régulière des procédures de nettoyage et de désinfection est une stratégie couramment utilisée pour contrôler les biofilms sur les équipements industriels.

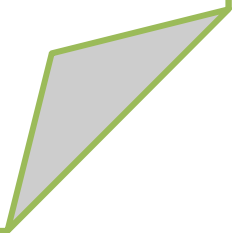
Toutefois, ces procédures ne sont pas pleinement efficaces d'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies de contrôle (**Simões et al., 2010**). D'après **Carpentier (1999)**, choisir des matériaux à très faible rugosité et à forte résistance à la corrosion est une mesure intéressante en industrie alimentaire.

Notre travail a pour objectif d'étudier la capacité des souches de bactéries pathogènes et d'altération à Gram positif et Gram négatif à former des biofilms sur des supports abiotiques à savoir l'acier inoxydable et le verre.

Cette étude est structurée en deux parties dont une synthèse bibliographique mettant en avant quelques notions sur les biofilms ainsi que sur les bactéries pathogènes et d'altération.

La deuxième partie regroupe l'ensemble des techniques et la méthodologie utilisées pour la réalisation de ce travail, ainsi que les résultats générés associés à leur discussion.

Chapitre I



Avec les biofilms microbiens une nouvelle ère, celle de la microbiologie pluridisciplinaire a commencé. Le terme « biofilmologie » est déjà proposé (Karunakaran et al., 2011), l'étude des biofilms s'étant érigée en une discipline à part entière. Le biofilm s'est d'abord imposé comme un nouveau concept dans l'hygiène des surfaces et dans les processus infectieux. Il s'avère également comme un procédé et un outil faisant un pont entre la microbiologie et les sciences des atomes et des molécules ou nanosciences et nano-technologie (Reddy et al., 2012).

Historiques

Bien qu'Antoni Van Leeuwenhoek ait été le premier à examiner des biofilms bactériens sur la surface de ses propres dents au XVII^{ème} siècle (Donlan et Costerton, 2002), la première étude scientifique consacrée aux biofilms date de 1943 (Zobell, 1943). La prédominance du mode de vie sous forme de biofilm ne fut cependant affirmée qu'en 1978 par Costerton et son équipe qui proposèrent les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes (Costerton et al., 1978). Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrées aux biofilms, aussi bien dans les domaines industriels, environnementaux que dans le domaine médical (de Chalvet de Rochemonteix, 2009).

1. Définition

Le biofilm est une communauté pluricellulaire de microorganismes sessiles, agrégés en microcolonies ; parfois complexe et fréquemment incluse dans une matrice de polymères extracellulaires autoproduits (Shakibaiee et al., 2014), adhérant entre eux et sur une surface biotique ou abiotique, allant du naturel comme les muqueuses de l'organisme, racines et feuilles des plantes, minéral comme les roches aux artificiels comme les canalisations et les équipements en industries. Ces structures organisées s'établissent aux interfaces air-solide, air-liquide, liquide-solide ou liquide-liquide (Randrianjatovo et Gbalou, 2016).

2. Structure et composition

Le premier constituant essentiel du biofilm est les microorganismes, les biofilms naturels abritent de nombreux types de microorganismes. Les bactéries principalement, sont à la base de cette communauté mais elle peut inclure des algues, des champignons, des levures et des protozoaires (Claessen et al., 2014). Le deuxième constituant essentiel du biofilm est la matrice organique formée de substances polymériques extracellulaires ou EPS (extracellular polymeric

substances). Celle-ci représente 85 à 90% du volume du biofilm (Sutherland *et al.* 2001 ; Donlan, 2002). Ces substances polymériques extracellulaires étaient initialement assimilées à des exopolysaccharides. Actuellement, il est bien reconnu que les EPS de la matrice, produits par les microorganismes du biofilm sont un mélange complexe de biopolymères comprenant des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des lipides et des débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaires et fluides biologiques)(Brangeret *al.*, 2007 ; Duez, 2012). Toutefois, les polysaccharides sont les composants majoritaires de la plupart des biofilms, l'alginate chez *Pseudomonas aeruginosa* et l'acide colanique chez *Escherichia coli* (Sutherland, 2001). Les fonctions clés des EPS comprennent d'abord l'intervention dans l'attachement initial des cellules aux différents substrats (Singh *et al.*, 2013) et leur protection contre les stress environnementaux et la déshydratation (Vu *et al.*, 2009). En outre, la matrice du biofilm agit comme un système digestif externe maintenant les enzymes extracellulaires à proximité des cellules, leur permettant de métaboliser des biopolymères dissouts, colloïdaux ou solides (Flemming et Wingender, 2010). En effet, le caractère biodégradable des EPS de la matrice du biofilm a été mis en évidence par Zhang et Bishop,(2003), qui ont montré que ces composés pouvaient être dégradés par leurs propres producteurs. Ce qui constitue une source de nutriments que les bactéries peuvent utiliser, par digestion enzymatique en cas de famine ou de privation nutritionnelle. La matrice extracellulaire est également impliquée dans la résistance aux agents antimicrobiens (Kim, 2001) et dans la communication intercellulaire via le « *Quorum Sensing* » [mécanismes régulateurs contrôlant l'expression de certains gènes bactériens au sein d'une même population bactérienne](de Kievit, 2009).

Les structures des biofilms sont variables entre les structures étalées monocouches et les structures tridimensionnelles surélevées. Une structure bidimensionnelle en rayon de miel (Fig. 1 A) est démontré chez *L. monocytogenes* pour des biofilms peu développés (Marsh *et al.*, 2003). Le modèle structural le mieux étudié est celui de la structure en champignon de *P.aeruginosa* (Donlan et Costerton, 2002) (Fig. 1 B). Dans ce modèle, des conglomerats cellulaires agrégés dans une matrice d'EPS sont montés en structure en forme de tours et de champignon. Ils sont traversés par un système de canaux et des pores permettant la circulation d'eau de gaz et de nutriments ainsi que des molécules de signalisation et du matériel extracellulaire divers.

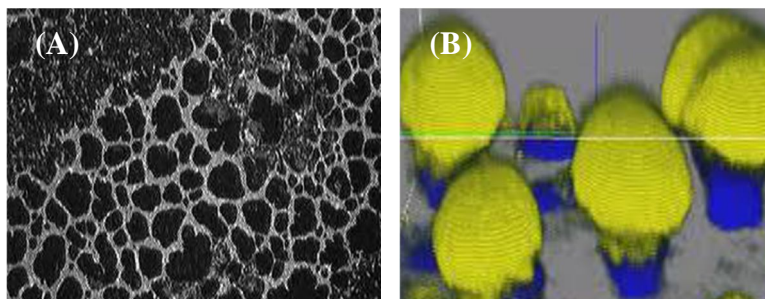


Fig.1.(A) Structure en rayon de miel d'un biofilm de *L. monocytogenes*
 (B) structure en champignon du biofilm de *P.aeruginosa*
 (<http://www.birmingham.ac.uk/schools/biosciences/staff/profile.aspx>)

3. Processus de formation de biofilms

La formation de biofilms est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes plus ou moins bien caractérisées (**Fig. 2**).

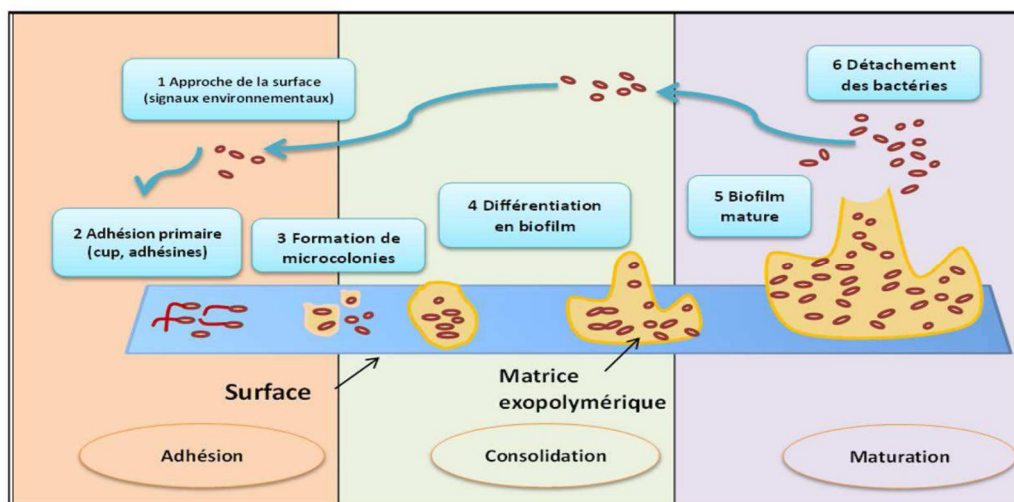


Fig. 2.Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation de biofilms
 (Yannick *et al.*, 2014)

❖ Conditionnement de la surface

La surface de tout support exposé à un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou recouverte de polymères provenant de ce milieu (**Donlan, 2002**). L'adsorption de ces molécules provoque des modifications des propriétés physico-chimiques de la surface du support et affecte l'adhésion bactérienne (**Loriteset *al.*, 2011**) qui

sera ainsi favorisée ou inhibée. Cette dernière propriété est utilisée comme approche dans la lutte préventive contre l'adhésion microbienne et la formation de biofilms, par modification des surfaces (**Bazakaet al., 2012**). Inversement le film de conditionnement peut altérer la surface des équipements de façon à promouvoir leur affinité pour les microorganismes. Le film de conditionnement le mieux connu est celui qui se forme au contact de l'eau de mer (**Jain et Bhosle, 2009**).

❖ Transport des bactéries vers le support

Les bactéries doivent être transportées à proximité du support par un mécanisme actif ou passif. Le transport passif est dominé par des phénomènes non spécifiques tels que le flux, les mouvements browniens ainsi que la viscosité du milieu. Le transport actif consiste dans le déplacement des cellules en réponse à l'attraction exercée par la couche visqueuse riche en nutriment (chimiotactisme). Ce phénomène implique les organites de déplacement tels que les flagelles. Des travaux ont montré que les biofilms formés par des mutants déficients dans les gènes de synthèse du flagelle forment des biofilms plats constitués d'une monocouche de cellules (**Tremplay et Deziel, 2010**).

❖ Adhésion

Il est admis que l'adhésion bactérienne aux surfaces est caractérisée par une phase physico-chimique initiale non spécifique, suivie par une phase moléculaire et cellulaire spécifique appelées couramment adhésion réversible et adhésion irréversible.

La phase réversible est la conséquence d'interactions non covalentes entre le support et la bactérie telles que : l'irrésistible force d'attraction dite Van der Waals, les forces électrostatiques qui sont des interactions électriques de faible intensité entre les molécules, les propriétés acide-base de Lewis (**Briandet et al., 2012**).

La phase irréversible est l'étape cruciale dans le développement du biofilm. Après un certain temps qui consiste en une cascade de changements physiologiques conduisant dans la plupart des cas à la production d'exopolysaccharides qui augmente la capacité d'ancrage des bactéries à la surface et amorcer la construction du biofilm (**Hancock, 1991**).

❖ Croissance et maturation du biofilm

La croissance du biofilm correspond à la multiplication cellulaire, à la production d'EPS ainsi qu'au matériel extracellulaire varié. La prolifération des cellules aboutit à la formation de microcolonies qui sont décrites comme des foyers tridimensionnels hautement récalcitrants (**Conibear et al., 2009**). En effet l'unité de base du biofilm est la microcolonie (**Donlan, 2002**), qui est aussi l'une des caractéristiques la plus remarquable de ce phénotype. La morphologie des colonies dans les biofilms diffère de celle des colonies des cultures libres.

L'arrangement spatial des microcolonies contribue à l'architecture du biofilm et à de profondes implications pour son fonctionnement (**Davey et O'Toole, 2000**). La proximité des cellules au sein de la microcolonie ou entre les microcolonies fournit un environnement idéal pour la création de gradients nutritionnels et pour les échanges génétiques (**Donlan, 2002**).

❖ Dispersion/détachement du biofilm

La phase de dispersion est considérée comme l'étape finale qui complète le cycle du biofilm. Une variété de mécanismes de dispersion est mise en place selon les espèces. Ces mécanismes comprendraient d'une part la dégradation de la matrice extracellulaire par digestion enzymatique (**Nijland et al., 2010**). Ainsi, en certains points, le biofilm atteint une masse critique, les couches les plus externes commencent à générer des cellules planctoniques qui peuvent s'échapper du biofilm et coloniser d'autres surfaces (**Donlan et Costerton, 2002**).

La dispersion permet au biofilm de se propager et de coloniser de nouvelles surfaces. Selon **Stoodley et al., (2002)**, les cellules quittent les microcolonies, quand celles-ci atteignent un diamètre minimal critique de 100 µm. Avec l'accroissement de la taille du biofilm, les cellules résidant dans les couches profondes n'ont plus accès aux nutriments et peuvent souffrir de l'accumulation des résidus toxiques. Leur microenvironnement devenant défavorable, les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement (**Karatan and Watnick, 2009**). De nombreux travaux ont montré que le statut nutritionnel du milieu environnant est impliqué dans la régulation du phénomène de dispersion, dans la diminution des nutriments (**Gjermansen et al., 2005**), aussi bien que dans leur prolifération (**Sauer et al., 2002**) et peut conduire à une dispersion du biofilm.

1. Facteurs influençant l'attachement aux surfaces inertes

Parmi les facteurs qui influencent l'attachement microbien aux surfaces inertes, les propriétés de surface des cellules et des supports inertes (**Van Houdt et Michielis, 2010**).

3.1. Hydrophobicité et topographie du support

Les matériaux les plus couramment utilisés en industrie alimentaire sont les aciers inoxydables AISI 304 et 316 L, parce qu'ils répondent exactement aux exigences des matériaux en contact avec les aliments (**Marchand et al., 2012**). Ce sont des matériaux faciles à nettoyer et résistants à la corrosion (**Bremer et al., 2009**). Les polymères et les caoutchoucs sont également utilisés (**Faïle et Carpentier, 2009**).

L'hydrophobicité et les propriétés topographiques ou rugosité sont au centre d'une large controverse. La relation de ces deux paramètres à l'adhésion aux différents matériaux des surfaces industrielles varie largement entre les travaux (**Hilbert et al., 2003 ; Cerca et al., 2005 ; Durr, 2007 ; Ait meddour et al., 2015**). **Cerca et al., (2005)** ont trouvé que l'adhésion de souches de *Staphylococcus epidermidis* était plus forte aux surfaces hydrophobes qu'aux hydrophiles.

L'augmentation de l'hydrophobicité du téflon et de l'acier inoxydable a induit l'augmentation l'adhésion des spores de *Bacillus cereus* (**Shakerifardet al., 2009**). Dans d'autres études, l'adhésion de différentes bactéries à la surface de différents matériaux hydrophobes et hydrophiles (polystyrène, verre...) n'était pas influencée par le type de matériel (**Bernardes et al., 2010 ; Simoes et al., 2007**).

La rugosité du support est elle aussi largement controversée quant à sa relation à l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm. En effet, la surface de l'acier inoxydable n'est pas uniforme mais présente des dissymétries révélées dans l'ultrastructure de ce matériau et exprimées sous le terme de rugosité. Celle-ci peut influencer le mode d'aggrégation des cellules et la formation de microcolonie et par conséquent la morphologie et la structure du biofilm (**Johnson, 2008**).

Scheuerman et al. (1998) observèrent que la présence d'anfractuosités augmentait le nombre de cellules de *P. aeruginosa* et de *P. fluorescens* adhérant sur des supports en silicone, mais qu'une rugosité supérieure à 10 µm n'avait aucun effet supplémentaire. Paradoxalement, **Kerr et al. (1999)** ont observé une augmentation de l'adhésion bactérienne sur des supports en verre et en acrylique, immergés en eau de mer naturelle, lorsque la rugosité augmente de 0,25 à 30 µm.

3.2. Propriétés physico-chimiques de surface des bactéries

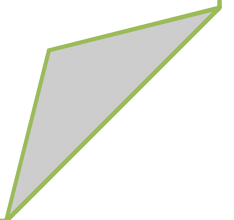
L'hydrophobicité des cellules est impliquée dans les interactions qui gouvernent l'adhésion aux surfaces. Des résultats variables sont trouvés dans la littérature. L'hydrophobicité était le facteur majeur de l'adhésion de *P. aeruginosa* à l'inox 304 et 316 L pendant les 30 premières minutes (**Vanhaecke et al., 1990**). Toutefois, pour Flint *et al.*, (1997), l'adhésion à l'inox n'était pas liée à l'hydrophobicité et la charge de surface des cellules de bacilles thermophiles mais plutôt à leur protéines de surfaces. De même, l'hydrophobicité cellulaire des souches de *S. epidermidis* n'avait aucune influence sur leur adhésion à des surfaces hydrophiles et hydrophobes (**Cercaet al., 2005**).

3.3. Facteurs liés aux fluides environnants et à la présence de matières interférentes

Dans l'environnement naturel, des matières interférentes telles que des protéines, polysaccharides, minéraux ou des résidus de produits de nettoyage vont pouvoir s'adsorber aux interfaces solide-liquide (film conditionnant) et ainsi influencer le comportement bio-adhésif des bactéries en modifiant les propriétés physicochimiques de surface des supports solides (rugosité et hydrophobicité) (**Beloinet et al., 2008**). Ce film masque en partie ou totalement les propriétés de surface du support et augmente l'adhésion (**Bradshaw et al., 1997**), ou au contraire la diminue (**Pratt-Terpstra et al., 1987**). Les interactions responsables de la bio-adhésion ne se feront alors plus entre les bactéries et le support solide mais entre les bactéries et les molécules adsorbées. Par exemple, on a démontré que :

- L'adsorption de la β -lactoglobuline (protéine de lait) sur des surfaces en silice augmente l'adhésion de *Listeria monocytogenes*. En revanche, l'adsorption de la sérum albumine bovine (protéine de sang), en modifiant les caractéristiques physicochimiques de surface des supports (caractère hydrophile, acide/base) diminue l'adhésion des bactéries aux surfaces réceptrices (**Rubio, 1998**).
- L'encrassement de bandes convoyeuses en polyuréthane par du jus de jambon augmente l'adhésion et la survie de *Bacillus cereus* et de *Bacillus subtilis* (**Garry, 1997**).

Chapitre II



1. Biofilms « négatifs »

Les biofilms indésirables connus sous le nom de biofilms « négatifs » sont très répandus dans l'industrie alimentaire au niveau de laquelle ils représentent un réel problème (**Carpentier et Cerf, 1993**), touchant tous les secteurs : laiteries, fromageries, industries de transformation de la viande, sucreries..... Tout équipement non stérilisé abrite des bactéries qui peuvent initier un processus de colonisation notamment dans les zones peu accessibles au nettoyage et à la désinfection. L'ensemble des secteurs industriels est également confronté à la biodétérioration des matériaux sur lesquels s'installent les biofilms. Ce phénomène touche notamment les métaux (on parle alors de corrosion microbienne ou biocorrosion) (**Beech et Sunner, 2004**), les polymères ou les ciments (**Fernandes, 2006**). Il entraîne des pertes économiques importantes et des problèmes écologiques et de graves toxi-infections alimentaires pouvant être l'origine de plusieurs épidémies (**Bridieret al. 2014**).

2. Bactéries formant des biofilms « négatifs »

Tel que mentionné en haut, la contamination des produits alimentaires par des bactéries pathogènes peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires plus ou moins sévères, ces bactéries étant capables de survivre dans des conditions particulièrement difficiles (basses températures, pH acides, milieu salin...), d'adhérer puis de coloniser une grande variété de supports récepteurs. Elles peuvent alors être retrouvées sur les sites de production alimentaire, notamment à la surface des équipements ou des matériaux de conditionnement (**Fonnesbech et al., 2001**) et de rester viables même après les procédures de nettoyage et de désinfection (**Elevers et al., 1999**). Elles sont alors capables de se développer sur la surface et de former un biofilm. Certaines de ces bactéries persistantes au sein de l'équipement peuvent se détacher et re-contaminer le produit (**Pérez Ibarreche et al., 2014**).

2.1. Exemples de bactéries formant des biofilms « négatifs »

La formation des biofilms par des bactéries pathogènes telles que *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* dans les environnements de transformation des aliments est devenue un sujet de préoccupation pour les fabricants de produits alimentaires. La capacité de ces bactéries à adhérer et à coloniser les surfaces inertes tels que l'acier inoxydable et le verre est maintenant bien établie (**Mariani et al., 2011 ; Farrokhet al., 2013**).

2.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces de *Pseudomonas* peuvent coloniser plusieurs surfaces dans l'industrie alimentaire et être à l'origine de diverses contaminations (**Baggeet *al.*, 2001**). Les *Pseudomonas* sont également trouvés sur les installations de traite en formant des biofilms dans des fermes d'exploitation laitière (**Laithieret *al.*, 2004**). Selon (**Tormo, 2010**), la contamination des laits crus par *Pseudomonas* peut provenir des trayons, des biofilms sur la machine à traire et du matériel de stockage réfrigéré.

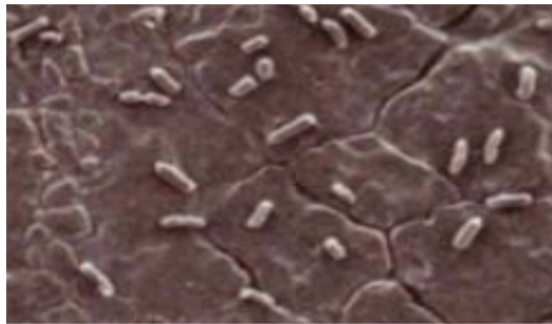


Fig.3. Micrographie électronique de *P. aeruginosa* adhérent sur une surface d'acier inoxydable (<http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/>).

2.1.2. *Escherichia coli*

La capacité d'*E. coli* à se fixer et de former des biofilms sur les surfaces tel que l'acier inoxydable couramment utilisé en industries laitières (**Farrokhet *al.*, 2013**), affecte négativement la qualité et la sécurité du lait et de ses dérivés. Il a été rapporté par **Pasvolkskyet *al.* (2014)**, que la contamination des produits laitiers est souvent liée à la formation de biofilms (**Fig. 3**) sur les surfaces des équipements utilisés, montrant une grande résistance aux agents antibactériens (**Farrokhet *al.*, 2013**). De plus l'intervention de leurs appendices extracellulaires comme les fimbriae ou les curli permet d'avantage d'adhérer aux surfaces inertes (**Kim *et al.*, 2008**). De même, **Ryu et Beuchat (2004)**, rapporté que la résistance d'*E. coli* O157: H7 au chlore et aux désinfectants utilisés dans l'industrie agroalimentaire est dû à la production d'EPS et de curli.

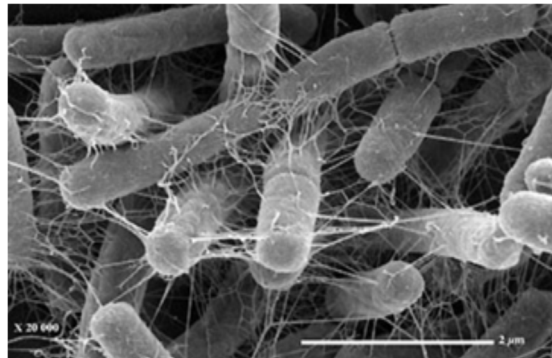


Fig. 4. Micrographie électronique d'un biofilm d'*E.coli* formé dans une microplaque (Ghigo,2003).

2.1.3. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes peut s'implanter progressivement dans des usines alimentaire en raison de son aptitude à coloniser des zones humides (matériel, locaux et environnement) et surtout par sa capacité à semultiplier à basse température, voire à une température de réfrigération où elles s'organisent en biofilms(Fig. 4) (Stepanovicetal.,2004 ; Guerrieriet al., 2009).Une étude de Kabuki *et al.* (2004), a montré que dans une usine de fabrication de fromages frais à partir d'un lait cru pasteurisé, ces derniers ont été dans la plupart des cas contaminés par *L. monocytogenes* en formant des biofilms sur les surfaces inertes (polystyrène et l'acier inoxydable), en particulier dans les régions inaccessibles de l'équipement industriel.

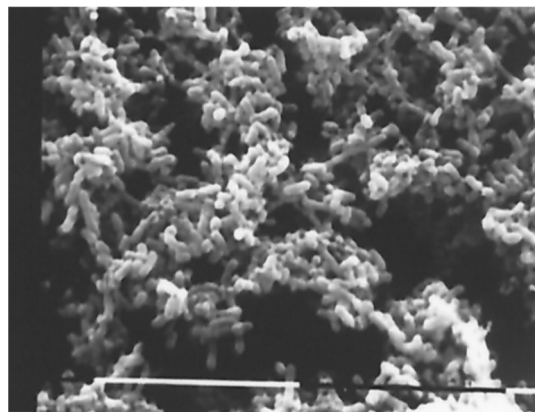


Fig. 5. Micrographie électronique d'un biofilm de *L. monocytogenes* sur une surface d'acier inoxydable (Chavant *et al.*, 2002).

2.1.4. *Staphylococcus aureus*

En industrie alimentaire, *S.aureus* peut se propager à partir des manipulateurs d'aliments, des surfaces en contact avec les aliments tel que l'acier inoxydable (Knowles et Roller, 2001), et des

produits alimentaires et ce tout au long de la chaîne de production (**Le Loir et al., 2003**). Cette espèce bactérienne est souvent trouvée dans les usines de transformation des aliments en raison de sa capacité à adhérer aux surfaces inertes et par conséquent à former des biofilms (**Fig. 5**) (**Marques et al., 2007**). Selon **Flint et al. (1997)**, la formation des biofilms à la surface des équipements en industrie laitière est une source majeure de contamination des produits laitiers affectant négativement leur qualité. Cette adhésion bactérienne est favorisée par la formation d'un film conditionnant constitué de molécules organiques et inorganiques d'origine laitière (protéine, graisse et de minéraux du lait).

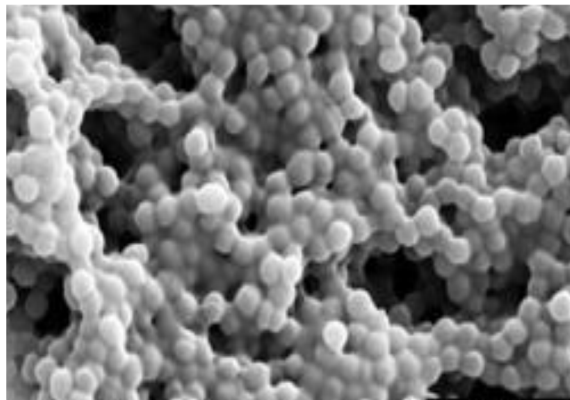


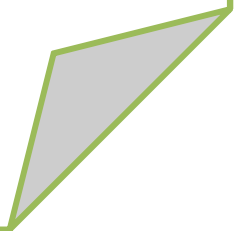
Fig. 6. Micrographie électronique d'un biofilm de *S. aureus* sur une surface en industrie agroalimentaire (<http://www.coe.montana.edu/biofilmbook>).

3. Biofilms industriels

Les biofilms dans l'industrie agroalimentaire sont particuliers et ne correspondent pas complètement aux biofilms établis dans les écosystèmes naturels (**Chmielewski et Frank, 2003**). Ces derniers sont reconnus se former en réponse aux stress environnementaux qui sévissent généralement dans les milieux naturels, notamment le déficit nutritionnel (**Costerton et al., 1999**). Ces principes ne peuvent donc pas être appliqués aux systèmes des industries alimentaires caractérisées par la richesse en nutriments. Certains biofilms formés dans les ateliers de transformation des aliments, l'étape de nettoyage/désinfection est incluse dans le cycle de formation du biofilm (**Shi et Zhu, 2009**). Les molécules organiques se déposent en premier sur la surface de l'équipement formant un film de conditionnement. En second lieu, des bactéries biologiquement actives sont attirées par les molécules organiques. Par la suite, des cellules bactériennes persistantes surviennent après le nettoyage/désinfection et initient une nouvelle croissance. En dernier, le biofilm se forme (**Katsikigiani et Missirlis, 2004**). Les flux turbulents

favorisent l'adhésion en propulsant les bactéries libres sur les surfaces (**Donlan et Consterton, 2002**).

Matériel & Méthodes



1. Objectif du travail

Notre étude réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Jijel, dans la période « Avril-Juin 2017 », consiste à étudier la capacité des bactéries indésirables à former des biofilms sur des matériaux de composition et de propriétés physicochimiques différentes employés dans le secteur alimentaire à savoir, l'acier inoxydable AISI 316 L et le verre.

2. Matériels, milieux de culture et produits chimiques utilisés

-Milieux de culture

- Géloses et bouillons de culture

- Gélose Chapman,
- Gélose oxford,
- Gélose VRBL,
- Gélose Nutritive (GN),
- Bouillon Nutritif (BN),
- Bouillon trypticase-soja (TSB).

-Produits chimiques (colorants, réactifs et tampons)

Eau physiologique stérile, TS stérile, violet de gentiane, cristal violet à 0.1%, fuchine, lugol, éthanol à 95% et le H₂O₂.

-Appareils

- Autoclave (PBIBRAND),
- Bain marie (GERHARDT),
- Balance (KARN440-35A),
- Compteur de colonies,
- Centrifugeuse,
- Etuves réglée à 37°C (MEMMERT).
- Microscope optique (OLYMPUS),
- Micropipettes (MICROLIT),
- Plaque chauffante (VELP scientifica).

3. Matériel biologique

3.1. Origine des souches

L'ensemble des tests est réalisé avec quatre souches de référence appartenant à quatre espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme et fréquemment rencontrées dans l'industrie alimentaire: un coque et un bacille à coloration de Gram positif, respectivement *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Listeria innocua* CLIP 74915, deux bacilles à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Ces souches ont été conservées dans du bouillon nutritif additionné de glycérol (BN, Institut Pasteur d'Algérie, IPA, annexe I) à -18°C. Avant toute utilisation des souches, une revivification et vérification de leur pureté s'avère indispensable. Après quelques repiquages successifs, des tests rapides sont réalisés:

- Observation macroscopique de l'aspect des colonies obtenues après 24 h d'incubation sur gélose Oxford (Biokar Diagnostics, France, annexe I): *L. innocua* CLIP 74915, gélose Chapman (Institut Pasteur d'Algérie, IPA, annexe I) : *S. aureus* ATCC 25923, gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL, IPA, annexe I) : *E. coli* ATCC 25922 et gélose nutritive (GN, IPA, annexe I) : *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Observation microscopique de l'aspect des souches et de leur mode de regroupement après coloration de Gram;
- Tests de la catalase.

NB : la souche de *L. innocua* CLIP 74915 est utilisée à la place de *L. monocytogenes* vu la grande virulence de cette dernière et les caractéristiques communes de ces deux espèces. En effet, *L. innocua* est une bactérie non pathogène isolée à partir des mêmes environnements que *L. monocytogenes* (Kooet *al.*, 2014) et souvent utilisée dans des laboratoires à la place de cette dernière. L'étude de Vaz Velho *et al.* (2001) a suggéré que *L. innocua* peut être un substitut approprié de *L. monocytogenes*.

2. Adhésion sur supports solides

2.1. Supports solides

Au cours de cette étude, deux types de matériaux de composition et de propriétés physicochimiques différentes employés dans le secteur alimentaire sont choisis. Il s'agit de:

- Acier inoxydable AISI 316 L,

- Verre (lames de microscope, Bio-Scan-Microscop-Slides).
- Tous les supports sont présentés sous forme de coupons (largeur : 40 mm, longueur : 20 mm, épaisseur : 0,5 mm). Ces supports sont utilisés pour les essais d'adhésion bactérienne et la formation de biofilms.

L'adhésion des microorganismes aux surfaces solides est le résultat d'interactions physicochimiques entre la surface des cellules bactériennes et celle des surfaces solides.

2.2. Procédure de nettoyage et de désinfection des supports

Une surface solide est systématiquement recouverte d'une couche de contamination organique (**Landoulsi et al., 2008**), dans le but d'éliminer les impuretés minérales et organiques, les supports en métal sont nettoyés et les traitements suivants sont appliqués (**Bellon-Fontaine et Cerf, 1990 ; Chavant et al., 2002**) :

- Immersion dans de l'éthanol absolu (Sigma-Aldrich) pendant 10 min ;
- Lavage 10 min dans un détergent (Sigma-Aldrich) ;
- Rinçage sous agitation dans de l'eau chaude (50°C) ;
- Rinçage 5 fois sous agitation dans de l'eau distillée stérile ;
- Séchage au four Pasteur (Heraeus GS geprüflesicherheit, Allemagne) ;
- Enrobage dans un papier aluminium ;
- Autoclavage à 120°C/20 min.

NB : les supports en verre sont trempés 15 min dans un bain d'éthanol (Sigma-Aldrich) puis rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile

2.3. Méthode d'adhésion par immersion

Des cultures de souches indésirables (10^6 UFC/ml) dans du bouillon trypticase-soja additionnée de 0,6% d'extrait de levure (TSB-YE, Difco, France) obtenues au bout de 18 h d'incubation à 37°C sont centrifugées à 8000 g/20 min à 4°C. Après lavage, les culots bactériens sont remis en suspension dans du TSB-YE. Les supports (aciers inoxydables AISI 316 L et le verre) sont immergés dans 10 ml de cette suspension bactérienne, immerge dans des boîtes de Pétri stériles, puis incubés pendant 3 h. Après incubation et élimination des bactéries non adhérentes sur les surfaces par lavage avec du TS stérile, les cellules adhérentes sont détachées par agitation vigoureuse pendant 2 min dans 20 ml de TS stérile et 20 g de billes en verre stériles (5 mm de diamètre, Sigma-Aldrich) (**Teh et al., 2011, Ait meddour et al., 2014**). Après agitation et préparation des dilutions, un dénombrement des bactéries viables est effectué en masse dans de la

gélose trypticase-soja additionnée de 0,6% d'extrait de levure (TSA-YE, Difco, France, annexe I) après une période d'incubation de 48 h à 37°C. Le nombre de cellules adhérees est exprimé en UFC/cm².

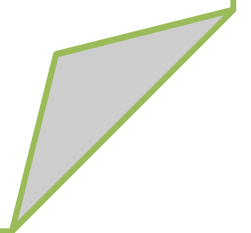
3. Formation de biofilms

Les supports solides utilisés sont nettoyés et désinfectés comme décrit en 2.2. Des biofilms mono bactérien de souches indésirables sont préparés selon le protocole de **Leriche et Carpentier (1999)** avec quelques modifications. Des cultures de bactéries indésirables (10⁶ UFC/ml) dans du bouillon TSB-YE (Difco, France) obtenues au bout de 18 h d'incubation à 37°C sont centrifugées à 8000 g/20 min à 4°C. Après lavage, les culots bactériens sont remis en suspension dans du TSB-YE. Les supports (l'acier AISI 316 et le verre) sont immergés dans 10 ml de cette suspension bactérienne, puis incubés pendant 3 h et 7 jours. Le renouvellement du milieu de culture se fait chaque 24 h.

Après incubation et élimination des bactéries non adhérees sur les surfaces par lavage avec du TS stérile, les cellules adhérees sont détachées par agitation vigoureuse pendant 2 min dans 20 ml de TS stérile et 20 g de billes en verre stériles (5 mm de diamètre, Sigma-Aldrich) (**Teh et al., 2011**). Après agitation et préparation des dilutions, un dénombrement des bactéries viables est effectué en masse dans de la gélose trypticase-soja additionnée de 0,6% d'extrait de levure (TSA-YE, Difco, France) après une période d'incubation de 48 à 37°. Le nombre de cellules adhérees est exprimé en UFC/cm².

NB : les suspensions bactériennes (10⁸ UFC/ml pour les souches lactiques et 10⁶ UFC/ml pour les souches indésirables) sont préparées en utilisant le standard 0,5 McFarland.

Résultats & Discussion



1. Vérification de la pureté des souches

Le résultat des tests effectués dans le but de vérifier la pureté des souches est présenté dans le tableau I.

Tableau I. Résultat de la vérification de la pureté des souches indésirables

Souches	Aspect macroscopique des colonies	Aspect microscopique	Catalase
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Colonies jaunes dorées de 1 mm de diamètre	Cocci à Gram positif disposées en amas	Positive
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Colonies plates, irrégulières avec une pigmentation verte due à la production de pyocyanine	Bacilles fins et droits Gram négatif	Positive
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Colonies rouge violacées de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm	Bacilles droits, à Gram négatif	Positive
<i>L. innocua</i> CLIP 74915	Colonies vertes-grises entourées d'un halo noir	Petits bacilles à Gram positif	Positive

2. Adhésion par immersion

Bien que les mécanismes fondamentaux qui régissent l'adhésion bactérienne soient encore mal compris et n'ont donc pas été complètement définis, il est admis que les propriétés physicochimiques de la surface bactérienne et celles des supports solides sont des facteurs déterminant de l'adhésion initiale (Bayoudhet *al.*, 2006). Les tests d'adhésion réalisés ont permis de comparer la capacité de chaque souche bactérienne à adhérer aux différents supports solides (aciers inoxydables AISI 316 L et verre).

2.1. Sur l'acier inoxydable AISI 316 L

Le dénombrement des souches indésirables (**Fig. 7**) sur l'acier inoxydable AISI 316 L et après 3 h de contact, a montré qu'*E. coli* ATCC 25922 a présenté une adhésion d' ≈ 5 log UFC/cm², *S. aureus* ATCC 25923 a présenté une adhésion d' $\approx 4,8$ log UFC/cm², *L. innocua* CLIP 74915a a présenté une adhésion d' $\approx 5,5$ log UFC/cm². La plus faible adhésion a été enregistrée par *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec une adhésion de d' $\approx 3,7$ log UFC/cm².

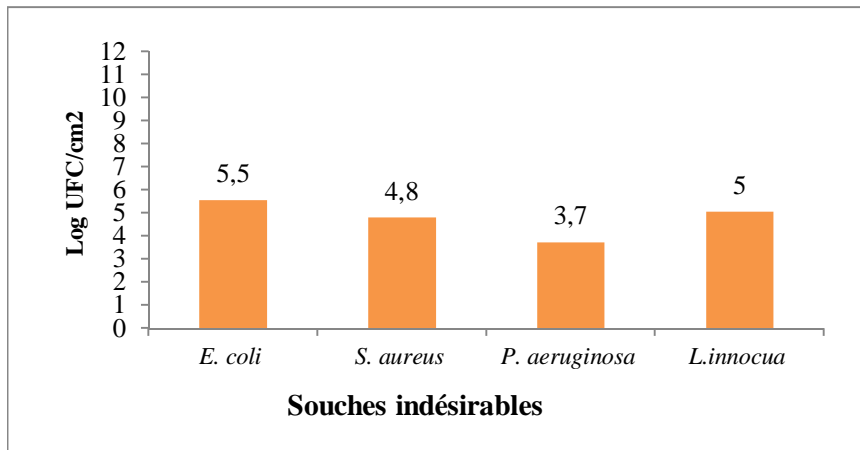


Fig. 7. Adhésion des souches indésirables sur l'acier inoxydable AISI 316 L.

2.2. Sur le verre

L'adhésion des souches indésirables sur le verre a été moins importante après 3 h de contact entre le support et les souches indésirables. *E. coli* ATCC 25922 a présenté une adhésion d' $\approx 4,4$ log UFC/cm², *S. aureus* ATCC 25923 a présenté une adhésion d' $\approx 4,3$ log UFC/cm², *L. innocua* CLIP 74915a a présenté une adhésion d' $\approx 4,4$ log UFC/cm². La plus faible adhésion a été enregistrée par *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec une adhésion de d' $\approx 2,9$ log UFC/cm². Les résultats sont présentés sur la figure 8.

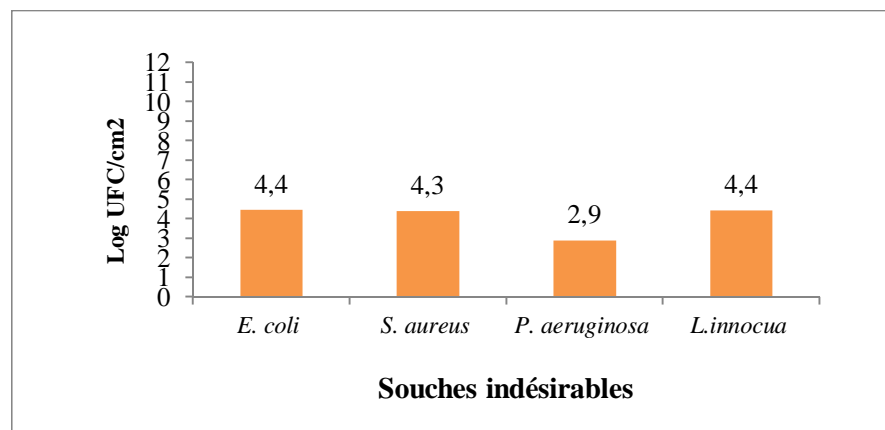


Fig. 8. Adhésion des souches indésirables le verre

Sur la base des résultats obtenus, une adhésion des souches indésirables a été observée après 3h de contact. Cette adhésion des cellules bactériennes ne peut être expliquée que par un lien surface-cellule. **Whitehead et Verran (2009)** affirment que l'adhésion primaire également nommée « adhésion réversible » des cellules bactériennes aux surfaces est dictée par un certain nombre de paramètres: dans un environnement aqueux (liquide-solide), les cellules vont d'abord aborder une surface par des forces naturelles telles que la diffusion, la gravitation et le mouvement brownien. Toutefois, une fois dans le voisinage d'une surface, les paramètres physicochimiques (hydrophobicité et charge) des deux surfaces (cellule et support) interviennent.

Cependant, certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (**Jana et al., 2000 ; Cappello et Guglielmino, 2006**). Il est donc chimiquement admis que les bactéries hydrophobes ont tendance à adhérer sur un substrat hydrophobe et les bactéries hydrophiles ont tendance à adhérer sur un substrat hydrophile (**Bellon-Fontaine et al., 1990**).

Cependant, les résultats de l'adhésion sur l'acier inoxydable AISI 316 L (hydrophobe) et le verre (hydrophile) ne reflètent pas toute cette théorie, car l'adhésion de *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec un caractère hydrophile était meilleure sur une surface hydrophobe (l'acier inoxydable). Ceci confirme que le phénomène d'adhésion ne peut pas être traité seulement en raisonnant par rapport à l'hydrophobicité mais en prenant en compte d'autres paramètres tel que le caractère acide-base, la charge globale, l'énergie libre et la rugosité des supports qui constituent les principaux facteurs contrôlant l'adhésion initiale bactérienne (**Bayouduh et al., 2006**).

La composition biochimique, l'architecture de la surface cellulaire, la présence de protéines, de fimbriae, de flagelles, d'exopolymères et de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif, de lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif contribuent à l'adhésion des microorganismes aux supports. Par exemple, les fimbriae contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes ce qui conduit à l'établissement d'interactions hydrophobes avec le matériau (**Donlan, 2002**). Les flagelles permettent à la bactérie d'être mobile et semblent jouer un rôle important dans les premières étapes de l'adhésion en contrecarrant les forces de répulsion électrostatique (**Pratt et Kolter, 1998**). Les curli et les pili de type F d'*E. coli* sont directement impliqués dans les toutes premières étapes de l'adhésion bactérienne (**Beloinet et al., 2008**). Les acides teichoïques et lipoteichoïques composants spécifiques des bactéries à Gram positif en raison de leur caractère poly anionique et de leur caractère hydrophobe semblent également

exercer un effet sur l'adhésion de ces bactéries parla modification des propriétés physico chimiques de la bactérien la paroi cellulaire(Burgainet *al.*, 2014).

3. Formation de biofilms

3.1.Sur l'acier inoxydable AISI 316 L

Sur la base des résultats obtenus, une grande adhésion des souches indésirables a été observée après 7 jours de contact. D'après la figure 9. *E. coli* ATCC 25922 a présenté une meilleure adhésion avec un taux d'adhésion d' $\approx 9,8$ log UFC/cm², *S. aureus* ATCC 25923 a présenté une adhésion d' $\approx 8,7$ log UFC/cm², *L. innocua* CLIP 74915a présenté une adhésion d' ≈ 9 log UFC/cm². La plus faible adhésion a été enregistrée par *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec une adhésion de d' $\approx 7,5$ log UFC/cm².

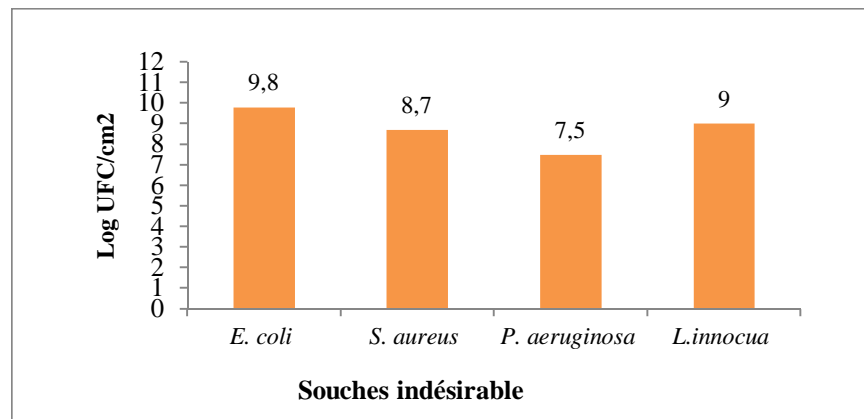


Fig. 9. Formation de biofilms sur l'acier inoxydable AISI 316 L.

3.2.Sur le verre

L'adhésion des souches indésirables sur le verre a été plus importante après 7 jours de contact. *E. coli* ATCC 25922 a présenté une adhésion d' $\approx 6,5$ log UFC/cm², *S. aureus* ATCC 25923 a présenté une adhésion d' ≈ 6 log UFC/cm², *L. innocua* CLIP 74915 a présenté une adhésion d' ≈ 7 log UFC/cm². La plus faible adhésion a été enregistrée par *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec une adhésion de d' ≈ 5 log UFC/cm². Les résultats sont présentés sur la figure 10.

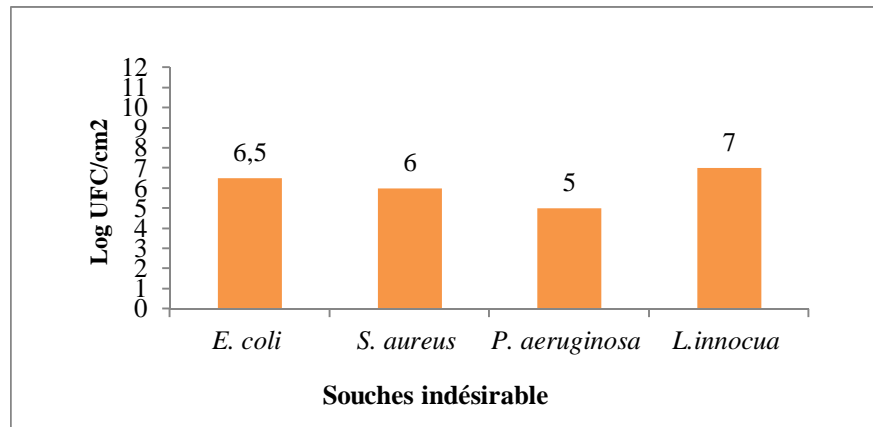


Fig. 10. Formation de biofilms sur le verre.

Les résultats ont montré que les souches de bactéries indésirables ont formé un biofilms mature sur les coupons en acier inoxydable AISI 316 L et en verre après 7 jours d'incubation. Le temps d'incubation et la présence d'éléments nutritifs dans le TSB-YE en particulier les protéines (peptone de caséine et peptone de soja, annexe I) peuvent influencer positivement l'adhésion. Il a été démontré que la formation de biofilms par *L. Monocytogenes* varie fonction du milieu de culture utilisé (ex. TSB et TSB-YE) (Stepanovic *et al.*, 2004 ; Moltzet Martin 2005 ; Folsomet *et al.*, 2006). Ces conditions peuvent causer des changements dans les propriétés de surface des cellules, telle que l'hydrophobicité (Chavant *et al.*, 2002).

Les polymères excrétés par les bactéries (EPS) induisent quant à eux un renforcement de l'adhésion au support la rendant « irréversible ». Ainsi, Long *et al.* (2009), ont démontré l'influence positive de la production d'EPS sur l'adhésion à une surface de silice de quatre bactéries (*E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. et *Bacillus subtilis*).

Pradier *et al.* (2005) ont montré que parmi trois souches de bactéries à Gram négatif (DA, D41 et DO1), c'est la souche dont la surface est la plus riche en protéines (D41) qui adhère le plus à l'acier mais aussi au verre et au téflon en quantité deux fois plus élevée que les autres souches.

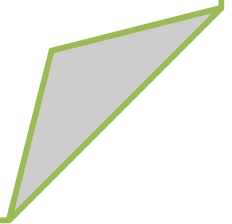
La dégradation des protéines de surface par une action de la trypsine réduit d'un facteur 100 le nombre de bactéries adhérentes. La même démarche a été appliquée sur des bactéries thermophiles du genre *Bacillus* les résultats ont également mis en évidence l'importance des protéines dans l'adhésion bactérienne à l'acier inoxydable (Parkaret *et al.*, 2001).

Certains auteurs se sont intéressés au mode de liaison entre les protéines de surface et les métaux et ont mis en évidence la forte affinité de ces derniers pour les groupements thiols des

protéines. Cette capacité à échanger des électrons pourrait même donner lieu à une liaison covalente (Ercalet *al.*, 2001).

Cette partie de l'étude avait pour but la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'adhésion rencontré sur différents supports solides (de nature chimique différente) en industrie alimentaire (en particulier laitière et fromagère) et éventuellement dans les fermes d'exploitation laitière. Il apparaît que le phénomène d'adhésion bactérienne est très complexe et semblerait être régi par plusieurs interactions.

Conclusion



L'adhésion des microorganismes aux surfaces constitue la première étape dans la formation de biofilm. Il apparaît que ce phénomène est très complexe et semblerait être régi par plusieurs interactions. La présence des biofilms sur des matériaux couramment utilisés en industrie agroalimentaire serait à l'origine de contamination des aliments transformés rendant leur salubrité non conforme.

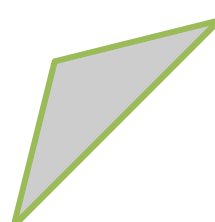
Dans cette étude nous nous sommes intéressés à étudier l'adhésion de quatre bactéries indésirables (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *L. innocua* CLIP 74915 et *P. aeruginosa* ATCC 27853), sur deux supports solides (de nature chimique différente) rencontrés en industrie alimentaire.

L'adhésion des bactéries sur les différents supports a été suivie par un dénombrement des cellules viables cultivables (UFC/cm²). Les résultats ont clairement montré que toutes les souches arrivent à adhérer sur les différents supports et ce au bout de 3 h de contact (temps testé) et que le pouvoir d'adhésion des bactéries sur les différents supports, diffère d'un type de matériau à un autre et d'une souche à une autre. Sur l'acier inoxydable AISI 316 L, *E. coli* ATCC 25922 a présenté une meilleure adhésion d' $\approx 5,5 \log \text{UFC/cm}^2$, en revanche *P. aeruginosa* ATCC 27853 a présenté une faible adhésion d' $\approx 3,7 \log \text{UFC/cm}^2$. Sur le verre, *E. coli* ATCC 25922 a présenté une adhésion maximale d' $\approx 4,4 \log \text{UFC/cm}^2$ et la plus faible adhésion a été enregistrée avec *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Après 7 jours d'incubation, *E. coli* ATCC 25922 a présenté une meilleure adhésion avec un taux d'adhésion d' $\approx 9,8 \log \text{UFC/cm}^2$ sur l'acier inoxydables AISI 316 L. Sur le verre *L. innocua* CLIP 74915 a présenté une adhésion d' $\approx 7 \log \text{UFC/cm}^2$.

Les résultats permettent également de conclure qu'en général les souches indésirables testées ont la capacité d'adhérer et de former un biofilms matures et que l'adhésion bactérienne a été meilleure sur l'acier inoxydable AISI 316 L que sur le verre.

Références



A

Ait Maddour. A, Bendali F, Saadoun J. 2015 . Anti-adherence potential of *Enterococcus durans* cells and its cell-free supernatant on plastic and stainless steel against foodborne pathogens. *Folia microbiologica* **60**: 357-363.

B

Bathia A, Zahoor S. 2007. *S. aureus* enterotoxins: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **1**: 188-197.

Bayouhd S, Othmane A, Bettaieb F, Bakhrouf A, Ben Ouada H, Ponsonnet L. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Material Science and Engineering* **26**: 300-305.

Bazaka K, Jacob V, Crawford R, Ivanova P. 2012. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**: 299-311.

Beech B, Sunner J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 81-186.

Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo G M, Henry N. 2008. A short time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics and adhesin-dependent behaviours. *Plos Biology* **167**: 15449-1558.

Bellon-Fontaine M N, Brissonnet D, Briandet R. 2006. Agents chimiques ou naturels : des outils de maîtrise de la contamination microbiologique des surfaces. *UMR ENSIA – INRA* **2** :161-164.

Besner C, Barbeau B, Gauthier V, Prévost M, Chapleau R, Trépanier M, Aubé M, Soly C. 1999. Mise au point d'un outil de gestion intégrée d'un réseau de distribution d'eau potable: application à un secteur pilote de la ville de Montréal.
<http://www.polymtl.ca/recherche/rc/professeurs/details.php?NoProf=49&showtab=PUB>

Bernardes C, N. de Andrade, S. Ferreira, J. de Sá, E. Araújo, D. Delatorre, L. Pinheiro Luiz. 2010. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate of *Bacillus cereus* from a dairy plant. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 984-992

Bradshaw J, Marsh D, Watson K, Allison C. 1997. Effect of conditioning films on oral microbial biofilm development. *Biofouling* **113**: 217-226.

Briandet R, Fechner L, Naïtali M, Dreanno C. 2012. Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae

Bremer J, Seale B, Flint S, Palmer J. 2009. Biofilms in dairy processing. In Fratamico PM, Annous BA et Gunther NW (ed.). *Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford. Cambridge. New Delhi:Wood head pp. 396–

Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard C, Naïtali M, Briandet R. 2014. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology* **74**: 167-178.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Burgain J, Scher J , Francius G, Borges F , Corgneau M , Revol-Junelles A M, Cailliez-Grimal C , Gaian C. 2014. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science* **213**: 21–35.

C

Carpentier B, Cerf O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* **75** : 499-511

Cerca S, Sondage G, Gleizes E, Tschochner H, Milkereit P. 2005. Rol of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre 18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* **20**(2):263-75

Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine N, Hebraud M. 2002. *L. monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 728–737.

Claessen D, Rozen E, KUIPERS P, Sogaar-Andersen L, Van wezel P. 2014. Bacterial solution to multicellularity: a tale of biofilm filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews Microbiology* **12**:115-124.

Costerton W, Geesey G, Cheng K. 1978. How bacteria stick. *Scientific American* **238**: 86-95.

Conibear R, S. Collins, J. Webb. 2009. Role of Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *PLoS ONE* **4**(7): e6289.

D

Davey E, O'Toole A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 847-867.

De Chalvet de Rochemonteix A. 2009. Les biofilm et la peau.

Donlan R M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 881-890.

Donlan M, Costerton W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review* **15**: 167-193.

De Kievit R. 2009. Quorum sensing in *P. aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **11**: 279-88.

Durr H. 2007. Influence of Surface Roughness and Wettability of Stainless Steel on Soil Adhesion. Cleanability and Microbial Inactivation. *Food and Bioproducts Processing* **85**: 49-56.

Duez C. 2012. Les biofilms bactériens. Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège.

E

Elevers T, Peters C, Griffith J. 1999. Development of biofilms and control of biofilms in the food industry. In Wimpenny J, Gilbert PJ, Walker MB. et Bayston R. (ed.). *Biofilms, the good, the bad and the ugly*, Cardiff: Bioline pp. 139–145.

Ercal N, Gurer-Orha NH, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medical Chemistry* **1**: 529-539.

F

Faille C, Carpentier B. 2009. Food contact surfaces, surface soiling and biofilm formation. In Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. *Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited p 304–30.

Farrokh C, Jordan k , Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D , Condron R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M , Hummerjohann J, Lindsay D , Miszczycha S, Moussiegt S, Verstraete K, Olivier C. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology* **162**: 190-212.

Fernandes P.2006. Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**: 291-296.

Flemming C. 1990. Biofouling in water treatment in biofouling and biodeterioration in industrial water system. Proceeding of the international workshop on industrial biofouling and biocorrosion. Stusgart. <https://books.google.dz/books?id>.

Flint J, Bremer, J. Brooks. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling* **11**(1).

Flemming C, J Wingender. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology* **8**: 623-633.

Fonnesbech V, Huss B, Ojeniyi H, Ahrens P, Gram L. 2001. Elucidation of *L. monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2586- 2595.

J

Jain A, Bhosle A. 2009. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion *Biofouling* **25**: 13-19.

H

Hancock R. 1991. Bacterial outer membranes: Evolving Concepts. *ASM News* **57**: 175-182.

Hilbert R, D Bagge-Ravn, J Kold , L Gram. 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International journal of biodeterioration and biodegradation* **52**: 175-185.

G

Garry P. 1997. Propriétés physicochimiques de surfaces en polyuréthane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de *B. subtilis* et *B. cereus*. Thèse de Doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I France.124 p.

Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Møretrø T, Habimana O, Mickaël Desvaux M, Renier S, Nychas G J. 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science* **97**: 298–309.

Greene D, Klaenhammer R. 1994. Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4487-4494.

Guerrieri E, de Niederhäusern S, Messi P, Sabia C, Iseppi R, Anacarso I, Bondi M. 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *L. monocytogenes* in small-scale model. *Food Control* **20**: 861–865.

Guillemot G. 2006. Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Sc. cerevisiae* sur acier inoxydable-Implications pour l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (France), 198 p.

K

Kabuki Y, Kuaye Y, Wiedmann M, Boor J. 2004. Molecular subtyping and tracking of *L. monocytogenes* in latin style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science* **87**:2803–2812.

Karanukaran E, Biggs A. 2011. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **89**:1161-75.

Karatan E, Watnick p. 2009. Signals, Regulatory Networks and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 310–347.

Kim L. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 999-1007.

Knowles J, Roller S. 2001. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *Journal of Food Protection* **64**: 1542-1548.

L

Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *S. aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research* **2**: 63-76.

Lorite S, Rodrigues M, de Souza A, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta A. 2011. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *JColloid Interface Sci* **359**:289-95.

M

Marsh .J, H. Luo, H. Wang. 2003. A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities *FEMS Microbiology Letters* **228**: 203-210.

Marchand S, De Block J, De Jonghe V, Coorevits A, Heyndrickx M, Herman L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviewers in Food Science and Food Safety* **11**: 133–147.

Mariani C, Oulahal N, Chamba J F, Dubois-Brissonnet F Briandet R. 2011. Inhibition of *L. monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* **22**: 1357-136

Marques C, Rezende S, Aparecida de Freitas Alves L, Silva C, Alves E, Ronaldo de Abreu L. 2007. Formation of biofilms by *S. aureus* on stainless steel and glass surface and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**: 538-543.

Mei C, van der Mei Y, Ren W, Norde J, Busscher J. 2009. Poisson analysis of streptococcal bond strengthening on stainless steel with and without a salivary conditioning film. *Langmuir*, DOI: 10.1021/la9000494

Moltz G, Martin E. 2005. Formation of biofilms by *L. monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Production* **68**: 92–97.

N

Nijland R, Hall J, Burgess G. 2010. Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. *PLoS ONE* 5(12): e15668.

P

Parkar G, Flint H, Palmer S, Brooks D. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic Bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 901–908.

Pérez Ibarreche M, Castellano P, Vignolo G. 2014. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Science* **96**: 295-303.

Pratt-Terpstra H, Weerkamp H, Busscher J. 1987. Adhesion of oral Streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumine-coated surfaces. *Journal of General Microbiology* **133**: 3199-3206.

R

Randrianjatovo-Gbalou I, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain E. 2016. Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with periodic acid–Schiff reagent. *Analytical biochemistry* **500**: 12-14.

Reddy,G.. Nadagouda, J. Sekhar. 2012. Nano structured surfaces that show antimicrobial ,anticorrosive and anti biofilm properties. *Key Engineering Materials*, 521: 1-33.

Rubio C. 1998. Caractérisation de l'adsorption de la SAB sur des surfaces de chrome et d'acier inoxydable AISI 304, conséquences sur l'adhésion de *P. fragi* K1: Orsay.P 25. bibli.ec-http : lyon.fr/exl-doc/mrichard.pd

Ryu H, Beuchat R. 2004. Biofilm formation by *E. coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 247–254.

S

- Sauer K, Cullen C, Rickard H, Zeef LAH, Davies G, Gilbert P. 2004.** Characterization of nutrient-induced dispersion in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology* **186**: 7312-7326..
- Simoes M, M. Pereira, S. Sillankorva, J. Azeredo, M. Vieira. 2007.** The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 2007; 23(3/4): 249 – 258.
- Singh R, Debarati F, Rakesh K J. 2006.** Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* **14**: 9.
- Shi X , Zhu X. 2009.** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* **20**: 407-413.
- Shakibaie M, Forootanfar H, Golkari Y, Mohammadi-Khorsand T, Shakibaie M R. 2014.** Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb>.
- Shakerifard P, Gancel F, Jacques P, Faille C. 2009.** Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling*., 25:533-41.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. 2004.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology* **38**: 428-32.
- Sutherland W. 2001.** The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* **9**: 222-227.

T

- Teh H, Flint S, Palmer J, Lindsay D, Andrews P, Bremer P. 2011.** Thermoresistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal* **21**: 742-747.
- Tormo H. 2010.** Diversité des flores microbienne des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse III - Paul Sabatier France 200p.
- Tremplay E, Déziel. 2010.** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility *BMC Genomics*, 11:587.

V

- Vanhaecke E, J. Remon, M. Moors. 1990.** Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion to 304 and 316-L Stainless Steel: Role of Cell Surface Hydrophobicity. *Applied and environmental microbiology* **56**: 788-795.
- vanOss J. 1995.** Hydrophobicity of biosurfaces-origin quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**: 91–110.
- Vu B, Chen M, Crawford J, Ivanova P. 2009.** Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilmformation. *Molecules* **14** (7): 2535-54.

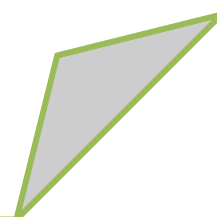
W

Whitehead A, Verran J. 2009. The effect of substratum properties on the survival of attached microorganisms on inert surfaces. *Springer Series on Biofilms* **4**: 13-33.

Z

Zobell E. 1943. The effect of solid surface upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* **46**:39-56.

Annexes



Annexe I : Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)

(Suivant les fournisseurs)

Gélose nutritive

Extrait de viande	1g
Peptone.....	15g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

pH =7,2

Autoclaver 15 min à 120°C

Gélose Oxford

Gélose VRBL

Gélose Chapman

Gélose TSA

Gélose BHIA

Infusion coeur-cerveille-peptone	27,5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique.....	2,5g
D (+) Glucose.....	2g
Agar	15g

pH=7,4

Autoclaver 15 min à 120°C

Bouillon nutritif

Extrait de viande	1g
Peptone.....	15g
Chlorure de sodium	5g

pH=7,2

Autoclaver 15 min à 120°C

Annexe II : composition des colorants, tampons et réactifs ((pour 1 litre d'eau distillée)

Cristal violet (0,1%) 1g

Autoclaver 15 min à 120°C

Eau physiologique

Eau distillée.....1l

Chlorure de sodium.....9 g

pH =7

Autoclaver 15 min à 120°C

Tryptone-Sel

Tryptone..... 1 g

Chlorure de sodium.....9 g

pH =7

Autoclaver 15 min à 120°C

Annexe III : coloration de Gram

La réalisation de la coloration de gram passe par les étapes suivantes :

- Préparation d'un frottis : étalement de la suspension bactérienne sur une lame puis fixation par la chaleur,
- Première coloration avec le violet de gentiane durant environ 1 minute,
- Laver à l'eau,
- Rajouter lugol durant environ 30 secondes,
- Laver à l'eau,
- Décolorer par la solution éthanol 90° C,
- Laver à l'eau,
- Coloration à la fuchine environ 1 à 2 minutes,
- Rajouter quelque goutte de l'huile à immersion
- Observer après séchage (objectif X 100).

Présenté par :
M^f Tibah Younes
M^{elle} Dib Selma

Présidente : M^{me} Roula
Examinatrice : M^{me} Bakka
Encadreur : Dr Ait Meddour

Etude préliminaire du potentiel d'adhésions des souches pathogènes et altération sur supports abiotiques

Résumé

Au cours de ce travail, quatre bactéries indésirables (*E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *P.aeruginosa* ATCC 27853 et *Listeria innocua* CLIP 74915), ont été utilisées dans le but d'une étude préliminaire de leur potentiel d'adhésion sur support abiotique à savoir l'acier inoxydable AISI 316 L (caractère hydrophobe) et le verre (caractère hydrophile). L'adhésion des bactéries sur les deux supports a été suivie par un dénombrement des cellules viables cultivables (UFC /cm²). Les résultats ont clairement montré que toutes les souches arrivent à adhérer sur les différents supports et ce au bout de 3 h de contact et que le pouvoir d'adhésion des bactéries sur les différents supports ainsi que la formation de biofilms, diffère d'un type de matériau à un autre et d'une souche à une autre.

Mots clés : biofilms, bactéries pathogènes et adhésion.

Abstract

In this work, four undesirable bacteria (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Listeria innocua* CLIP 74915) were used for a preliminary study of their adhesion potential on abiotic support namely AISI 316 L stainless steel (hydrophobicity) and glass (hydrophilicity). The adhesion of the bacteria to the two supports was followed by a count of the viable culturable cells (CFU / cm²). The results clearly showed that all the strains could adhere to the various supports after 3 hours of contact and that the adhesion power of the bacteria and the formation of biofilms on the various supports differed from one type of material to another and from one strain to another.

Key words: biofilms, pathogenic bacteria and adhesion.

ملخص

استعملت خلال هذا العمل أربع أنواع من البكتيريا الضارة وهي: *E.coli* ATCC 25922 ، *Listeria innocua* CLIP 74915، *P. aeruginosa* ATCC 27853، *S. aureus* ATCC 25923 بهدف دراسة أولية لقدرتها على الالتصاق على حامل غير حيوي مثل فولاذ لا يصدأ AISI 316 L له خاصية كارهة للماء والزجاج والذي له خاصية محبة للماء. التصاق البكتيريا بهذين الحاملين متبوع بتعداد للخلايا الحية القابلة للزرع ، النتائج أظهرت بوضوح أن كل السلالات المقبلة على الالتصاق على مختلف الحوامل وبعد ثلاث ساعات من الاتصال بالحامل تمكنت من الالتصاق بالحوامل وكذلك استطاعت تشكيل أغشية حيوية وهو ما يسمى بالبيوفيلم، والذي يختلف من حامل إلى اخر و من سلالة إلى سلالة أخرى. **كلمات مفتاح:** أغشية حيوية، بكتيريا ممرضة و التصاق.