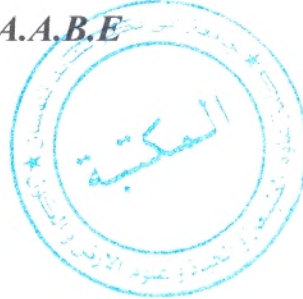


MAST-Bio-248 / 03

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABOU BEKR BELKAID - TLEMCEM
Faculté Des Sciences de la Nature, de la Vie, et de Terre et l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire L.A.M.A.A.B.E



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option

Microbiologie

Inscrit Sous: 6432
Date de: 09/07/2012
Cote:

THEME

Effet d'un traitement alcalin sur l'hydrophobicité des spores de Bacillus cereus

Présenté par :

M^{lle} Khennous Soumia

Soutenue le 09 Juillet 2012, devant le jury composé de :

Président : Mr. BENDAHOU., M

MCA: Université Abou bekr Belkaid

Promotrice : Mme MALEK., F

MAA : Université Abou bekr Belkaid

Examinatrice : Mme BENDIMERAD., N

MAA : Université Abou bekr Belkaid

Année Universitaire : 2011-2012

Remerciements

Tout d'abord mes remerciements s'adressent à Mme Malek F., maitre assistante, chargée de cours au département de biologie, université de Tlemcen pour m'avoir fais l'honneur de diriger ce travail. Je tenais, une fois encore, à leur exprimer toute ma reconnaissance pour ses précieux conseils, sa rigueur scientifique et pour le soutien qu'elle m'a apporté pour la mise en forme de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent également à Mr Bendahhou M., maitre de conférence chargée de cours au département de biologie, université de Tlemcen Pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de présider ce jury.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Mme Bendimerad N., maitre assistante, chargée de cours au département de biologie, université de Tlemcen pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant d'être l'examineur de ce travail .



Dédicaces

A mes parents pour avoir toujours su me montrer les valeurs essentielles, merci pour votre amour et votre soutien inestimable. Je souhaite ici vous témoigner très sincèrement toute mon affection et ma reconnaissance.

Je dédie ce travail surtout à Lotfi pour m'avoir toujours écoutée et pour sa patience, et son soutien.

A mon frère Amine et mes sœurs Dalila et Hauda pour leurs présence et encouragements sans faille .

A à mes nièces préférées Allaa et Israa : gros bisous.

A ma grande mère et toute ma famille ; merci

A mes amis ; Meriem, Fouzia, Sara, Lamia, Amina et Asmaa Pour tous ces bons moments passés ensemble et ceux à venir

A ceux que j'ai manqué de citer.

Merci

Résumé

Cette étude a été conçue pour évaluer l'hydrophobicité des spores de *B. cereus* dans des conditions simulant la première étape du CIP appliqué dans les laiteries de la région de Tlemcen: **NaOH** à des températures élevées (**70°C et 80°C**). Et comment ces conditions peuvent affecter leurs propriétés de surface.

Le taux d'adhésion à l'hexadécane des spores de 12 souches appartenant au groupe *B. cereus* est évalué par la méthode MATH (adhésion microbienne aux hydrocarbures). Ce taux d'adhésion varie de 20.67 % jusqu'à 66.36%, 8 souches (S1, S2, S3, S5, S7, S9, S10, S12) montrent une affinité inférieure à 40%, elles sont donc hydrophiles. Les souches (S4, S6, S11) sont hydrophobes avec des valeurs de l'ordre de 43.88%, 46.73 % et 56.89%. La souche S8 est hautement hydrophobe avec une valeur de 66.36%.

Les résultats obtenus après le traitement alcalin ont montré que des températures et des concentrations élevées sont exigées pour des réductions importants dans le pourcentage d'hydrophobicité.

Mots clés : *Bacillus cereus*, spores, hydrophobicité, adhésion, MATH, traitement alcalin, propriété de surface, NaOH



Liste des Abréviations

BAP: Biofilm Associated Proteins

BATH: Bacterial adherence to hydrocarbons

B. cereus: *Bacillus cereus*

CC: Caractères communs

CD: Caractères distinctifs

CIP: Cleening in place

°C: Degré Celsius

DO: Densité optique

e DNA: extracellular DNA

EDS: Eau distillée stérile

ELS: Energie libre de surface

EPS: Extra cellular polymerec substances

HACCP: Hasard analysis critical contrôle point

HAT: Hydrophobicité après traitement

HI: Hydrophobicité initiale

IAA: Industrie agroalimentaire

LPS: Lipopolysaccharides

MATH: Microbial Adhesion To Hydrocarbons

MATS: Microbial Adhesion To Solvants

NEP: nettoyage en place

nm: nanomètre

Min: minutes

QS: Quorum sensing

μm : micromètre



Liste des tableaux

Tableau 1: Les sept groupes génétiques de <i>Bacillus cereus</i> et leurs principales caractéristiques.....	2
Tableau 2: Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe <i>B.cereus sensu lato</i>	5
Tableau 3: Évidence pour l'influence de l'environnement de sporulation sur des propriétés des spores de <i>B. cereus sensu lato</i>	9

Liste de figures

Figure 1 : Photographie en microscopie de <i>Bacillus cereus</i> en phase stationnaire de croissance.....	3
Figure 2 : Cycle de transmission de <i>B.cereus</i> , avec les différentes niches.....	4
Figure 3 : Photographie en microscopie électronique d'une culture sporulée de <i>Bacillus cereus</i>	8
Figure 4 : Spore de <i>B.cereus</i> observé en microscopie électronique.....	10
Figure 5 : Un vieux biofilm de <i>B.cereus</i> formé sur la surface d'acier inoxydable observé par microscopie électronique à balayage.....	11
Figure 6 : Présentation schématisée des mécanismes et des composants impliqués dans la formation et la dispersion du biofilm.....	13
Figure 7 : l'adhésion réversible.....	15
Figure 8 : adhésion irréversible.....	15
Figure 9 : Schéma du potentiel d'interaction entre un micro-organisme et une surface.....	16
Figure 10 : Schéma des forces en présence dans un milieu humide.....	17
Figure 11 : Structures cellulaires conditionnant les premières étapes de l'adhésion.....	22
Figure 12 : Observation microscopique de <i>Bacillus cereus</i> après coloration de Gram (Gx100).....	28
Figure 13 : Observation microscopique de <i>Bacillus cereus</i> en phase de sporulation (Gx 100).....	28
Figure 14 : les étapes de préparation de suspension sporale.....	29
Figure 15 : Adhésion des 12 souches du groupe <i>B. cereus</i> à l'hexadécane.....	32
Figure 16 : Adhésion de 8 souches de <i>B. cereus</i> à l'hexadécane avant et après traitement alcalin à 70°C	33
Figure 17 : Adhésion de la souche S1 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	34
Figure 18 : Adhésion de la souche S2 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	35
Figure 19 : Adhésion de la souche S3 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin... ..	35
Figure 20 : Adhésion de la souche S4 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	36
Figure 21 : Adhésion de la souche S5 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	36
Figure 22 : Adhésion de la souche S6 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	37
Figure 23 : Adhésion de la souche S7 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	37
Figure 24 : Adhésion de la souche S8 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin... ..	38

Figure 23 : Adhésion de la souche S7 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	37
Figure 24 : Adhésion de la souche S8 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin....	38
Figure 25 : Adhésion de la souche S9 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.....	38
Figure 26 : Adhésion de la souche S10 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin....	39
Figure 27 : Adhésion de la souche S11 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin....	39
Figure 28 : Adhésion de la souche S12 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin....	40

Table des matières

Résumé

Abstract

Introduction générale

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : *Bacillus cereus*, Généralités et pouvoir pathogène

I.1. Présentation du groupe <i>Bacillus cereus</i>	1
I.2. Caractères généraux du groupe <i>Bacillus cereus</i>	3
I.3. Pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i>	6
I.4. La spore de <i>Bacillus cereus</i>	7
I.4.1. Introduction.....	7
I.4.2. Composition et ultrastructure.....	7
I.4.3. Environnement de sporulation et propriétés des spores.....	8
I.4.4. Propriétés des spores de <i>B. cereus</i> et adhésion aux surfaces.....	9
I.4.5. Problème de résistance de spores en industrie laitière.....	10

Chapitre II : L'adhésion microbienne aux surfaces

II.1. Introduction.....	12
II.2. Les biofilms.....	12
✓ Biofouling en industrie	
II.3. L'adhésion aux surfaces solides: première étape de la formation des biofilms.....	14
II.3.1. L'adhésion initiale réversible.....	14
II.3.2. Adhésion initiale irréversible.....	15
II.3.3. Modèles prédictifs de l'adhésion bactérienne sur des supports solides.....	15
II.3.3.1. La théorie DLVO.....	16
II.3.3.2. La théorie du mouillage, basée sur la thermodynamique des surfaces.....	17
II.3.3.3. La théorie DLVO étendue.....	17
II.4. Paramètres influençant l'adhésion des microorganismes au support.....	18
II.4.1. Facteurs liés au support.....	18
↓ Film conditionnant	
↓ Rugosité et microtopographies	
↓ Charge de surface	
↓ Propriétés physico-chimiques de la surface	



↓	Hydrophobie de surface	
II. 4.2.	Facteurs liées aux microorganismes.....	20
↓	Concentration et interaction microbiennes	
↓	Caractéristiques bactériennes	
↓	Composition biochimiques et structure moléculaire de la surface microbienne	
↓	Caractéristiques physico-chimiques de la surface cellulaire	
•	Technique d'évaluation:	
↓	Phase de croissance et état physiologiques	
↓	Adaptation phénotypique du microorganisme adhérent	
II. 4. 3.	Facteurs liés à l'environnement.....	23
II.5.	Lute contre le biofilm: contrôle d'adhésion microbienne.....	24
II.5.1.	Nettoyage et désinfection.....	24
II.5.2.	Les stratégies vertes de contrôle de biofilm.....	26
➤	Utilisation de détergents basés sur des enzymes	
➤	Utilisation des phages	
➤	Contrôle par les interactions microbiennes/ molécules de métabolite	
➤	Micro et nanotechnologie	

Partie II: Etude expérimentale

❖	Matériel et méthodes	
I.1.	Les cultures bactériennes.....	27
I.1.1.	Origine de souches.....	27
I.1.2.	Revivification des souches.....	27
I.1.3.	Confirmation des tests d'identification.....	27
I.1.4.	Préparation de la suspension sporale.....	28
I.1.5.	Traitement thermique de la suspension sporale.....	29
I.2.	L'adhésion à l'hexadécane: méthode MATH.....	30
I.2.1.	Protocole expérimental.....	30
II.	Effet d'un traitement alcalin sur le pouvoir d'adhésion des spores.....	30
II.1.	Mise au point du protocole expérimental.....	30
❖	Résultats et discussions	
I.	Evaluation de l'hydrophobicité des spores de <i>B. cereus</i>	32
I.1.	Détermination de l'hydrophobicité initiale des spores.....	32

II. Evaluation de l'effet d'un traitement alcalin sur le pouvoir d'adhésion des spores.....	33
II.1.Effet du traitement alcalin à 70°C.....	33
II. 2.Effet du traitement alcalin sur l'hydrophobicité des spores de <i>B. cereus</i> à 80°C..	34.

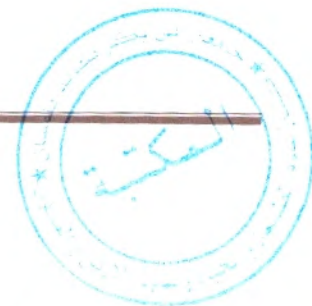
Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction Générale



La contamination microbienne des surfaces des équipements utilisés en industrie agroalimentaires est de plus en plus souvent identifiée comme la source de problèmes industriels sévères. Ce phénomène peut être à l'origine d'une diminution des rendements et d'une augmentation des coûts de production. Ces microorganismes peuvent non seulement entraîner la dégradation prématurée des équipements et l'altération des propriétés organoleptiques des produits en cours de fabrication, mais également de se retrouver dans le produit fini et favoriser le développement de toxi-infections alimentaires collectives.

La contamination est due principalement à l'adhésion des bactéries aux surfaces et à la formation de biofilm qui fait acquérir aux bactéries de nouvelles propriétés physiologiques à savoir une communication intercellulaire et une résistance particulière aux agressions externes et en particulier aux agents antimicrobiens. Ce qui rend leur élimination très difficile par les systèmes classiques de nettoyage/désinfection.

Certaines espèces de *Bacillus* sont capables de produire des spores hautement hydrophobes qui adhèrent facilement à divers substrats comme ceux trouvés en industrie alimentaire tels que l'acier inoxydable et les polymères et pouvant facilement germer et conduire ainsi à la formation du biofilm. De ce fait, les spores sont très difficiles à éliminer des tuyaux, et des canalisations, et constituent un vrai problème pour l'industrie laitière.

La maîtrise de l'hygiène des équipements passe donc par une meilleure connaissance des facteurs influençant l'adhésion et la résistance au nettoyage des spores de *B. cereus*. C'est dans ce contexte que cette étude a été réalisée.

Ce travail permet d'évaluer l'effet d'un traitement alcalin sur le pouvoir d'adhésion des spores de *B. cereus* isolées à partir d'une entreprise de production laitière, afin d'améliorer les procédures de nettoyage et éliminer les spores des surfaces des équipements au sein de cette unité. Le pouvoir d'adhésion est évalué en utilisant la technique MATH, qui permet de mesurer l'hydrophobicité des cellules. L'hydrophobicité est une caractéristique importante des propriétés des surfaces bactériennes impliquées dans l'adhésion.

Partie I:
synthèse bibliographique

Chapitre I:
Bacillus cereus, Généralités et
pouvoir pathogène



Chapitre I : *Bacillus cereus*, Généralités et pouvoir pathogène

I.1. Présentation du groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato*, est constitué de six espèces taxonomiquement très proches : *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis*. Ce groupe appartient à la famille des *Bacillaceae* (section 13 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Daou, 2008).

Ce groupe est hautement hétérogène et inclut des espèces avec de grandes variations des phénotypes, des besoins nutritionnels et d'autres caractéristiques physiologiques et métaboliques (Abec et al, 2011).

La taxonomie du groupe *B. cereus* est complexe et controversée car les caractéristiques phénotypiques discriminantes entre les différentes espèces ne sont pas stables et leurs déterminants génétiques peuvent être échangés, y compris au sein de matrices alimentaires. Pour des raisons cliniques ou économiques, les espèces distinctes sont actuellement maintenues (Conseil supérieur de la santé, 2010).

A partir des études phylogénétiques récemment proposés sept groupes principaux (I-vii) ont été distingués au sein du groupe *B. cereus sensu lato* en utilisant des critères génétiques et phénotypiques. A ce moment les espèces précédemment mentionnée ont été distribuées et marquées avec une nomenclature spécifique (Guinebertière et al, 2008). (Tableau 1).

Les 7 groupes génétiques possèdent des capacités d'adaptation thermique différentes, des plus psychotrophes aux plus thermotolérants, et différents degrés d'association avec des maladies transmises par les aliments. Le groupe VI, le plus psychrotrophe n'a pas pour l'instant été associé à des toxi-infections alimentaires. Il s'agit d'une classification opérationnelle pour l'appréciation et la gestion du risque *B. cereus* dans les aliments (Afssa, 2009).

CHAPITRE I

Tableau 1 : Les sept groupes génétiques de *Bacillus cereus* et leurs principales caractéristiques. (Carlin et al, 2010).

Groupe	Association aux espèces actuellement définies	Association aux cas d'intoxication alimentaire.	Gamme de croissance : température (C°)	Resistance thermique des spores	Observations
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	NON	10-40	?	Mésophile, colonies rhizoïdes sur Agar
II	<i>B. cereus</i> II	Oui	7-40	++	La plupart des espèces sont psychrotolérantes. La signature <i>cspA</i> psychrotolérante est absente.
	<i>B. thuringiensis</i> II				
III	Espèces émétiques	Oui	15-45	+++	Mésophiles
	<i>B. cereus</i> III,				
	<i>B. thuringiensis</i> III				
	<i>B. anthracis</i>				
IV	<i>B. cereus</i> IV,	Oui	10-45	++	Mésophiles
	<i>B. thuringiensis</i> IV				
V	<i>B. cereus</i> V,	Oui	8-40	++	Mésophiles
	<i>B. thuringiensis</i> V				
VI	<i>B. weihenstephanensis</i>	Non	5-37	+	Toutes les espèces sont psychrotolérantes, avec une signature <i>cspA</i> psychrotolérante, spécifique de ce groupe (Francis et al, 1998).
	<i>B. mycoïdes</i>				
	<i>B. thuringiensis</i> VI				
VII	' <i>B. cytotoxicus</i> '	Oui	20-50	+++	Thermotolérants ; rare isolés à partir de ce groupe, mais généralement associés à des intoxications alimentaires.

Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* sont bien connues des industriels de l'agroalimentaire, notamment dans le secteur laitier. Forts producteurs d'enzymes, ces micro-

CHAPITRE I

organismes entraînent des altérations des produits à l'origine de pertes économiques non négligeables (**Puterflam et al, 2009**).

La diversité du groupe *B.cereus* s'étend d'espères utilisées comme probiotiques aux espèces qui produit des facteurs de virulence causant des maladies sérieuses (**shaheen, 2009**). En effet, Le métabolisme de *Bacillus* a été exploité en industrie pour la production des molécules telles que : riboflavine, β -lactamases, la polymyxine et une diversité de toxines destinée contre les insectes et les nématodes. (**Maughan et Vander Auwera, 2011**).

Le groupe *B.cereus* contient des espèces qui sont pathogènes des insectes, des mammifères, notamment de l'homme. *B. anthracis*, l'agent étiologique de l'anthrax est responsable de la maladie du charbon chez l'homme et l'animal. (**Daou, 2008**). *B. thuringiensis* est un pathogène des insectes très largement utilisé comme biopesticide mondiale, mais peut également agir come pathogène opportuniste humain entraînant la nécrose de tissu, l'infection pulmonaire, ou des intoxications alimentaires. (**Tourasse et al, 2011**), *B. cereus sensu stricto* pathogène humain opportuniste, peut causer diverses maladies telles que l'endophtalmite ou le périodontites mais il est plus fréquemment impliqué dans les maladies gastro-intestinal avec un syndrome diarrhéique ou émétique. (**Auger et al, 2009**).*B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes* sont distingués phénotypiquement de l'espèce *B. cereus sensu stricto* par leurs colonies rhizoïdes et la composition des cellules entières en acides gras. Enfin, *B. weihenstephanensis* est l'espèce résistante au froid dans le groupe *B. cereus*, Capable de se développer à des températures inférieures à 7 °C en milieu aérobie. (**Shaheen, 2009**).

I.2.Caractères généraux du groupe *Bacillus cereus*

Les souches de *Bacillus cereus* sont constituées de bacilles à Gram positif ou à Gram variable, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 μm et d'un diamètre moyen de 1,4 μm , souvent groupés en chaînes (**Figure1**), formant des spores non déformantes, aéro-anaérobies. (**Euzéby, 2003**).

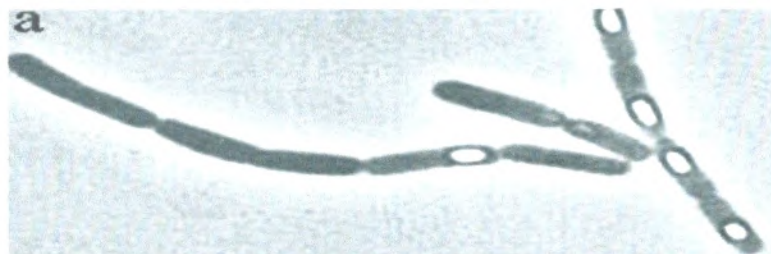


Figure 1 : photographie en microscopie de *Bacillus cereus* en phase stationnaire de croissance. (**Gaillard, 2003**).

CHAPITRE I

Les membres du groupe *B.cereus* sont caractérisés par leur ubiquité et peuvent être isolés à partir d'environnement divers : l'eau douce, l'eau salée, sol, plantes, animaux et air. (Maughan et Vander Auwera, 2011). Ils sont aussi isolés à partir de produits alimentaires et agricoles. (Figure 2), leurs natures omniprésentes, combinée avec leur capacité de sporuler et se développer à basse température, le rendent difficile à contrôler. (Hsueh et al, 2006). Les analyses génomiques suggèrent qu'ils soient adaptés vers un cycle de vie symbiotique ou parasite. (Abee et al, 2011).

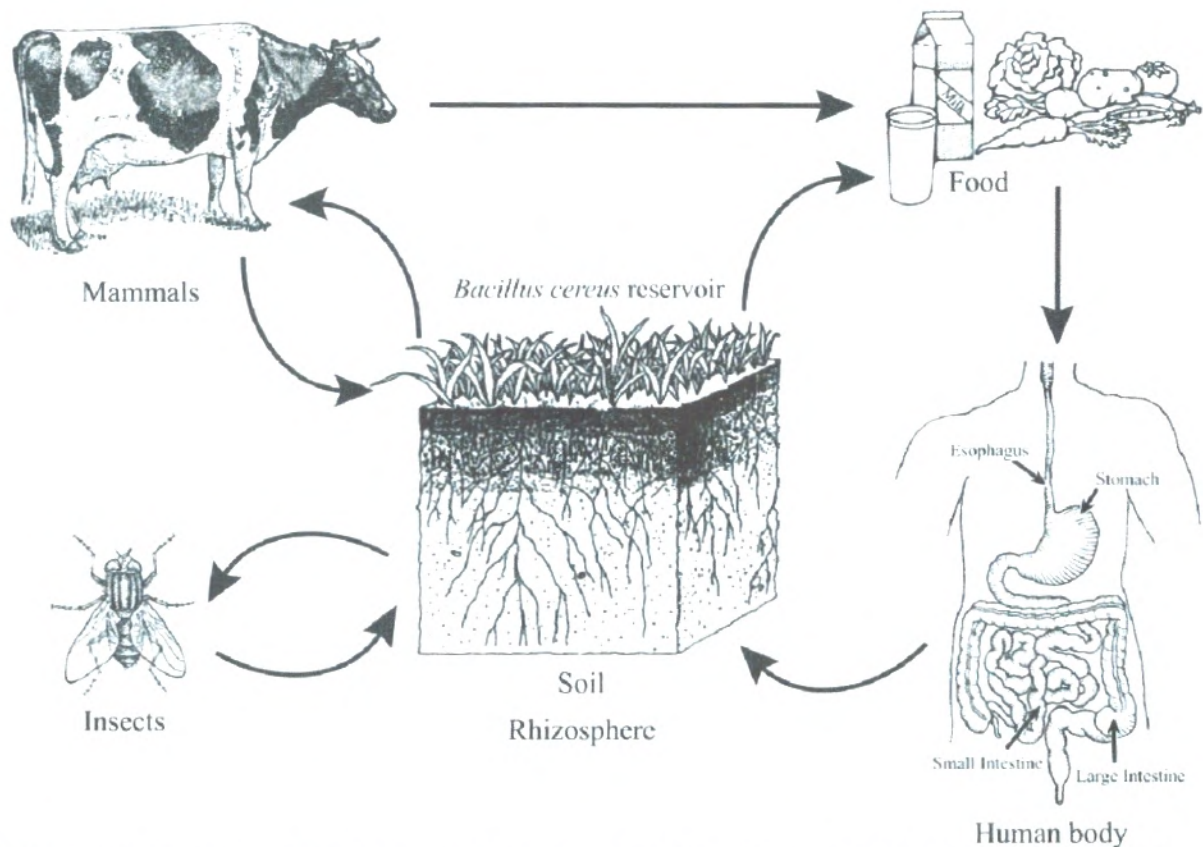


Figure 2 : Cycle de transmission de *B.cereus*, avec les différentes niches (Abee et al, 2011).

Ce sont des bactéries mésophiles qui produisent des endospores résistants à la chaleur avec un intervalle de croissance allant de 10 °C jusqu'à 48 °C, et des températures optimales de croissance situés entre 28 °C et 35 °C. Ils sont aussi capables de développer dans large gamme de pH qui varie de 4.9 à 9.3 (Schneider, et al 2004). Cependant, certaines souches peuvent cultiver à 7 voire même à 4 °C (Euzéby, 2003). Les principaux caractères phénotypiques communs et distinctifs au sein de groupe *B.cereus* sont décrits dans le (tableau 2).



CHAPITRE I

Tableau 2: Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe *B.cereus* *sensu lato* (Guinebretière et Sanchis, 2003).

Caractères	<i>B cereus</i>	<i>B thuringiensis</i>	<i>B mycoïdes</i>	<i>B anthracis</i>	<i>B weihenstephanensis</i>	<i>B pseudomycoïdes</i>
Lécithinase	+	+	+	+	+	+
Utilisation du mannitol	-	-	-	-	-	-
Resistance aux lysosomes	+	+	+	+	+	+
C Fermentation du glucose	+	+	+	+	+	+
C Réaction VP	+	+	+	+	+	+
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+	?
Mobilité	+ /-	+ /-	-	-	+ /-	-
Hémolyse (sang du mouton)	+	+	(+)		+	?
Colonies rhyzoïdales	-	-	+	-	-	+
C Croissance à <7 °C en milieu liquide agité et absence de croissance à 43 °C	-	-	-	-	+	?
D Cristal parasporal (endotoxine pathogène des insectes)	-	+	-	-	-	-
Lyse par phage gamma	-	-	-	+	-	?
Sensibilité à la pénicilline	-	-	-	+	-	?
Plasmides Pxo1 et Pxo2 et toxine impliquée dans la maladie du charbon	-	-	-	+	-	+
Entérotoxines	+	+	+	?	+	+?

CHAPITRE I

CC : caractères communs ; CD : caractères distinctifs. +, < 15 % positives ; +/-, 50 à 84 % positives ; (+), positives faibles ; ? : absence de données suffisantes.

1.3. Pouvoir pathogène de *Bacillus cereus* :

Les espèces du groupe *B. cereus* sont généralement étroitement liées au niveau génomique, et toutes ces espèces ont le potentiel d'être pathogène car elles codent dans le chromosome un ensemble commun des entérotoxines et des enzymes dégradantes qui peuvent causer la diarrhée et d'autres maladies gastro-intestinales (**Tourasse et al, 2011**).

B. cereus se développe facilement dans les aliments et peut être à l'origine d'empoisonnement alimentaire. En effet, *Bacillus cereus* est à l'origine de deux types de maladies transmises par les aliments :

- Une maladie caractérisée par des symptômes diarrhéiques, causées par l'ingestion de cellules et/ou de spores de *Bacillus cereus*, suivie d'une production d'entérotoxines au niveau de l'intestin, accompagnés de douleurs abdominales, de nausées, parfois de fièvre, survenant généralement dans les 8 - 16 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. Il s'agit d'une toxi-infection (**Afssa, 2009**).
- Une maladie caractérisée par des syndromes émétiques, est souvent associée aux aliments riches en amidon, elle est provoquée par la toxine émétique de *B. cereus*, cereulide produite dans l'aliment avant l'ingestion. Les symptômes incluent principalement la nausée et le vomissement qui se produisent entre 30 minutes et 6 heures après l'ingestion et qui durent généralement de 6 jusqu'à 24 heures (**Abee et al, 2011**).

En plus d'être un agent commun d'intoxications alimentaires, *B. cereus* est occasionnellement impliqué dans des infections locales et systémiques, en particulier chez les patients immunodéprimés (**Vilas- Boas et al, 2007**).

Outre les facteurs de virulence spécifiques de *B. anthracis*, de *B. thuringiensis* ou de *B. cereus*, d'autres facteurs communs impliqués dans le pouvoir pathogène de ces bactéries ont été identifiés. La plupart de ces facteurs sont extracellulaires et interviennent probablement dans les pathologies occasionnées de *B. cereus* (**Daou, 2008**).

CHAPITRE I

I.4. La spore de *Bacillus cereus* :

I.4.1. Introduction :

Au cours de leur croissance, les bactéries du groupe *B. cereus* sont présentes sous deux formes :

- La cellule végétative est la forme qui permet à la bactérie de se multiplier lorsqu'elle est dans un environnement favorable pour son développement.
- La spore est la forme dormante et de résistance des bactéries. Les spores permettent aux bactéries se retrouvant dans un milieu défavorable ou hostile, de survivre dans un état de dormance. **(Geneviève, 2008)**. Dans ces conditions, elle est particulièrement résistante à la chaleur, à la dessiccation, aux radiations ainsi qu'aux agents chimiques, lorsque l'environnement devient à nouveau favorable la spore germe pour redevenir une cellule végétative.

La spore possède une structure propre qui diffère très fortement de celle de la cellule végétative qui lui donne naissance. **(Gaillard, 2003)**.

I.4.2. Composition et ultrastructure :

Toutes les spores de *Bacillus* partagent une architecture commune consistant en un ensemble de couches concentriques qui se représentent de l'extérieur vers l'intérieur : **(Figure 3)**.

L'exosporium: Les spores de *Bacillus cereus* sont entourées d'une enveloppe, l'exosporium, dont les propriétés seraient responsables de leur forte aptitude à adhérer aux surfaces inertes **(Tauveron et al, 2006)**. Il est en contact directe avec les matériaux et constitue d'une couche basique paracrystalline entourée par des appendices **(Faille et al, 2010)**. C'est la couche externe qui entoure toutes les autres couches de la spore, elle est composée principalement de glycoprotéines, de protéines et de lipides.

La tunique : qui est composée en majorité de protéines. Cette couche confère à la spore son imperméabilité ainsi que sa grande résistance à différents agents chimiques ou environnementaux **(Geneviève, 2008)**.

Le cortex : il représente 10 à 20 % de l'ensemble, c'est une couche épaisse d'aspect monomorphe, il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec beaucoup moins de liaisons internes et très sensible au lysozyme.

La membrane interne c'est une membrane en double couche classique qui deviendra la membrane cellulaire de la forme végétative **(Gaillard, 2003)**.

CHAPITRE I

Le cœur ou corps sporal (core): c'est l'analogue du protoplaste des cellules végétatives, il contient l'ADN, les ribosomes, l'ARNt et une concentration élevée d'acide dipicolinique.

La paroi sporale (Germ Cell Wall): elle est composée de peptidoglycane identique à celle de la cellule végétative (shaheen, 2009). (Figure 3).

La résistance des spores à un environnement défavorable à leur croissance est conférée par les différentes couches qui les composent (Geneviève, 2008).

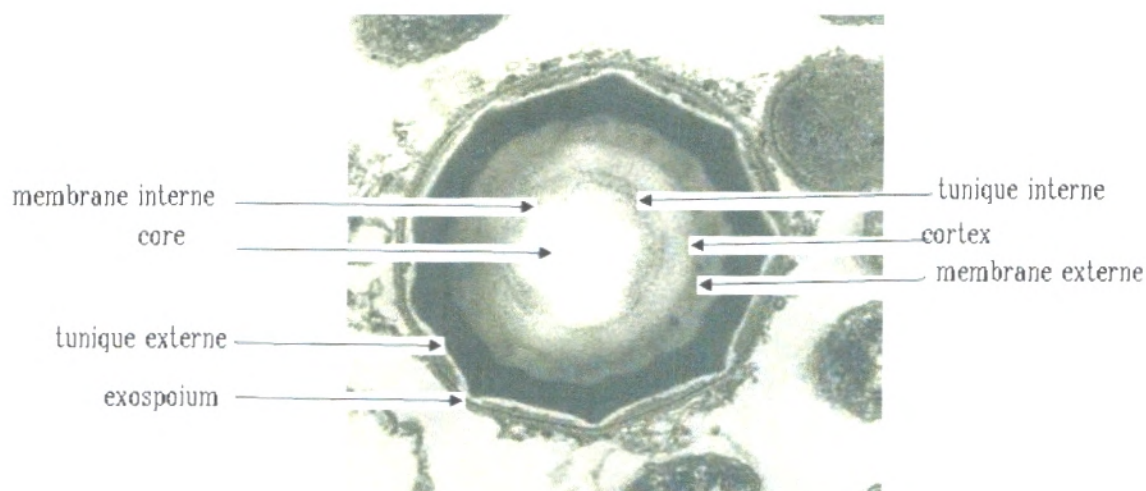


Figure 3 : Photographie en microscopie électronique d'une culture sporulée de *Bacillus cereus* (Shaheen, 2009).

I.4.3. Environnement de sporulation et propriétés des spores :

Le processus menant à la production des spores à partir des cellules végétatives (sporulation) est déclenché par l'épuisement nutritif et le quorum sensing. Il a été démontré que l'environnement de sporulation de *B. cereus* a une influence critique sur les spores. Ceci peut affecter leurs résistance aux stress physiques et chimiques appliqués dans l'industrie alimentaire, leurs structures et leurs composition, ou la germination de ces spore. En effet n'importe quel changement de climat affectant l'environnement de la sporulation peut potentiellement induire une modification des propriétés de spore (Carlin et al, 2010) (tableau 3).

CHAPITRE I

Tableau 3 : Évidence pour l'influence de l'environnement de sporulation sur des propriétés des spores de *B. cereus* sensu lato (Carlin et al, 2010).

Facteurs impliqués pendant la sporulation	Propriétés induites de spore	Références
Température	Domages accrus de l'exosporium à 40°C	Faille, Tauveron, Gentil-Lelievre, and Slomianny (2007)
Température	Une résistance plus élevée à la température, l'acide, le stress alcalin et hydrogène de peroxyde des spores formées à 45 °C	Baweja et al. (2008)
Température	Diminution de résistance thermique et augmentation de germination des spores formées aux baisses températures	Gounina-Allouane, Broussolle, and Carlin (2008)
Température	Augmentation de valeurs d (le temps à la première réduction décimale) quand la température de sporulation augmente	Gonzalez, Lopez, Martinez, Bernardo, and Gonzalez (1999)

I.4.4. Propriétés des spores de *B.cereus* et adhésion aux surfaces :

Plusieurs propriétés des spores de *B.cereus* font d'elles un grand problème pour l'industrie alimentaire. Elles sont fortement résistant aux conditions défavorables comme la chaleur, la déshydratation, la dessiccation, le rayonnement, et les désinfectants.

En effet ces spores sont hydrophobes et adhèrent aux équipements ce qui peut conduire à la formation de biofilm (shaheen, 2009).

La capacité des spores à adhérer à l'acier varie selon les souches. Celles appartenant au groupe *B. cereus* sont généralement les plus adhérentes.

CHAPITRE I

Cependant de grands différences existent entre les propriétés de surface de la spore des membres du groupe *B.cereus*, principalement dans la longueur et le nombre d'appendices, la présence et la taille de l'exosporium, l'hydrophobicité et la composition des protéines adsorbées, qui résultent des différences dans leurs capacité d'adhérer et résister au procédé de CIP (**Tauveron et al, 2006 ; Faille et al, 2010**).

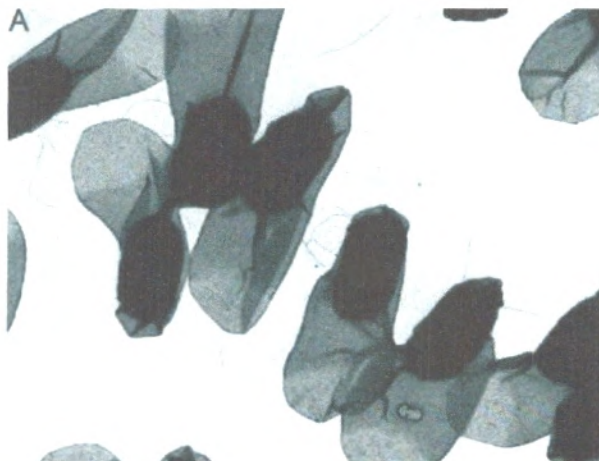


Figure 4 : Spore de *B.cereus* observé en microscopie électronique (**Tauveron et al, 2006**).

I.4.5. Problème de résistance de spores en industrie laitière :

La présence de spores de *Bacillus cereus* pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires notamment l'industrie laitière car non seulement elles sont résistantes à la chaleur mais elles ont la capacité d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable (**Figure 5**). De ce fait, les spores sont très difficiles à éliminer des tuyaux, des canalisations, des réservoirs, les procédés de nettoyage classique ne permettent d'éliminer que 40 % des spores. (**Euzeby, 2003**).

Dans une installation laitière *B.cereus* constitue plus de 12% de la flore microbienne constitutive de biofilm. Comme cette bactérie est omniprésente en nature, elle est facilement retrouvée à travers les systèmes de production alimentaire et la contamination avec ces espèces est presque inévitable. (**Simões et al, 2010**).

L'occurrence de *B.cereus* dans le lait pasteurisé peut être expliquée par la présence de leurs spores thermorésistantes dans le lait cru ou par la recontamination du lait, due aux surfaces insuffisamment nettoyées et aseptisées. La conséquence principale de la contamination du lait par *B.cereus* est la diminution de la durée de conservation et l'occurrence d'un mauvais goût. *B. cereus* produit des protéases et des phospholipases

CHAPITRE I

extracellulaires thermorésistants qui causent la coagulation et des défauts d'amertume en lait. (Bernardes et al, 2010).



Figure 5 : Un vieux biofilm de *B.cereus* formé sur la surface d'acier inoxydable observé par microscopie électronique à balayage (Simões et al, 2010).

Chapitre II :
Contamination des surfaces
industrielles et formation de
biofilm.

CHAPITRE II

Chapitre II : Contamination des surfaces industrielles et formation de biofilm.

II .1.Introduction :

Les surfaces des équipements de transformation des produits alimentaires, y compris les systèmes fermés comme les pipes, les valves et les pompes ou les systèmes ouverts tels que les convoyeurs sont régulièrement contaminées par des microorganismes qui sont capables de former des biofilms. Ce qui est à l'origine d'un certain nombre de problèmes sérieux pour les opérations industrielles tels que le colmatage mécanique, la diminution des procédés de transfert thermique et biodétérioration des composants des systèmes métalliques et les polymères. En effet, les micro-organismes dans les biofilms catalysent des réactions chimiques et biologiques causant la corrosion du métal dans les canalisations et les réservoirs, ce qui peut avoir comme conséquence de grandes pertes dans les industries alimentaires. La contamination bactérienne peut affecter la qualité, et la sûreté des produits de l'industrie laitière avec des risques pour la santé de consommateur (**Faille et al, 2002 ; Simões et al, 2010 ; Öner et Ölmez, 2011**).

De ce fait, les chaînes de production sont quotidiennement nettoyées en place pour assurer la qualité et la sûreté bactériologiques des produits. Pour répondre à ces objectifs, les procédures efficaces d'hygiène sont d'importance primordiale (**Lécrivain-Nolf et al, 2000**).

II.2. Les biofilms:

Dans la nature les biofilms existent principalement comme des communautés complexes de multi-espèces bactériennes où chaque espèce remplit une niche écologique dans le biofilm selon son métabolisme et morphologie. Le biofilm peut se définir comme une communauté structurée des cellules bactériennes inclus dans une matrice polymérique produite par les bactéries elles-mêmes et adhérentes entre eux et à une surface réceptrice (**Qureshi et al, 2005**).

Le biofilm microbien est formé d'une communauté où la réponse de chaque cellule adhérente au sein de la communauté est tout à fait différente de la réponse des cellules planctonique de la même espèce. Généralement, les micro-organismes vivant dans les biofilms sont beaucoup plus résistants aux désinfectants et aux autres agents antimicrobiens que des micro-organismes dans une culture planctonique. La résistance accrue est provoquée par plusieurs facteurs en plus des processus contrôlés génétiquement (**Vlkova et al, 2008**). Beaucoup de mécanismes ont été proposés pour expliquer cette résistance des biofilms aux



CHAPITRE II

agents anti microbiens comme le caractère impénétrable du biofilm et le taux lent de croissance d'organismes (Abee et al, 2011).

Les moyens utilisés par les bactéries pour former des biofilms diffèrent selon les espèces considérées, mais on peut définir trois propriétés communes à tous les biofilms :

- ❖ Les cellules constituant le biofilm sont reliées entre elles par une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques,
- ❖ Le développement d'un biofilm est sous l'influence de signaux extracellulaires (environnementaux) et cellulaires (quorum sensing)
- ❖ Le biofilm protège les bactéries qui le constituent de l'action des agents antimicrobiens, des défenses immunitaires de l'hôte et d'éventuels prédateurs (De Chalvet de Rochemonteixles, 2009).

Les biofilms peuvent contenir divers polymères extracellulaires comme l'ADN extracellulaire (eDNA), les polysaccharides extracellulaires, les fibres amyloïdes, et des protéines associées au biofilm (BAP). La Communication entre les cellules pendant la formation et la dispersion des biofilms dépend du quorum sensing et des molécules signal. En outre, la motilité est un facteur important dans l'établissement de nouveaux biofilms et la dispersion des cellules des biofilms mature (Abee et al, 2011).

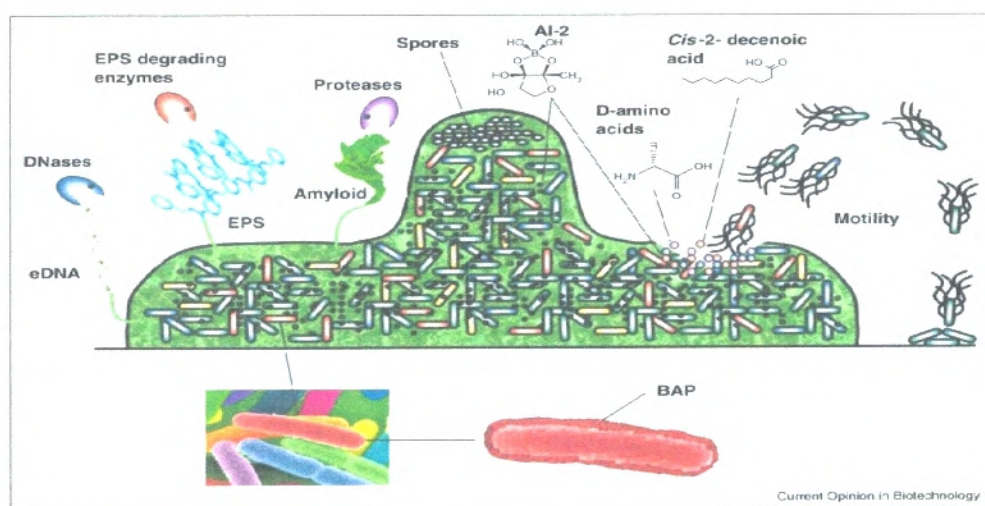


Figure 6 : Présentation schématique des mécanismes et des composants impliqués dans la formation et la dispersion du biofilm (Abee et al, 2011).

CHAPITRE II

✓ Biofouling en industrie :

Les biofilms microbiens contribuent au biofouling dans un large éventail de processus (**Karunakaran et Biggs, 2011**). Biofouling est un terme utilisé pour décrire la formation de biofilm non désirée sur les surfaces des équipements. Ceci peut se produire dans une large variété d'environnements artificiels et peuvent diminuer la performance et la durée de vie d'équipement de manière significative et causer la contamination et altérée la qualité des produits (**Raulio, 2010**).

II.3. L'adhésion aux surfaces solides : première étape de la formation des biofilms :

L'adhésion d'un microorganisme sur une surface solide est un processus complexe qui implique deux surfaces dont l'une au moins est de nature biologique (**Guillemot, 2006**). C'est est une action qui se caractérise par l'ensemble des phénomènes physico-chimiques, mécaniques et biologiques permettant à une bactérie de s'unir à une surface de façon durable (**Bertrand, 2004**). Elle constitue l'étape initiale de la formation des biofilms. Ce processus est régit par de nombreux facteurs, liés à la fois aux caractéristiques des microorganismes, du support et de l'environnement avec une diversité des acteurs impliqués et différents types d'interactions matériau/surface microbienne.

Ces interactions résultent des mêmes interactions physico-chimiques fondamentales (**Saulou, 2009**). En effet, une fois les microorganismes arrivent à proximité des surfaces par les mécanismes de transport, ils adhèrent initialement par l'intermédiaire des interactions physico-chimiques (**Boutaleb, 2007**).

L'adhésion bactérienne peut être divisée en deux étapes :

II.3.1.L'adhésion initiale réversible:

Cette approche des microorganismes vers le support conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à évaluer la surface sur laquelle elle se trouve, les cellules bactériennes établissent un premier contact avec la surface et interagissent avec le film conditionnant (**Salaün, 2009**). (**Figure 7**). L'adhésion initiale des bactéries aux surfaces est principalement un événement physico-chimique qui dépend des forces de longue distance comme les forces électrostatiques et thermodynamiques et des forces à courte distance comme les attractions de van der Waals (**Karunakaran et Biggs, 2011**).

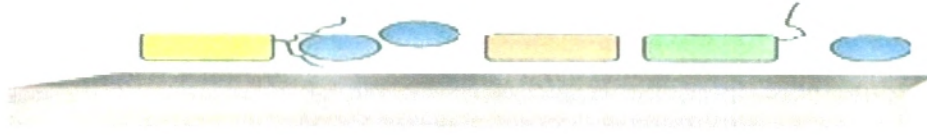


Figure 7 : l'adhésion réversible (Massicotte et al, 2009).

II.3.2. Adhésion initiale irréversible

L'attachement transitoire est suivi d'une association stable avec la surface. Ce mouvement collectif sur la surface permet aux bactéries de se diriger vers les zones où il est possible d'établir des interactions fortes entre ses molécules de surface et celles de substrat. (Figure 8). Ces interactions de haute énergie sont de type covalent. Cette adhésion stable est rendue possible par la sécrétion de polymères extracellulaires formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface. Ces exopolymères ont un rôle multiple : ils assurent l'attachement des microorganismes mais également le piégeage des éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne et protègent ces mêmes bactéries des agressions différentes (Salaün, 2009).

Cette étape est dépendante du temps et nécessite que les microorganismes soient capables d'exprimer un certain nombre de gènes conduisant à l'acquisition de nouvelles structures adhésives (Khalilzadeh, 2009).

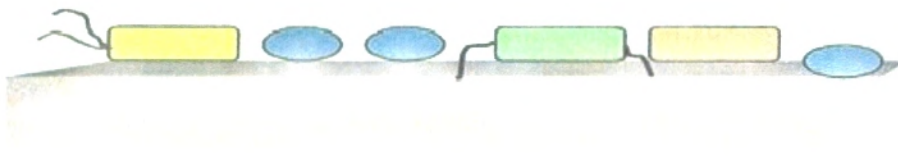


Figure 8 : adhésion irréversible (Massicotte et al, 2009).

II.3.3. Modèles prédictifs de l'adhésion bactérienne sur des supports solides.

Pour comprendre l'adhésion d'un microorganisme sur une surface, il est nécessaire de prendre en compte différents types d'interactions ainsi que leur évolution en fonction de la

CHAPITRE II

distance de séparation des corps considérés. La physico-chimie des surfaces fournit trois approches permettant de prédire l'adhésion d'un microorganisme sur une surface solide : (Guillemot, 2006).

II.3.3.1. La théorie DLVO :

Ce premier modèle fut développé par Derjaguin & Landau (1941) et par Verwey & Overbeek (1948), c'est la première théorie de la stabilité de l'état colloïdal.

L'adhésion microbienne était décrite comme un équilibre entre les interactions attractives de Lifshitz-van der Waals et les interactions électrostatiques répulsives ou attractives (Boutaleb, 2007).

La résultante de ces interactions conduit à l'attraction ou à la répulsion. Lorsqu'il s'approche à 10 nm du substrat, le micro-organisme adhère de manière réversible. A 5 nm, la résultante des forces devient positive, ce qui correspond au passage de la barrière de répulsion (figure 10). Les filaments d'expolymères synthétisés par la bactérie franchissent cette zone, ce qui permet au microorganisme d'atteindre le minimum secondaire à environ 2nm, et d'adhérer irréversiblement.

Cependant, la théorie DLVO ne permet pas d'expliquer les adhésions observées sur des surfaces non chargées négativement ou dans des solutions très électrolytiques (Khalilzadeh, 2009). Cette théorie est incomplète car elle est basée sur les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals mais elle ne tient pas compte des interactions de Lewis. En d'autres termes, elle ne tient pas compte des facteurs tels que la tension de surface, la déformation de la cellule bactérienne ou encore l'apparition non uniforme des charges électriques. Elle tient compte uniquement des liaisons intermoléculaires de type attraction-répulsion.

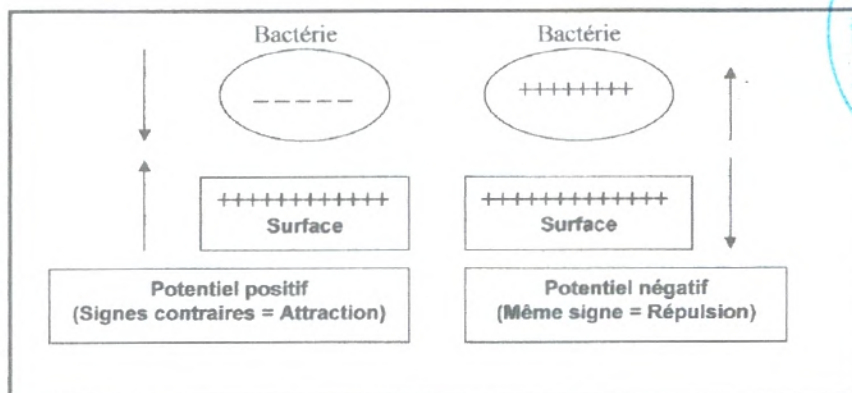


Figure 9 : Schéma du potentiel d'interaction entre un micro-organisme et une surface (Massicotte et al, 2009).

CHAPITRE II

II.3.3.2. La théorie du mouillage, basée sur la thermodynamique des surfaces (Morra & Cassinelli, 1997)

Cette approche considère l'adhésion bactérienne comme un état d'équilibre prenant en compte le point de contact et en négligeant les interactions électrostatiques. Si les énergies de surface des différents partenaires, molécules, échantillons et milieu suspendant sont connues, on peut déterminer la variation d'énergie libre d'adhésion. Lorsque les micro-organismes sont dans un liquide il y a essentiellement trois forces en présence : surface-bactérie, surface-liquide, bactérie-liquide. (Rubio, 2002) (Figure 10).

Cependant, il convient de noter que l'approche thermodynamique suppose principalement que le processus est totalement réversible, ce qui ne correspond pas au cas réel. L'approche thermodynamique contribue à l'explication d'une observation commune : bactéries avec une surface cellulaire hydrophobe préfèrent les surfaces hydrophobes du matériau; ceux avec une surface cellulaire hydrophile préfèrent les surfaces hydrophiles (Hori et Matsumoto, 2010).

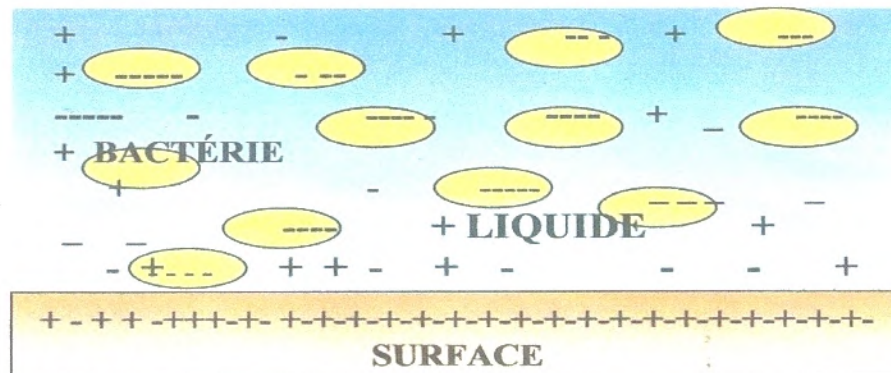


Figure 10 : Schéma des forces en présence dans un milieu humide (Massicotte et al, 2009).

II.3.3.3. La théorie DLVO étendue

La théorie DLVO propose une base théorique pour la compréhension de l'adhésion microbienne mais présente plusieurs limitations du fait qu'elle ne prend en considération que les interactions liées aux forces de Lifshitz van der Waals et les interactions électrostatiques. Cette théorie a été étendue par van Oss *et al.* (1986) afin de prendre en compte l'ensemble des interactions, notamment les interactions polaires et leur décroissance avec la distance de séparation (Boutaleb, 2007).

CHAPITRE II

Bien que l'application de la physico-chimie a contribue à l'explication de quelques observations, elle n'a pas été entièrement réussi en prévoyant les divers comportements d'attachement observés dans les systèmes bactériens. Mais, une traduction correcte de ces théories au champ de l'adhérence bactérienne, est très utile afin de former un cadre dans lequel des facteurs biologique peuvent être ajoutés (**Katsikogianni et Missirlis, 2004**).

II.4.Paramètres influençant l'adhésion des microorganismes au support :

Tandis que la prévision du potentiel d'adhérence sur la base des propriétés physico-chimiques fournit des informations utiles sur le comportement microbien réel possible, les résultats d'adhérence suggèrent que des mécanismes autres que les propriétés physico-chimiques extérieures puissent jouer un rôle déterminant sur les capacités bactériennes d'adhérence (**Simões` et al, 2007**).

Etant donné l'importance du processus d'adhésion dans la formation du biofilm, il est nécessaire de connaître les paramètres qui l'influencent, afin de pouvoir chercher les mesures préventives à leur formation.

II.4.1.Facteurs liés au support:

✚ Film conditionnant :

Des les premières secondes qui suivent l'immersion du support en milieu naturel, il s'ensuit d'une adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions qui couvrent toutes les surfaces exposées. L'adsorption spontanée est due à l'interaction charge et distance-dépendante, de force répulsives et attractives, sur des espèces moléculaires chargées venant à proximité. Celles-ci incluent des protéines, des sucres, des lipides, des substances humiques et des sels minéraux, dont l'adsorption confère de nouvelles propriétés physico-chimiques du la surface (**Salaün, 2009**). Ce film entraine une modification significative et peut donc influencer positivement ou négativement l'adhésion bactérienne (**Beloin et al, 2008**).

✚ Rugosité et microtopographies:

Une surface possède des imperfections (anfractuosités) dues au mode de préparation employé lors de l'usinage des matériaux. Intuitivement, les rainures semblent être un parfait environnement pour le développement bactérien puisque l'aire colonisable est augmentée et les sites d'adhésion plus nombreux. Les bactéries en se logeant dans ces imperfections peuvent alors être protégées des agressions extérieures (nettoyant-désinfectant, ultrasons) (**Rubio, 2002**).

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle

CHAPITRE II

car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée. Néanmoins, certaines bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques. (**De Chalvet de Rochemonteix, 2009**).

Il a été aussi suggéré qu'il y a une rugosité optimale pour l'adhérence bactérienne. Si les crevasses sur la surface sont de taille semblable à la cellule microbienne, l'adhérence est plus efficace que sur une surface plus rigoureuse ou plus douce. Les grandes crevasses offrent la protection contre les forces de cisaillement et donne une surface accru pour l'attachement en fournissant des points de contact en plus. D'autre part, il a été signalé qu'une adhérence bactérienne spécifique diminue la microtopographie (**Raulio, 2010**).

✚ Charge de surface :

La charge de surface des matériaux joue un rôle important lors de l'adhésion cellulaire. Cette propriété est contrôlée par la force ionique et le pH du milieu suspendant (**Saulou, 2009**).

✚ Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outrepasser les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes (**De Chalvet de Rochemonteix, 2009**). Les caractéristiques énergétiques de surface des échantillons dépendent de plusieurs facteurs : La composition chimique de la surface solide étudiée (chrome, fer, nickel, cuivre, verre), les différents types de matériaux présentant des caractéristiques physico-chimiques dissemblables, peut conduire à d'importantes différences d'adhésion bactérienne (**Rubio, 2002**).

✚ Hydrophobicité de surface :

L'hydrophobicité est considérée comme la force d'interaction de courte distance la plus importante dans l'attachement bactérienne, jouant un rôle déterminant dans l'adhérence bactérienne (**Simões et al, 2007**). Généralement les matériaux hydrophobes, peu chargés (téflon, polyéthylène, polystyrène, etc.) fixeraient plus facilement les bactéries que ceux de

CHAPITRE II

nature hydrophile, comme le verre. De façon générale, il est admis que les micro-organismes hydrophobes adhèrent fortement sur des matériaux hydrophobes alors que les micro-organismes hydrophiles adhèrent plus fortement sur des matériaux hydrophiles (**Massicotte et al, 2009**).

II.4.2.Facteurs liés au microorganisme

✚ Concentration et interactions microbiennes :

La présence de colonisateurs primaires sur une surface peut faciliter la survenue d'autres microorganismes. Ce phénomène est appelé « Co-agrégation » (**Beloin et al, 2008**). Les microorganismes peuvent adapter à des nouveaux environnements et surfaces, rendant les surfaces prêts à la colonisation (**Raulio, 2010**).

✚ Caractéristiques bactériennes :

Pour une surface donnée, les différentes espèces bactériennes adhèrent différemment puisque ces espèces ont différentes caractéristiques physico-chimiques (**Katsikogianni et Missirlis, 2004**).

✚ Composition biochimique et structure moléculaire de la surface microbienne :

La composition biochimique et l'architecture de la surface cellulaire : présence de protéines, de fimbriae, de flagelles, d'exopolymères, de peptidoglycane... ou de lipopolysaccharides chez les bactéries contribuent à l'adhésion des microorganismes aux supports :

➤ Les fimbriae de type I, ou pili:

Ce sont des appendices filamenteux, qui contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobe (**Qureshi, 2005**). Ces structures sont habituellement droites et ne sont pas impliquées dans la motilité. Leur fonction générale reconnue est de rendre les cellules plus adhésives, puisque les bactéries avec pili adhèrent fortement à d'autres cellules bactériennes et particules organiques. Néanmoins ils ne sont pas toujours impliqués dans le procédé d'attachement même si ils sont présents. Les pili sont importants à l'adhésion et la colonisation de surfaces, probablement en surmontant la barrière électrostatique initiale de répulsion qui existe entre la cellule et le substratum (**Simões et al, 2010**).

➤ Les Flagelles :

Les flagelles permettent à la bactérie de se mouvoir dans son environnement et donc de se déplacer vers des milieux où les conditions sont plus favorables. Ils peuvent permettre les interactions entre les bactéries et les surfaces (**Rubio, 2002**).



CHAPITRE II

➤ **Les curli :**

Filaments relativement courts, rigides et servant de moyen d'exploration chez *E. coli* et ils sont directement impliqués dans toutes les premières étapes de l'adhésion bactérienne **(Beloïn et al, 2008)**.

➤ **Protéines de surface :**

Quelques bactéries utilisent des protéines de surface ayant une affinité avec des composés ou des matériaux spécifiques qui facilitent l'adsorption tels que des fibronectines **(Salaün, 2009)**.

➤ **Les polymères EPS :**

L'adsorption irréversible est liée à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS) majoritairement constituées de polysaccharides, mais aussi de protéines, lipides, acides nucléiques et substances humiques. L'attachement d'un certain nombre de bactéries à la surface induit une cascade de changements physiologiques qui mène à l'excrétion d'exopolymères **(Leroy, 2006)**. L'adaptabilité et la capacité des microorganismes à produire des EPS est également un facteur qui favorise leur adhésion aux supports, surtout durant les phases post-adhésion initiale gérées essentiellement par les interactions spécifiques (biologiques) **(Boutaleb, 2007)**.

➤ **Les lipopolysaccharides (LPS) :**

Le LPS est constitué de trois parties le lipide A inséré dans la bi-couche phospholipidique membranaire, un noyau polysaccharidique et une région extérieure d'antigène O. ils sont importants pour l'adhésion initiale aux surfaces. Différents études ont montrés que des souches incapables de produire des LPS démontrent une adhérence réduite sur les surfaces hydrophiles **(Hori et Matsumoto, 2010)**.

✚ **Caractéristiques physico-chimiques de la surface cellulaire :**

La charge de la surface cellulaire et l'hydrophobicité jouent un rôle prépondérant lors de l'étape d'adhésion :

Dans les suspensions aqueuses la plupart des particules acquièrent une charge électrique à leurs surfaces due à l'ionisation de leurs groupes extérieurs. Les bactéries sont presque toujours négativement chargées dans les suspensions aqueuses. La charge de la surface bactérienne varie selon l'espèce et elle est influencée par le milieu de croissance, le pH et la concentration ionique de l'amortisseur de suspension, l'âge et la structure extérieure bactérienne **(Katsikogianni et Missirlis, 2004)**.

L'ensemble des interactions polaires (interaction hydrophobes) est la composante majoritaire de l'ELS. En effet, les interactions hydrophobes peuvent être jusqu'à 100 fois

CHAPITRE II

supérieures aux interactions de Van der Waals et aux interactions électrostatiques. Il est donc possible d'établir une corrélation entre l'ELS et l'hydrophobicité. Lorsque l'ELS diminue, l'hydrophobicité augmente, et inversement (**Bertnard, 2004**). Une cellule hydrophobe pourra surmonter la répulsion électrostatique initiale avec la surface solide et adhérer plus facilement (**Qureshi et al, 2005**). L'hydrophobicité des bactéries varie en fonction des espèces considérées, elle est attribuée à différents composés (**Figure 11**):

- Des protéines présentant des régions hydrophobes
- L'acide lipotéichoïque (LTA) est impliqué dans les interactions hydrophobes des bactéries à Gram + : le LTA libéré dans la paroi, à partir de son site initial à la surface de la membrane cytoplasmique, peut adopter une conformation dans laquelle les interactions ioniques entre sa chaîne polyglycérophosphate et des composants de la paroi orientent la portion lipidique du LTA vers la surface externe, conférant des propriétés hydrophobes à la bactérie.
- La présence de quantités importantes de lipides à la surface des cellules d'actinomycetaceae, rendant cette surface hydrophobe (**Khalilzadeh, 2009**).

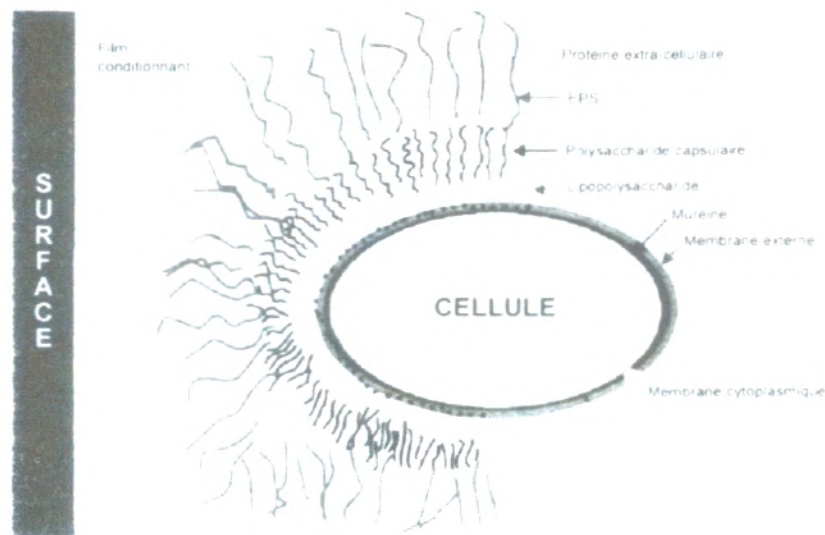


Figure 11 : Structures cellulaires conditionnant les premières étapes de l'adhésion (**Flemming et Wingender, 2001**)

▪ Technique d'évaluation :

Plusieurs techniques ont été employées pour déterminer le degré de l'hydrophobicité des cellules bactériennes : chromatographie d'interaction hydrophobe, la mesure de l'angle de contact, division des cellules dans un système de deux phases (eau-hexadécane et polyéthylène glycol – dextran) et la technique BATH (bacterial adherence to hydrocarbons)

CHAPITRE II

proposée par Rosenberg (1984) qui est maintenant plus généralement connue sous le nom MATH (microbial adherence to hydrocarbons) qui est la plus utilisée (**Oliveira et al, 2001**).

En 1996, **Bellon-Fontaine et al** ont développé une nouvelle méthode M.A.T.S (Microbial Adhesion To Solvents) basé sur la comparaison d'affinité microbienne à un solvant monopolaire et un solvant apolaire. Le solvant monopolaire peut être acide (accepteur d'électron) ou basique (donneur d'électron) (**Hamadi et al, 2004**).

MATS consiste à mettre en contact une suspension bactérienne de densité optique (DO) connue avec un solvant. Après une brusque agitation, des micro-gouttelettes de solvants se forment sur lesquelles les bactéries adhèrent, ou non, selon l'hydrophobicité. Il suffit de mesurer la DO de la phase aqueuse et de déterminer le pourcentage d'adhésion au solvant, à l'aide de ce rapport :

$$\frac{DO_{(phase\ aqueuse\ de\ départ)} - DO_{(phase\ aqueuse\ après\ mélange)}}{DO_{(phase\ aqueuse\ de\ départ)}} \times 100.$$

D'après (**Tauveron et al, 2006**), il est permis de dire qu'une bactérie est hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 40%, hydrophobe quand le pourcentage est compris entre 40% et 60% et hautement hydrophobe quand ce pourcentage est supérieur à 60%.

✚ Phase de croissance et état physiologique :

Les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire dépendent de la composition de la paroi cellulaire et de leur métabolisme, l'âge de la culture joue également un rôle important puisque différentes études ont montré que l'attachement de nombreuses espèces bactériennes est meilleur en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle (**Boutaleb, 2007**).

✚ Adaptation phénotypique des microorganismes adhérents :

Des études montrent que des gènes seraient activés à la suite du contact entre une bactérie et la surface montrant un état différent entre une bactérie en suspension et une bactérie adhérente. Les bactéries expriment un certain nombre de gènes impliqués dans le phénomène appelé «quorum sensing » (QS). Ils permettent une communication concertée de toute une population bactérienne. Comme il permet aux cellules de s'adapter aux différents facteurs environnementaux (**Leroy, 2006**).

II.4.3.Facteurs liés à l'environnement :

Certains facteurs dans l'environnement peuvent influencer l'adhésion bactérienne aux surfaces solides : premièrement l'augmentation du temps de contact entre le microorganisme

CHAPITRE II

et le support induit un renforcement des liaisons établies. Ainsi les conditions hydrodynamiques. De nombreuses caractéristiques du milieu influencent les interactions entre les cellules et la surface solide, par exemple sa nature, sa viscosité ou sa température, mais également la force ionique, la nature des sels et le pH, ou encore la présence de détergents ou d'éléments nutritifs. (Saulou, 2009).

II.5. Lute contre le biofilm: contrôle d'adhésion microbienne

L'inhibition de l'adhésion et/ou la formation de biofilm est tout à fait difficile contre tous les micro-organismes même si il est possible contre des espèces spécifiques. Néanmoins, des méthodes efficaces pour le contrôle de la formation de biofilm ou l'adhésion microbienne ont été développées récemment (Hori et Matsumoto, 2010).

En nettoyant les installations laitières ou Les surfaces des équipements de transformation des produits alimentaires, il est important que toutes les traces de souillures soient enlevées. Les surfaces doivent également être microbiologiquement propres : les microorganismes doivent être enlevés ou tués. En effet Le contrôle des microorganismes est essentiel dans ce type d'industrie. Il est partiellement assuré par des techniques qui éliminent les microorganismes ou préviennent leur développement. Cela suppose que le procédé soit réalisé dans de bonnes conditions d'hygiène, les microorganismes contaminants seront éliminés par un nettoyage et une désinfection efficaces pour assurer la qualité et la sûreté bactériologique des produits. Ainsi, dans de nombreuses industries agroalimentaires, les lignes de production subissent une procédure de nettoyage en place (NEP) quotidienne (Lécrivain-Nolf et al, 2000 ; Guillemot, 2006 ; Sundberg et al, 2011).

Un système indépendant de contrôle de qualité pour surveiller les résultats de nettoyage peut être intégré dans le système HACCP. L'évaluation de l'hygiène de biofilm devrait faire partie du programme de développement de l' HACCP afin de contrôler ces biofilms. D'ailleurs la prévention de la formation de biofilm peut être réalisée par une meilleure connaissance des mécanismes qui contribue à leur formation, développement et entretien (Simões et al, 2010).

II.5.1. Nettoyage et désinfection :

Les agents chimiques notamment les agents tensio-actifs et les composés d'alcali utilisés comme détergents suspendent et dissolvent les résidus de contamination en diminuant la tension superficielle et dénaturer les protéines. Ces agents chimiques sont actuellement employés en association. Un procédé de nettoyage efficace doit détruire ou dissoudre la matrice extracellulaire liée au biofilm de sorte que les désinfectants puissent accéder aux

CHAPITRE II

cellules viables. Le processus de nettoyage peut enlever 90 % ou plus de micro-organismes liés à la surface, mais ne peut pas être compté pour les tuer. Les bactéries peuvent être retrouvées à d'autres endroits et avec le temps, l'eau et les aliments peuvent former un biofilm. **(Ferreira et al, 2010).**

Par conséquent, la désinfection doit être mise en place

La désinfection consiste à améliorer le pourcentage d'élimination des microorganismes dans l'environnement. Cette étape se caractérise non pas uniquement par l'enlèvement des organismes sur une surface mais par une atteinte à l'intégrité des cellules pouvant entraîner la mort de ces dernières. Selon le type d'organismes présents dans l'environnement, on dispose d'un arsenal de produits désinfectants en fonction des besoins et aux meilleurs coûts **(Massicotte et al, 2009).**

Le procédé d'hygiène comportant le nettoyage et la désinfection est défini en tant qu'un système de nettoyage en place (CIP) dans l'IAA.

Le procédé standard inclut les étapes suivantes:

- (1) Rinçage avec de l'eau froide pendant 5 à 20 minutes ;
- (2) Nettoyage avec une solution alcaline, exemple : NaOH (la concentration appropriée est habituellement comprise entre 1-1,5% à une température de 75-80°C pendant 6-45min ;
- (3) rinçage avec de l'eau tiède ;
- (4) Nettoyage avec une solution acide (la concentration appropriée est habituellement comprise entre 0,5- 2%) pendant 5-45 min à une température comprise entre 60°C et 90°C ;
- (5) Rinçage avec de l'eau froide pendant 5 à 20 minutes **(Vlkova et al, 2008).**

Différentes méthodes ont été utilisées pour prévenir la formation de biofilm tels que la modification de surface, electro-assisted methods qui utilise l'interaction électro-répulsive entre les bactéries et les surfaces cathodiques avec une charge négative de surface. L'utilisation des agents antimicrobiens avant que le développement des biofilms pourrait également être une stratégie efficace, empêchant l'adhérence des micro-organismes **(Hori et Matsumoto, 2010).**

L'apparition des bactéries résistantes aux agents antimicrobiens conventionnels prouve clairement que de nouvelles stratégies de contrôle sont exigées :

II.5.2. Les stratégies vertes de contrôle de biofilm

➤ Utilisation de détergents basés sur des enzymes

L'utilisation d'enzymes commerciales est une stratégie alternative à l'utilisation de composés chimiques présentant une toxicité. Les enzymes sont des protéines naturelles. Elles permettent de catalyser des réactions de transformation qui se produisent dans les organismes

CHAPITRE II

vivants. Elles sont spécifiques d'un substrat. Elles permettraient d'intervenir directement sur les molécules organiques impliquées dans l'adhésion des microorganismes sur les surfaces **(Leroy, 2006)**.

➤ **Utilisation des phages :**

Les bactériophages peuvent fournir une approche faisable, fortement spécifique, non-toxique, pour contrôler plusieurs micro-organismes impliqués dans la formation de biofilm. Cette technologie n'a pas encore développé avec succès et peu d'informations sont disponibles sur l'action des bactériophages sur des biofilms.

➤ **contrôle par les interactions microbiennes/ molécules de métabolite**

L'existence de multiples interaction entre espèces ou la simple production de métabolite peut interférer la formation et développement de biofilm **(Simões et al, 2010)**.

➤ **Micro et nanotechnologie**

Nanoscience et son application sont des champs d'études très récents. Nanotechnologie est l'utilisation de matériels, dispositifs de structure et des systèmes à l'échelle atomique, moléculaire et macromoléculaire. Nanomatériaux et les nanostructures ont des dimensions entre 1 et 100 nm et peuvent fréquemment montrer des changements physiques, chimiques, et biologiques significatives des propriétés et de fonction en résultant de leurs petites structures. La capacité des nanoparticules de pénétrer le biofilm et les cellules en affectent leurs fonctions biochimiques leur rendent des outils potentiels dans le contrôle de biofilm **(Ferreira et al, 2010)**.

Partie II :
Etude Expérimentale



Matériel et Méthodes



Matériel et Méthodes

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de l'effet d'un traitement alcalin sur l'hydrophobicité des spores de *B. cereus* en utilisant la méthode MATH, qui mesure l'hydrophobicité des souches avant et après traitement.

Le procédé expérimental est le suivant :

I.1. Les cultures bactériennes :

I.1.1. Origine de souches :

L'étude a été réalisée sur 12 souches appartenant au groupe *Bacillus cereus* isolées lors de travaux antérieurs. Ces souches ont été isolées à partir des équipements laitiers dans une entreprise de production laitière. Les prélèvements ont été effectués aux niveaux des canalisations (circuits fermés) avant et après l'application du système CIP au niveau de 2 sites différents :

- ✓ Segments linéaires.
- ✓ Segments non linéaires (coudés).

Ces souches sont conservées sur gélose nutritive inclinée.

I.1.2. Revivification des souches :

Les souches conservées dans des tubes Eppendorf, contenant du bouillon Luria + 30% du glycérol, sont revivifiées dans des tubes à essais contenant 7 ml du bouillon nutritif, et incubées pendant 24h, puis repiquées dans des tubes à essais contenant du bouillon nutritif, à raison de 1ml pour 10 ml de bouillon, afin de permettre l'enrichissement des cultures.

I.1.3. Confirmation des tests d'identification

Aspect microscopique : Coloration de Gram

Après revivification des souches une coloration de Gram est effectuée pour s'assurer à la pureté des souches :

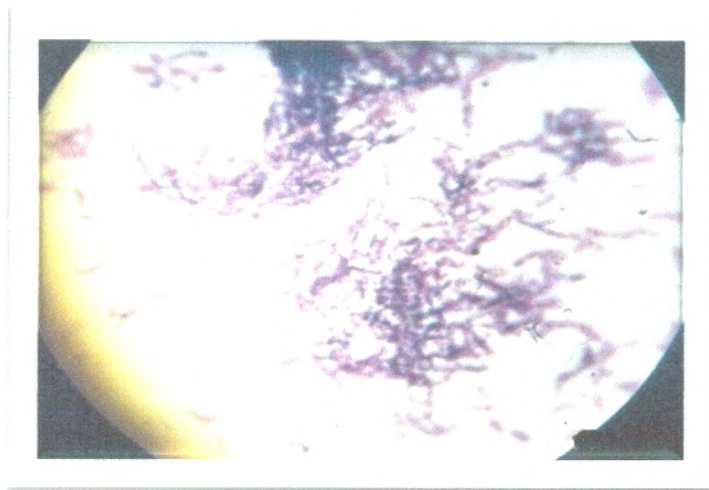


Figure 12 : Observation microscopique de *Bacillus cereus* après coloration de Gram (G× 100).

I.1.4. Préparation de la suspension sporale :

La suspension sporale est préparée selon la technique de (Simmonds et al, 2003) :

Après l'enrichissement de souches un ensemencement par écouvillonnage est effectué sur gélose nutritive. Les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 30°C et un tapis se forme à la surface. Ces cultures sont utilisées pour un taux de sporulation supérieure à 90% de spores, vérifié par examen microscopique après coloration au cristal violet.

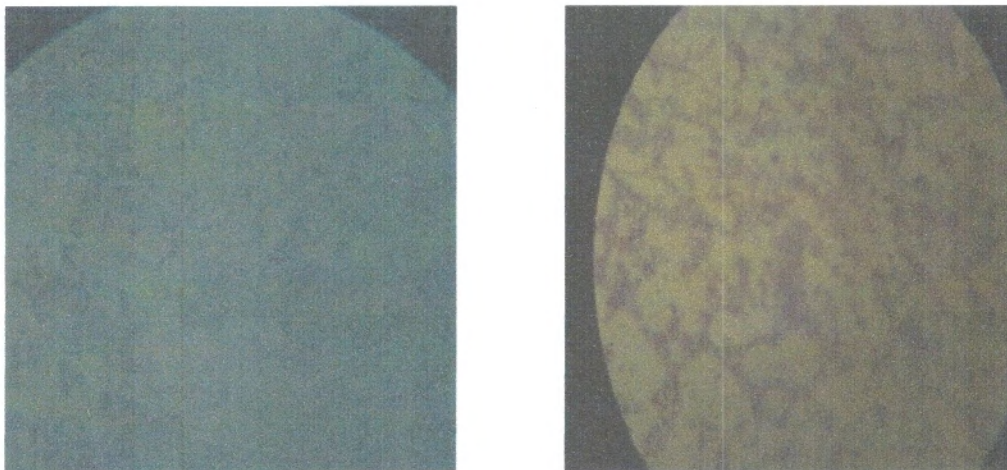


Figure 13 : Observation microscopique de *Bacillus cereus* en phase de sporulation (G× 100).

Les spores sont récupérées selon le protocole suivant :

Matériel et Méthodes

- Le tapis microbien formé sur les boîtes d'agar est recouvert par l'EDS, ensuite il est raclé à l'aide d'une pipette Pasteur sous forme de râteau
- Le mélange obtenu est recueilli dans un Bécher stérile, puis versé dans des tubes à hémolyses, pour subir 3 centrifugations à 2000g pendant 20 min où le surnageant est jeté a chaque fois et remplacé par l'EDS au même volume.

1.1.5. Traitement thermique de la suspension sporale :

Les suspensions sporales obtenues subissent un traitement thermique à 80 °C pendant 10 min afin d'éliminer les formes végétatives. Par la suite on réalise une série de dilutions afin d'avoir des suspensions sporales avec des densités optiques à 590 nm comprises entre $1 \geq DO \geq 0.6$. Les suspensions sporales ainsi préparées sont conservées à 4°C.

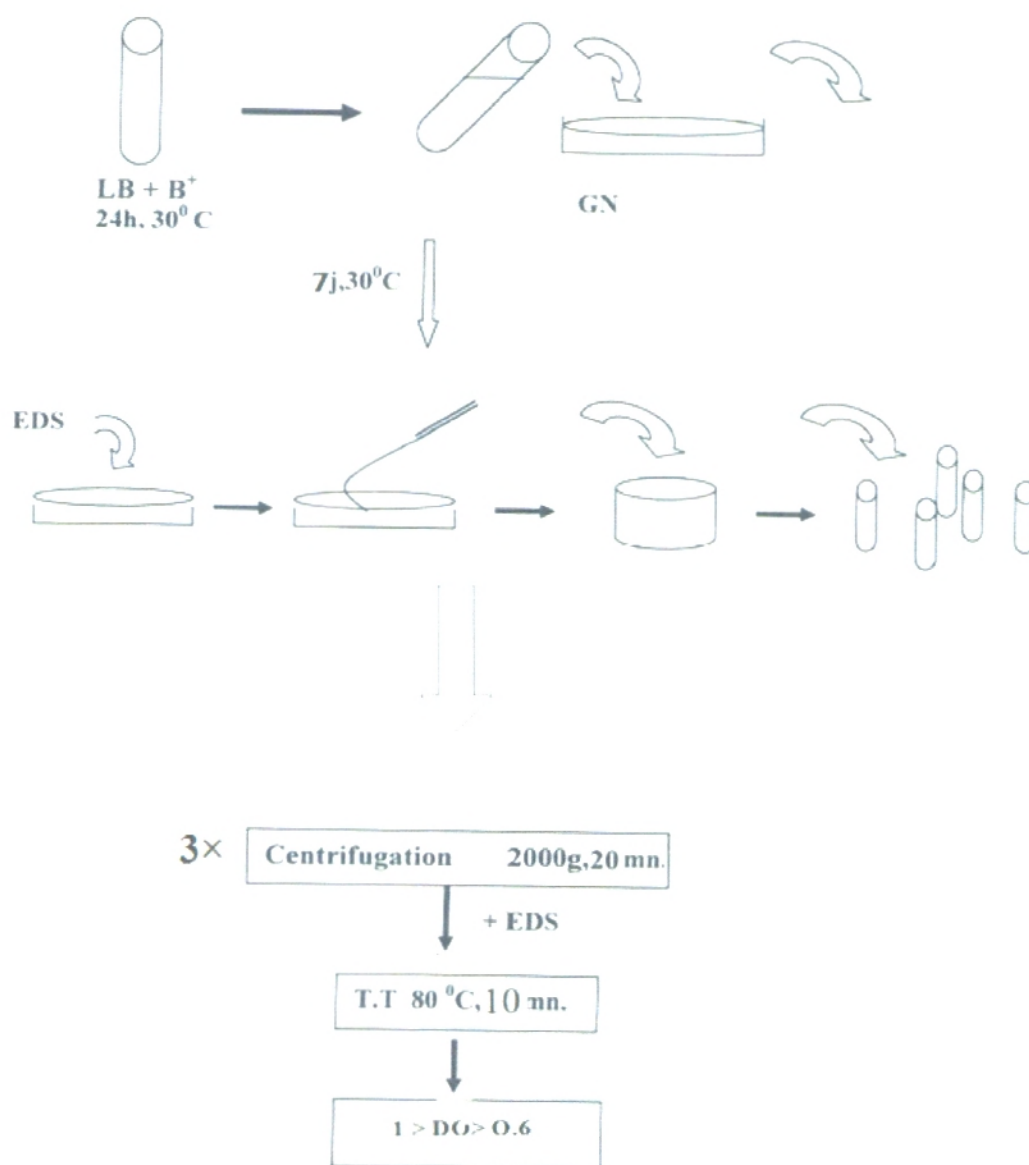


Figure 14 : les étapes de préparation de suspension sporale.

Matériel et Méthodes

I.2. L'adhésion à l'hexadécane: méthode MATH

La méthode décrite par (Faille et al, 2010) est choisie pour étudier les propriétés physicochimiques et évaluer l'hydrophobicité des spores de *Bacillus cereus*. Elle est basée sur l'affinité des spores à l'hexadécane : un solvant apolaire.

I.2.1. Protocole expérimental :

La technique de (Faille et al 2010) a été utilisée avec quelques modifications :

- 2 ml de suspension sporale dont la densité optique à 590 nm est ajustée dans un intervalle allant de [0.6 à 1] (D_i), sont prélevés et mis dans un tube à hémolyse en verre, et aux quels 400 microlitre de solvant sont ajoutés.
- L'ensemble est vortexée pendant 10 secondes de façon à obtenir une émulsion.
- Une décantation de 15 min pour l'obtention de deux phases séparées est réalisée
- Une mesure de la densité optique de la phase aqueuse à 590 nm est effectuée par un colorimètre.
- Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors donné par la relation suivante :

$$A(\%) = (D_i - D_f) / D_i \times 100$$

D_i : représente la densité optique initiale,

D_f : représente la densité optique de la phase aqueuse après décantation finale,

Pour l'hexadécane, lorsque A est supérieure à 60%, la spore est dite hautement hydrophobe. Si A est inférieur à 40%, la spore est dite hydrophile. Si A est compris entre ces deux valeurs, la spore est dite hydrophobe.

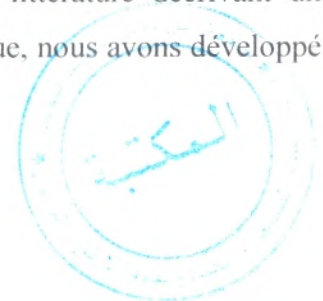
II. Effet d'un traitement alcalin sur le pouvoir d'adhésion des spores :

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'effet du traitement alcalin sur l'hydrophobicité des spores. L'agent choisis est NaOH qui est couramment utilisé dans l'industrie laitière pendant la première étape du CIP. La solution d' NaOH est utilisée à une concentration de 2.‰

Le traitement consiste à exposer la suspension sporale à une solution alcaline d'NaOH à deux températures : (80°C) à différents temps de contact et une comparaison est également réalisée à 70°C pendant 15 minutes.

II.1. Mise au point du protocole expérimental

Étant donné que nous n'avons pas de technique dans la littérature décrivant un protocole de mesure de l'hydrophobicité après un traitement chimique, nous avons développé le protocole expérimental suivant :



Matériel et Méthodes

1ml de la suspension sporale déjà préparée dont la densité optique à 590 nm est supérieures ou à égale 2 est prélevé et mis dans des tubes à essai au quel on ajout 1 ml d'NaOH (2%) (pH 12.75) à chacun de ces tubes, le mélange obtenu est placé dans un bain marie réglé la température (80°C) et chauffé pendant différents temps de contact. Les tubes sont prélevés à des intervalles allant de 5 jusqu'à 30 minutes. Après chaque traitements les spores ont été refroidis rapidement et chaque tube a été transvasé dans un tube contenant 5 ml d'agent neutralisant : (tampon phosphate sodique potassique de Sorensen pH =5.4). Un lavage de culot à 2000 g pendant 15 min à l'eau distillé est réalisé avant la mesure de l'hydrophobicité qui se fait par la technique MATH selon le protocole décrit précédemment.

Résultats et discussions

Résultats et discussions :

I. Evaluation de l'hydrophobicité des spores de *B. cereus* :

I.1. détermination de l'hydrophobicité initiale des spores :

Le caractère hydrophobe/hydrophile, des bactéries peut être déterminé à l'aide de la méthode MATH qui repose sur l'affinité des micro-organismes à un hydrocarbure : <l'hexadécane>. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'adhésion au solvant selon la formule suivante : $A (\%) = (D_i - D_f) / D_i \times 100$.

D'après les résultats du test d'adhésion (**Figure 15**) on remarque une variabilité chez les spores des 12 souches de *Bacillus cereus* dans l'adhésion au solvant apolaire : l'hexadécane. Ce taux d'adhésion varie de 20.67 % jusqu'à 66.36%, 8 souches (S1, S2, S3, S5, S7, S9, S10, S12) montrent une affinité inférieure à 40 %. Ces spores sont hydrophiles selon **Tauveron et al, (2006)**, les souches (S4, S6, S11) sont hydrophobes avec des valeurs de l'ordre de 43.88%,46.73% et 56.89%.La S8 est hautement hydrophobe (66.36%).

Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par **Faille et al, (2010)** qui ont trouvé une variabilité dans le taux d'adhésion de différentes souches de *Bacillus cereus* à l'hexadécane. Dans une autre étude, (**Simmonds et al, 2003**), le taux d'adhésion trouvé, chez des spores de *Bacillus* isolés à partir d'équipements laitiers, varie de 14.1 à 86.5%. D'après ces résultats, 5 souches ont été considérées comme hydrophobes, 3 souches avaient une hydrophobicité moyenne et une souche s'est révélée hydrophile.

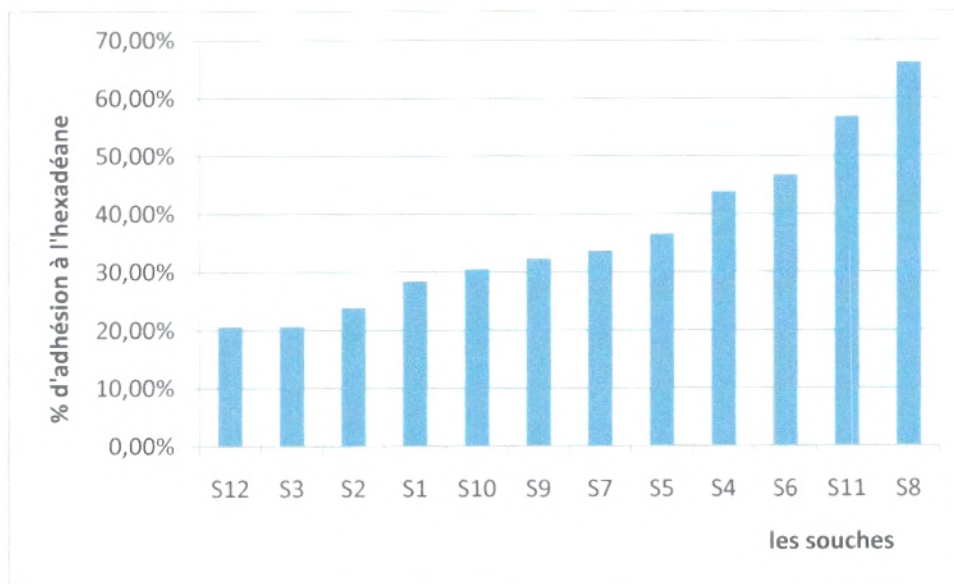


Figure 15 : Adhésion des 12 souches du groupe *B. cereus* à l'hexadécane.

Résultats et Discussions

II. Evaluation de l'effet d'un traitement alcalin sur le pouvoir d'adhésion des spores :

Dans l'industrie laitière les systèmes de CIP comportent généralement l'utilisation séquentielle des étapes de lavage avec des solutions caustiques (hydroxyde de sodium) et acides (l'acide nitrique), ces produits chimiques sont choisis pour leur capacité d'enlever les composés organiques (les protéines et les graisses) et inorganique (calcium-phosphate et d'autres minéraux) (Bremer et al , 2006).

Les spores de *B. cereus* sont souvent considérées comme une source de problème dans l'industrie alimentaire à cause de leur grande résistance à la chaleur et aux agents chimiques.

Les propriétés de survie de ces spores ont été étudiées dans des conditions simulant ceux trouvées dans l'industrie laitière : NaOH à des températures élevées (70°C et 80°C).

II.1.Effet du traitement alcalin à 70°C :

Les résultats du traitement alcalin (NaOH 2%) à 70 sur des spores de 8 souches de *B. cereus* pendant 15 min sont présentés dans la **Figure 16** : HI : hydrophobicité initiale,

HAT : hydrophobicité après traitement

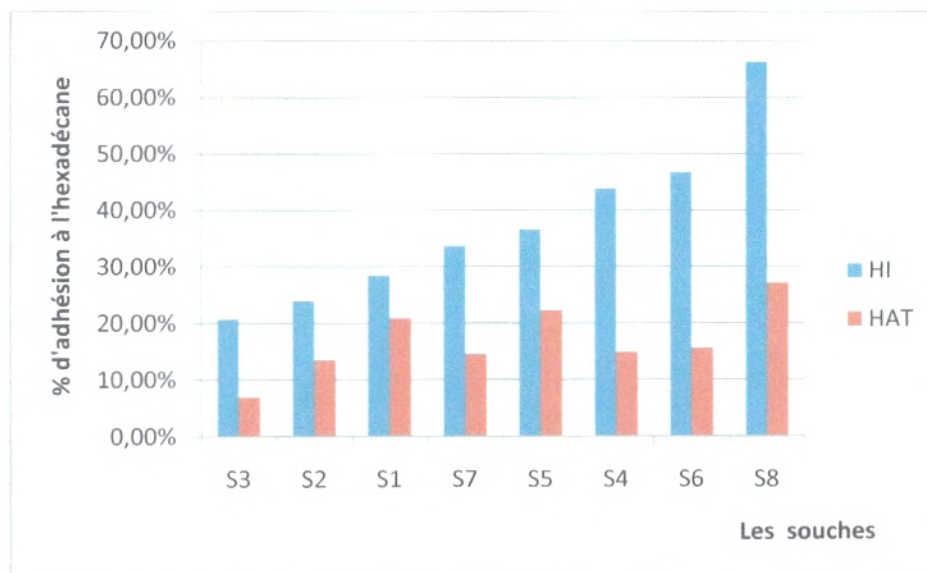


Figure 16 : Adhésion de 8 souches de *B. cereus* à l'hexadécane avant et après traitement alcalin à 70°C.

D'après la **Figure 16**, on remarque que quelque soit l'hydrophobicité initiale des souches testées, le traitement avec NaOH à 70°C/15 min provoque une diminution de l'hydrophobicité à des valeurs inférieures ou égales à 20% : les souches hydrophobes

Résultats et Discussions

deviennent hydrophiles et les souches hydrophiles devient plus hydrophiles. Bien que l'hydrophobicité joue un rôle important dans le phénomène d'adhérence, des données limitées ont été publiés concernant l'effet de NaOH sur cette dernière : D'après l'étude de (Giotis et al, 2009) l'exposition de *Listeria monocytogenes* à un stress alcalin sévère pendant des temps court mène à des réductions significatives de l'hydrophobicité de surface de cette bactérie. Par contre beaucoup de travaux ont été réalisés sur l'effet de NaOH sur la viabilité des spores et l'élimination des biofilms. Parker et al (2004), ont montré que le traitement avec NaOH (2%) pendant 30 minutes était le plus efficace de tous les traitements caustique pour enlever et détruire des biofilms. (Bremer et al, 2006) ont trouvé une réduction de 2 log du nombre des bactéries après un traitement caustique (NaOH, 1%).

II. 2.Effet du traitement alcalin sur l'hydrophobicité des spores de *B. cereus* à 80°C

D'après les résultats obtenus après le traitement chimique par NaOH, on observe des fluctuations pour toutes les souches :

✓ La souche S1 :

Chez cette souche, le taux d'adhésion diminue après les 5 premières minutes pour augmenter légèrement après les 5 minutes suivantes et revient à la valeur initiale. Après 15 minutes le taux d'adhésion va continuer à diminuer pour atteindre 13% après 30 minutes de traitement, ce qui correspond à la moitié de la valeur de l'hydrophobicité initiale (HI).

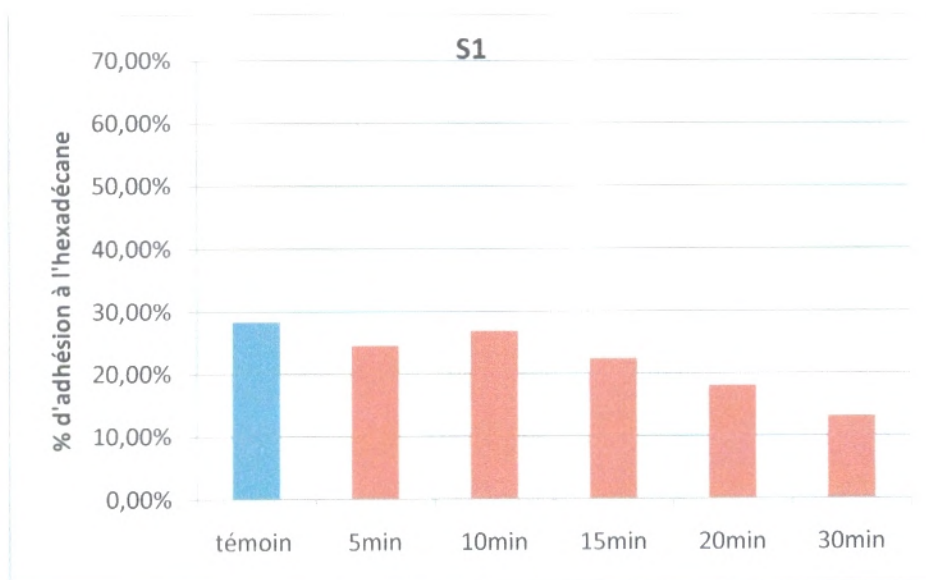


Figure 17 : Adhésion de la souche S1 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.

Résultats et Discussions

✓ La souche S2 :

Celle-ci présente une diminution dans le pourcentage d'adhésion au cours du traitement. Cette diminution est légère dans les premières 5 min mais elle devient plus importante dans les minutes qui suivent.

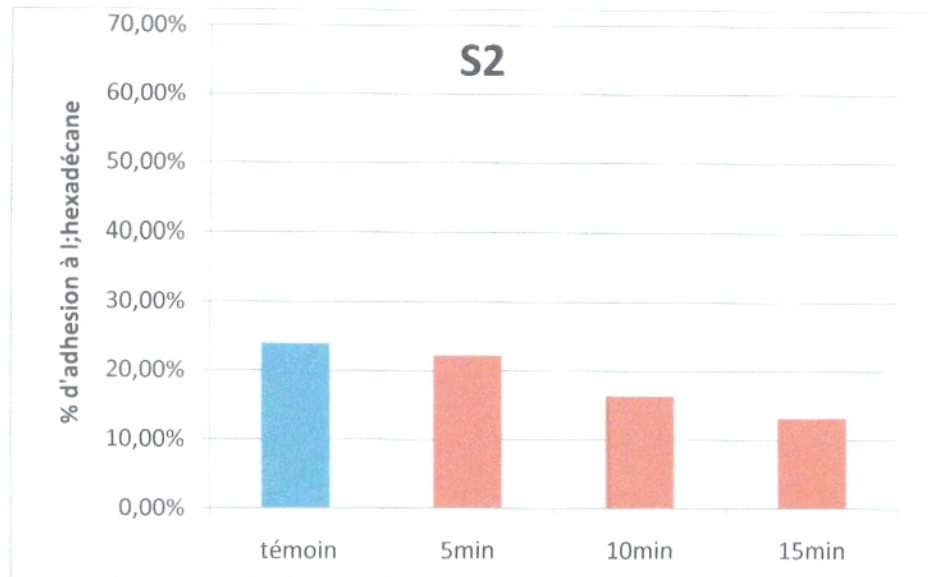


Figure 18 : Adhésion de la souche S2 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin

✓ La souche S3 :

D'après la Figure 19, on remarque une grande diminution dans l'hydrophobicité à des valeurs trop basses de l'ordre de 1.66%. Cette diminution est en corrélation avec le temps.

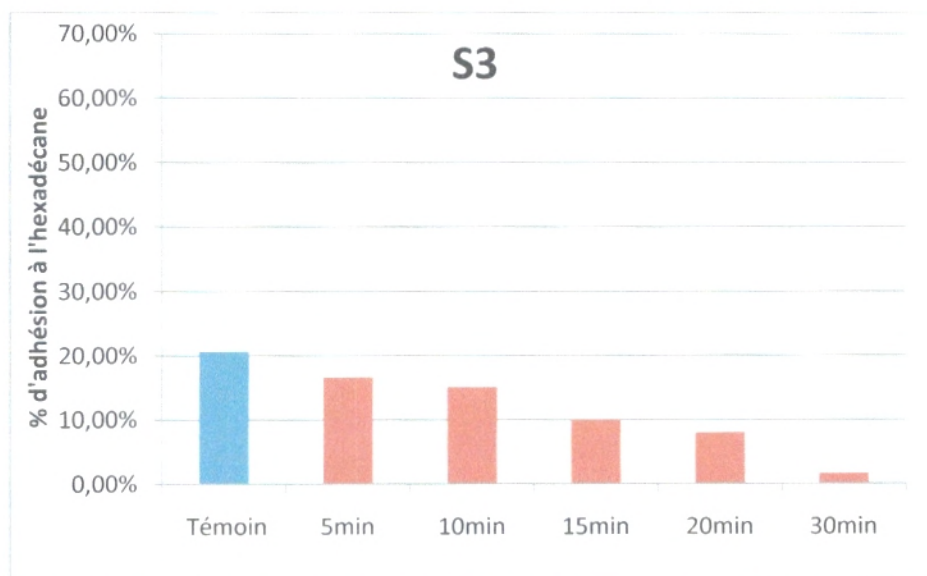


Figure 19 : L'adhésion de la souche S3 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.



Résultats et Discussions

✓ La souche S6 :

Cette souche hydrophobe devient complètement hydrophile après le traitement alcalin avec un changement dans le taux d'hydrophobicité à des valeurs inférieures à 8% à la fin du traitement.

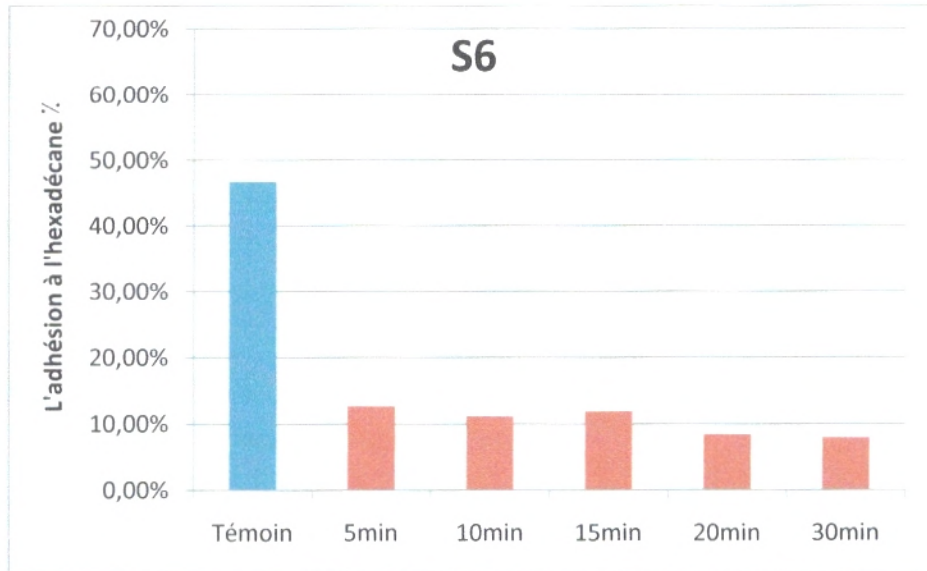


Figure 22 : Adhésion de la souche S6 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin

✓ La souche S7 :

D'après la figure 23 le taux d'adhésion diminue au cours des 15 premières minutes et atteint 17.24 % puis il augmente légèrement dans les 5 minutes qui suivent et puis atteint 12.69% après 30min de traitement.

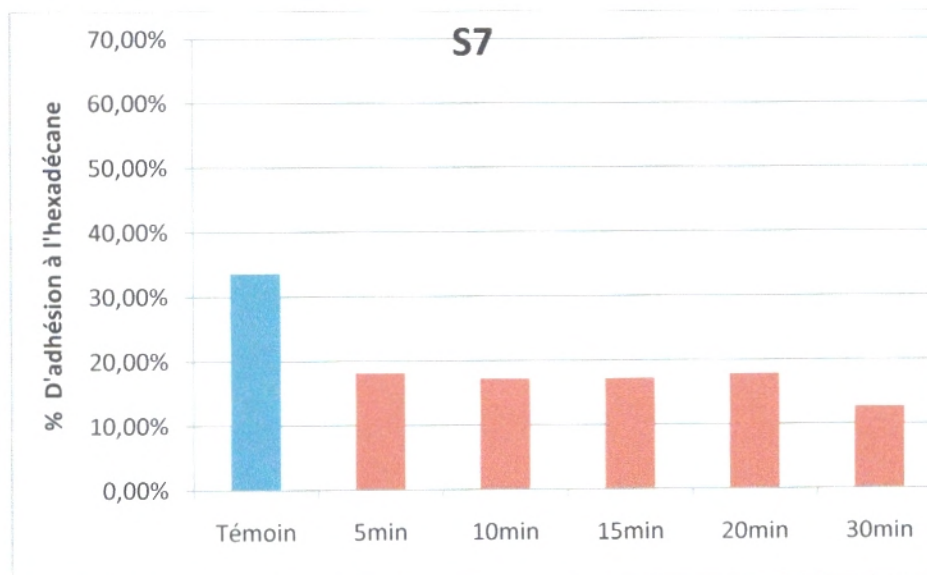


Figure 23 : Adhésion de la souche S7 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin



Résultats et Discussions

✓ La souche S8 :

qui est une souche hautement hydrophobe, devient hydrophile au cours du traitement, l'hydrophobicité initiale diminue jusqu'à 19.62% après 20 min.

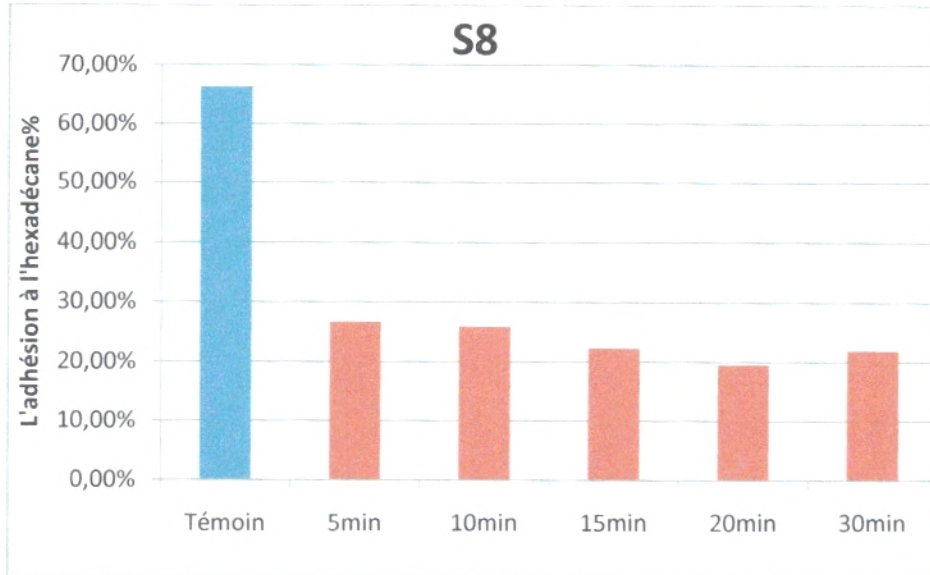


Figure 24 : Adhésion de la souche S8 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin

✓ La souche S9 :

Pour la souche S9 l'hydrophobicité initiale diminue jusqu'à une valeur de 6.85% après 15 min de traitement. Cette réduction est en corrélation avec le temps.

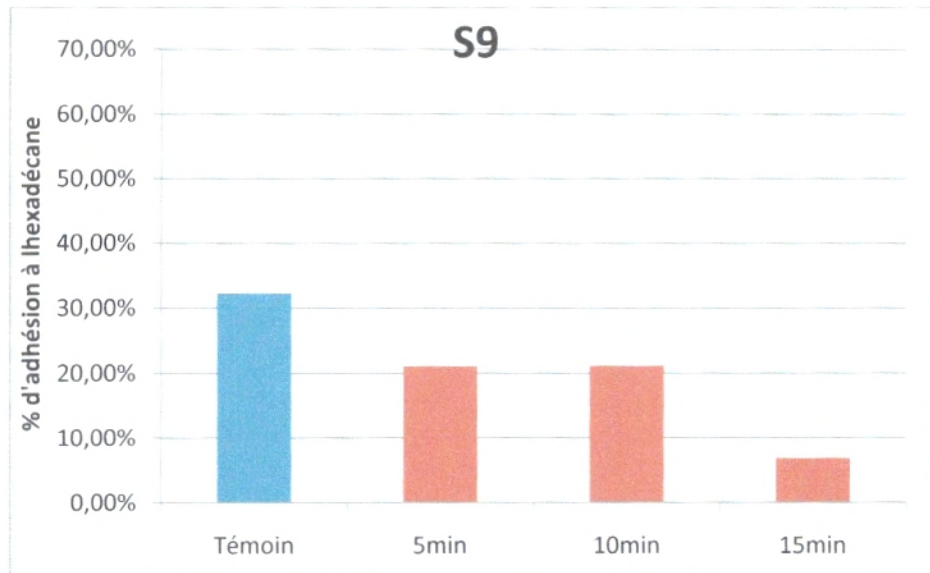


Figure 25 : Adhésion de la souche S9 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.

Résultats et Discussions

✓ La souche S10 :

Le taux d'adhésion diminue après les 5 premières minutes et se maintient stable dans les 15 min suivantes et atteint 16.66 % puis diminuer pour atteindre 4.30% après 30 min du traitement.

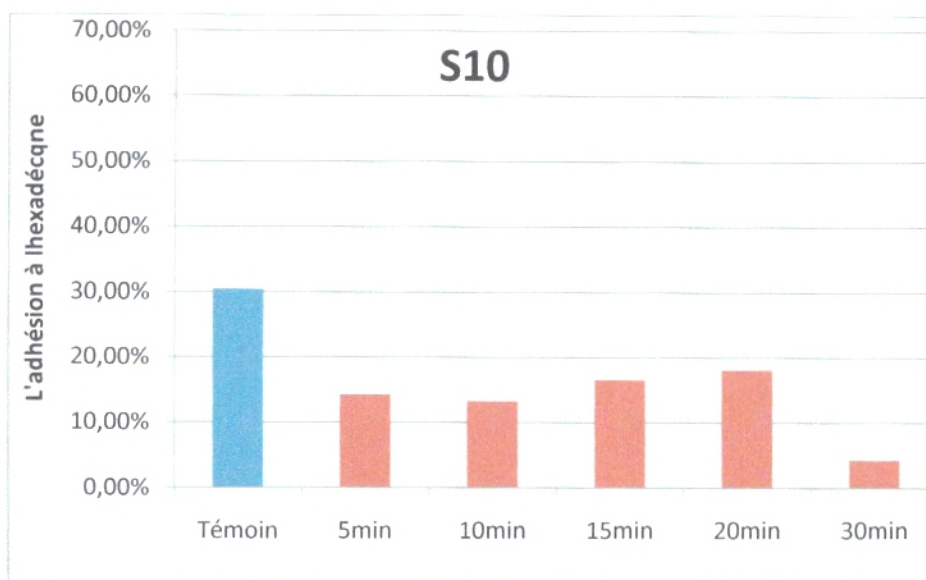


Figure 26 : Adhésion de la souche S10 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.

✓ La souche S11 :

Le taux d'adhésion de cette souche diminue au cours du traitement. Cette diminution est importante des les 5 premières min pour attendre une valeur de 17.59% après 30 min.

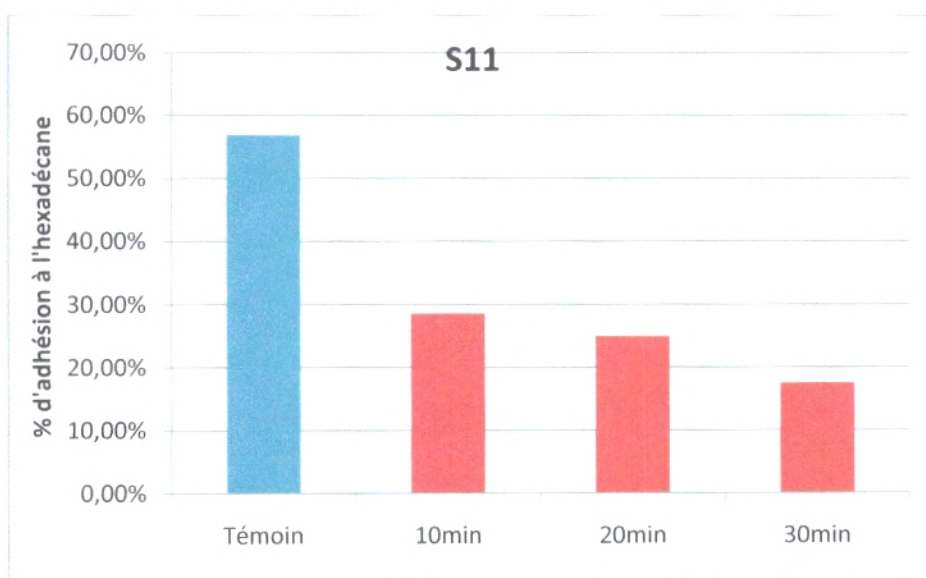


Figure 27 : Adhésion de la souche S11 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.

Résultats et Discussions

✓ La souche S12 :

Pour la souche S12 l'hydrophobicité initiale augmente légèrement dans les 5 premières minutes (22.35%) pour diminuer dans les 5 minutes qui suivent et revient à la valeur initiale après 15 min, cette hydrophobicité diminue beaucoup et atteint 1.66% après 30 minutes du traitement.

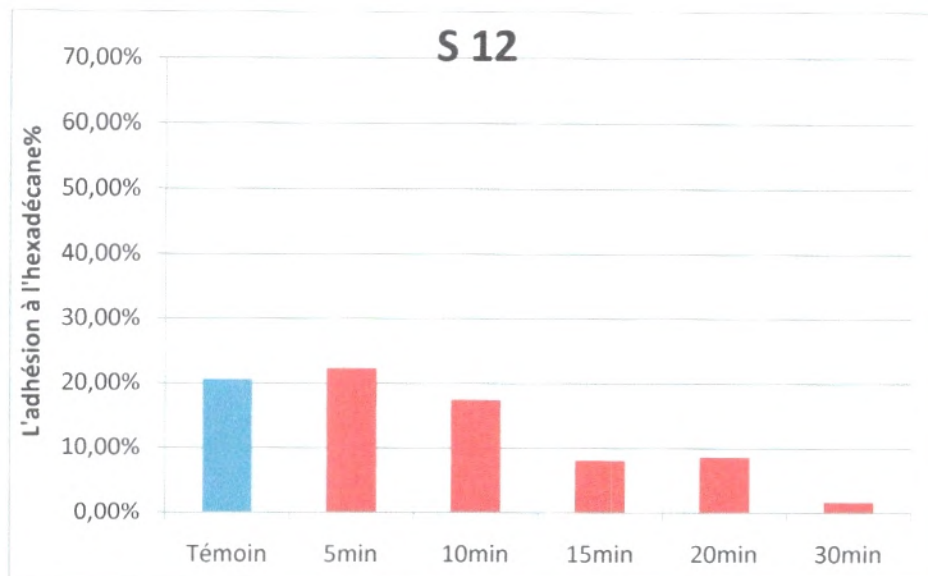


Figure 28 : L'adhésion de la souche S12 à l'hexadécane avant et après traitement alcalin.

Pendant des années Les propriétés de surface des spores de *B.cereus* ont été le sujet de plusieurs recherches (Faille et al, 2002 ; Simmonds et al, 2003; Tauveron et al, 2006; Faille et al, 2010), car l'hydrophobicité de ces spores est identifiée comme un facteur déterminant dans l'adhésion aux surfaces inertes. Dans cette étude, les spores de *Bacillus cereus* sont soumises à sous des conditions de forte alcalinité (pH=12.75). Les résultats obtenus montrent qu'un traitement alcalin (NaOH à 2%, pH=12.75) réduit le pourcentage d'hydrophobicité à des valeurs importants et affecte les propriétés de surface des spores.

En effet les conditions d'alcalinité peuvent induire la solubilisation des protéines de surface bactériennes qui peut avoir comme conséquence l'exposition des sites hydrophobes des lipides adjacents à l'environnement extracellulaire. Ces conditions peuvent également attaquer directement la structure de la membrane de cellules par saponification des lipides ou l'altération du rapport d'acides gras de membrane. (Giotis et al, 2009).

À notre connaissance, aucun résultat n'a été publié sur l'hydrophobicité des spores de *Bacillus cereus* après un traitement avec NaOH. Cependant des travaux récents (Faille et al, 2010) ont récemment démontré que Les conditions environnementales produites pendant le CIP induisent des changements des propriétés de surface.

Résultats et Discussions

En effet quand les spores de *B.cereus* ont été soumises à un traitement par des solutions de NaOH de 2% à 80 °C, le pourcentage des spores cultivables était trop bas avec des pertes d'appendices et l'intégrité d'exosporium. Ces résultats sont comparables avec ceux trouvés par **(Giotis et al, 2009)** qui montrent qu'un pH de 12.0 présente un environnement très hostile pour *Listeria monocytogenes* et que le stress alcalin induit des diversifications significatives des morphologies comprenant la déformation et l'élongation de cellules. Ces changements dans les structures et les propriétés de surface de cellules liées à l'alcalinité et/ou d'autres dommages induits par l'environnement, peuvent perturber de manière significative le métabolisme et la structure de cellules, empêchant des interactions importants entre les cellules bactériennes et leur environnement.

Cet effet est souche dépendant ce qui est le cas dans nos résultats qui présente des variétés dans le taux d'adhésion d'une souche à une autre. Ceci est aussi rapporté par **(Tauveron et al, 2006)** dans leurs travaux sur la variabilité des propriétés de surface des spores de *Bacillus cereus*. Ces auteurs ont montré que le nombre de spores adhérentes, aussi bien que le pourcentage des spores résiduelles après le CIP est souche dépendant. D'autres travaux **(Hamadi et al, 2005)** ont montrés que Les propriétés physico-chimiques de surface de cellules peuvent être modifiées selon leurs structures extérieures ou selon les facteurs environnementaux tels que la température, la concentration ionique et le pH.

Conclusion

Conclusion

La contamination microbienne des produits alimentaires due à la présence des bactéries adhérentes dans les lignes de production est devenue un grand problème dans l'industrie laitière. Des procédures rigoureuses de nettoyage en place (CIP) ont été introduit dans l'industrie alimentaire pour nettoyer et désinfecter les surfaces industrielles ce qui est efficace contre les cellules végétatives et la contamination résiduelle mais les spores sont légèrement affecté.

Les spores de *B. cereus* sont répandues dans la nature et sont fréquemment isolées dans les lignes de transformation en raison de leur grande capacité d'adhérer aux surfaces et leur résistance aux produits chimiques et aux traitements thermiques. Ces spores sont considérées comme hydrophobes.

Cependant dans cette étude la détermination du profil d'adhésion des spores appartenant au groupe *Bacillus cereus* à l'hexadécane a révélé que 8 souches (S1, S2, S3, S5, S7, S9, S10, S12) sont hydrophiles, 3 souches (S4, S6, S11) sont hydrophobes et la souche (S8) est fortement hydrophobe.

Le traitement alcalin de la suspension sporale des souches testées à des températures de l'ordre de **70°C et 80°C** a révélé que le traitement avec (NaOH à 2%, pH=12.75) réduit le pourcentage d'hydrophobicité à des valeurs importants et affecte les propriétés de surface des spores.

D'autres travaux sont nécessaires pour caractériser les changements qui peuvent se produire dans la surface des cellules de *Bacillus cereus* sous des conditions de forte alcalinité pour mieux comprendre l'impact du stress alcalin et la réponse de ce pathogène dans l'attachement et la persistance dans les équipements laitiers .



Références Bibliographiques



Références bibliographiques

1. **Abee, T., Kovacs, A.T., Kuipers, O.P., van der Veen, S. (2010).** Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Food Biotechnology*. 22, 1-8.
2. **Abee, T., Groot, M. N., Tempelaars, M., Zwietering, M., Moezelaar, R., van der Voort, M. (2011).** Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology*.28, 199-208.
3. **Afssa. (2009) :** Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : *Bacillus cereus*.1-4.
4. **Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M. (2009).** Biofilm Formation and Cell Surface Properties among Pathogenic and Nonpathogenic Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and environmental microbiology* 75(20), 6616–6618.
5. **Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.M., Henry, N. (2008).** A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS Biology* 6(7): e167, 1549-1558.
6. **Bernardes, P.C., Andrade, N.J., Ferreira, S.O., Sá1, J.P.N., Araújo, E.A., Delatorre, D.M.Z., Luiz, L.M.P. (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.
7. **Bertrand Anne-Lise. (2004).** **Rétention des Streptocoques mutans sur des matériaux orthodontiques en fonction de différents procédés d'hygiène –étude in vitro-**. Thèse présenté a l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.
8. **Boutaleb Nadia. (2007).** Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse présentée à l'université de Bretagne- Sud.
9. **Bremer, P.J., Fillery, S., McQuillan, A.J. (2006).** Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology* 106, 254–262.
10. **Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel,T., Duport, C., Jobin, M., Guinebrière, M.H., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-Thé, C.(2010).** Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International* 43, 1885-1894.
11. **Daou Nadine. (2008) :** Identification de nouveaux facteurs hôtes-dépendants chez *Bacillus cereus* Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'IIsA, une protéine de

Références bibliographiques

- surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection. Thèse présentée à l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ).
12. **De Chalvet de Rochemonteixles Alice. (2009)** : les biofilms et la peau. Thèse présentée à l'école nationale vétérinaire d'Alfort.
13. **Euzéby-p., (2003)**. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
14. **Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C., Bénézech, T. (2002)**. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 728–738.
15. **Faille, C., Sylla, Y., Le Gentil, C., Bénézech, T., Slomianny, C., Lequette, Y. (2010)**. Viability and surface properties of spores subjected to a cleaning-in-place procedure: Consequences on their ability to contaminate surfaces of equipment. *Food Microbiology* 27, 769 -776.
16. **Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garénaux, E., Guerardel, Y. (2010)**. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 143, 125–135.
17. **Ferreira, C., Pereira, A. M., Melo, L. F., Simões M. (2010)**. Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied microbiology and microbial biotechnology*. 845-854.
18. **Gaillard Stéphane. (2003)**. Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse. Thèse présentée devant l'université de Bretagne occidentale.
19. **Geneviève Filion. (2008)**. Détection rapide de spores de *Bacillus cereus* par hybridation in situ en fluorescence. Thèse présentée à l'Université Laval Québec.
20. **Giotis, E.S., Blair, I.S., McDowell, D.A. (2009)**. Effects of Short-Term Alkaline Adaptation on Surface Properties of *Listeria monocytogenes* 10403S. *Science Journal*, 3, 62-65.
21. **Guillemot Gaëlle. (2006)**. Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur acier inoxydable : Implications pour l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire. Thèse présentée à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
22. **Guinebretiere, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M.,**

Références bibliographiques

- De Vos, P. (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*. 10, 851–865.
- 23. Hamadi, F., Latrache, H., El Ghmari, A., El Louali, M., Mabrouki, M., Kouider, N. (2004).** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*.54 (2), 213-225.
- 24. Hori, K., Matsumoto, S. (2010).** Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48, 424–434.
- 25. Hsueh, Y.H., Somers, E.B., Lereclus, D., Lee Wong, A.C. (2006).** Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *Applied and environmental microbiology*.72, 5089–5092.
- 26. Karunakaran, E., Biggs, C.A. (2011).** Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 1161–1175
- 27. Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions. *European cells and materials*.8, 37-57
- 28. Khalilzadeh Pounch. (2009).** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse présentée à L'Université Paul Sabatier Toulouse III
- 29. Lécrigny-Nolf, S., Faille, C., Bénézech, T. (2000).** Removal kinetics of *Bacillus cereus* spores from a stainless steel surface exposed to constant shear stress 2. Removal kinetics modelling: Influence of adhesion conditions. *Biofouling* 15(4), 299-311.
- 30. Leroy Céline. (2006).** Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Thèse présentée à L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- 31. Maughan, H., Van der Auwera, G. (2011).** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading infection, *Genetics and evolution*.925, 1-9.
- 32. Massicotte, R., Bédard, S., Boudreault, S., Dupuis, N., Castonguay, Y., Dumont, J., Marchand, R., Paillé, M., Pichette, G., Sicotte, D., Soucy, C.(2009).**

Références bibliographiques

- Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux. Santé et Services sociaux du Québec.
33. **Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P., Fonseca, A.P. (2001).** The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. *Hydrophobicity and adhesion*. 11-22.
34. **Öner, Z., Ölmez, Z. (2011).** Biofilm Producing Microorganisms in Dairy Industry and Prevention of Biofilm Formation. *Akademik Gıda* 9(4), 12-16.
35. **Parkar, S.G., Flint, S.H., Brooks, J.D. (2004).** Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 96, 110-116.
36. **Publication du conseil supérieure de la santé n° 8316. (2010).** Profil de risque pour le Groupe *Bacillus cereus* dans les toxi-infections d'origine alimentaire: situation en Belgique et recommandations.
37. **Puterflam, J., Jan, S., Le Maréchal, C., Koné, A.Z., Grosset, N., Gautier, M., Baron, F. (2009).** Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* dans la filière des ovoproduits : prévalence et facteurs de variation. *Science et technologie du lait et de l'œuf*, 35042 Rennes.
38. **Qureshi, N., Annous, B.A., Ezeji, T.C., Karcher, P., Maddox, I.S. (2005).** Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories*, 4:24
39. **Raulio Mari. (2010).** Ultrastructure of Biofilms Formed by Bacteria from Industrial Processes. Thèse présentée à l'université de Helsinki.
40. **Rubio Céline. (2002).** Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de préventions. Thèse présentés à l'université de Paris 6.
41. **Salaün Stéphanie. (2009).** Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épibiontes : étude moléculaire et spectroscopiques et capacité d'adhésion et de formation de biofilm. Thèse présentée à l'université de Bretagne- Sud.
42. **Saulou Claire. (2009) :** Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. Thèse présentés à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
43. **Schneider, K.R., Parish, M.E., Goodrich, R.M., Cookingham, T. (2004).** Preventing Foodborne Illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. *Food Science and Human Nutrition* 1-5.

Références bibliographiques

44. **Shaheen Ranad. 2009:** *Bacillus cereus* spores and cereulide in food-borne illness. Thèse présentée à l'université de Helsinki.
45. **Simmonds, P., Mossel, B.L., Intaraphan, I., Deeth, H.C.(2003).** Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of food protection* 66, 2070-2075.
46. **Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43, 573–583.
47. **Sundberg, M., Christiansson, A., Lindahl, C., Wahlund, L., Birgersson, C. (2011).** Cleaning effectiveness of chlorine-free detergents for use on dairy farms. *Journal of Dairy Research*.78, 105–110.
48. **Simões, L.C., Simões, M., Oliveira, R., Vieira, M.J. (2007).** Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *Journal of Basic Microbiology* 47, 174–183.
49. **Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C.(2006).** Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* 110, 254–262.
50. **Tourasse, N. J., Helgason, E., Klevan, A., Sylvestre, P., Moya, M., Haustant, M., Økstad, O.A., Fouet, A., Mock, M., Kolstø, A.B. (2011).** Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* 28, 236 -24.
51. **Vilas-Boas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N. (2007).** Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol.*53, 673-687.
52. **Vlkova, H., Babak, V., Seydlova, R., Pavlik, I., Schlegelova, J. (2008).** Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms – a review. *Czech J. Food Sci.*, 26, 309–323.



Annexes



Annexes

Annexe 1 : Matériels utilisés

❖ **Equipement :**

- Etuve
- Spectromètre
- Autoclave
- Four Pasteur
- PH mètre
- Agitateur- plaque-chauffante
- Vortex
- Centrifugeuse
- Microscope optique
- Balance
- Bec bunsen
- Réfrigérateur
- Micropipette
- Bain marie

❖ **Verrerie :**

- Erlenmeyer de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml ;
- Becher de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml ;
- Fiole jaugée ;
- Flacons en verre de 250 ml ;
- Boite de Petrie en plastique ;
- Pipette Pasteur ;
- Pipette graduées ;
- Anse de platine ;
- Tubes à essais ;
- Tubes à hémolyses ;
- Lames et lamelles ;
- Pincés ;
- Cuvette de spectromètre ;

Annexe 2 : solutions et diluants

❖ Produits chimiques :

- Hexadécane ;
- Cristal violet ;
- Fuchsine ;
- Bleu de méthyle ;
- EDS ;

Annexe 3 : les milieux de culture

✚ Gélose nutritive :

Peptone	10 g
Extrait de viande	15 g
Extrait de levure	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

✚ Bouillon nutritif :

peptone	15 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	6 g
D(+) glucose	1 g
Eau distillée	1000 ml

✚ Luria agar :

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	1000 ml