

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'Obtention du Diplôme
de Master en Microbiologie Appliquée au Génie Biologique

Thème

*Etude du potentiel d'adhésion de souches
pathogènes sur téflon et leur inhibition par les
bactéries lactiques.*

Présenté par :

M^{elle} MAAMAR Kahina

M^{elle} KACIMI Fahia

Membres du Jury :

Président:

Mr SADOUN B.

MAA

Promotrice :

M^{elle} BENDALI F.

MCA

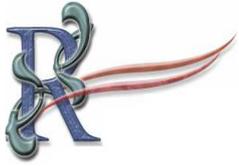
Examinatrices : M^{me} BENACHOUR K.

MAA

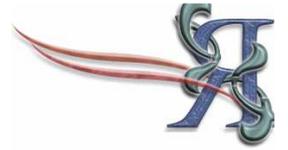
M^{elle} TITELI F.

MAA

2011- 2012



Remerciements



Avant tout, nous remercions le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

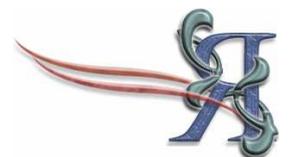
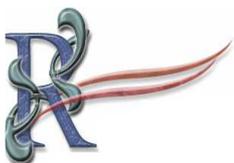
Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds à notre promotrice M^{elle} BENDALI F., d'avoir accepté de nous encadrer, ça sera pas suffisant pour lui exprimer toute notre reconnaissance pour sa confiance et son grand soutien, pour le temps qu'elle nous a consacré et pour ses conseils précieux qu'elle nous a prodigué tout le long de notre travail.

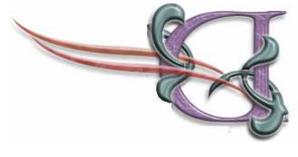
Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à M^{me} SADOUN D. qui nous a accueillis au sein du Laboratoire de Microbiologie du lait et Probiotiques.

Nous remercions infiniment les membres de jury, le président M^r SADOUN B. pour avoir accepté de présider le jury et les examinatrices M^{me} BENACHOUR K. et M^{elle} TITELI F. d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier l'équipe de l'hôpital d'amizour particulièrement M^{me} Benachour

Finalement, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tout les enseignants et les ingénieurs du laboratoire et tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





*D*edicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents que j'aime beaucoup et qui m'ont toujours encouragé. «Que dieu les protège»

*Mes très chères sœurs **Daya** et **Chouchou**, mon cher frère **Idir** et mon neveu **Adem** à qui je souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussites.*

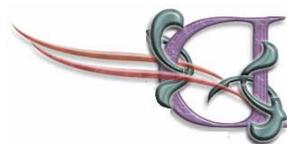
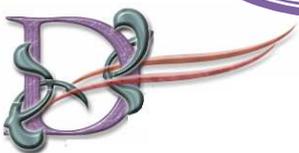
*Toutes mes amies et surtout ma chère amie **Naima Allouche** et toute sa famille.*

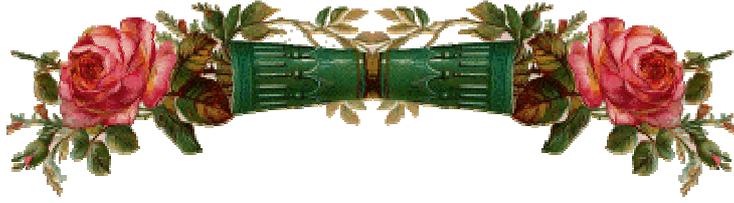
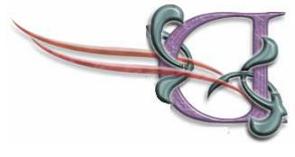
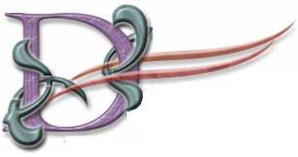
*Toute ma famille petits et grand, cousins et cousines surtout la petite **Kenza**.*

*Mon binôme et amie **Meriem** à qui je souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.*

Tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Kahina





*D*edicaces

A mon cher papa, qui m'avait tout appris et tant donner, c'est dans ces yeux que je grandissais et me sentais fière. Tu ma donner l'amour et les moyens d'en arriver la, mais tu es parti avant d'en récolter le fruit.

Tu ne m'as pas laissé le temps de te dire ni tout ce que je t'aime ni tout ce que tu me manque. On devrait toujours dire avant, l'importance que les gens prennent tant qu'il est encore temps, tu m'a pas laisser le temps.

A Maman, pour tout l'amour et le soutien qu'elle me donne, que Dieux tout puissant la garde pour moi. Tu resteras à jamais dans me cœur.

A ma grande mère, A mes oncles, et mes tantes.

A mes meilleures amies : Fatiha et Zineb, merci pour votre amitié je n'oublierai jamais ce que vous faite pour moi.

A tous mes amis qui m'ont aidé de prés ou de loin pour réussir dans ma vie personnelle et professionnelle.

A mes chers cousins et cousines.

A mon binôme Kahina pour sa patience et son soutien et son amitié.

Meriem



Liste des abréviations

A : Absorbance

BN : Bouillon Nutritif

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylene-Dramine-Tétra-Acétate

En : *Entéro*coccus

EPS : Extra Polymeric Substances

GN : Géluse Nutritive

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

LAB : Lactic Acid Bacteria

Lb : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

LPS : LipoPolySaccharide

MEB : Microscopie Electroniques à Balayage

MH : Muller Hinton

MLP : Microbiologie du Lait et Probiotiques

MRS: de Man Rogosa and Sharpe

P : *Pseudomonas*

PIA : Polysaccharidic Intracellular Adhesin

S : *Stapylococcus*

SM : Solution Mère

UA : Unité Arbitraire

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau I : Effets néfastes des biofilms négatifs dans les différents secteurs.....	9
Tableau II : Principales infections liées à la présence de biofilms.....	10
Tableau III . Aspect macroscopique des souches tests sur gélose MRS.....	25
Tableau IV : Aspect macroscopique des souches cibles sur gélose nutritive (GN).....	25

Tableaux en annexes

Tableau I : Test de Résistance des souches cibles aux antibiotiques

Tableau II : Résultats des tests d'adhésion de *S. aureus* sur téflon

Tableau III : Résultats des tests d'adhésion de *P. aeruginosa* sur téflon

Tableau IV : Résultats des tests d'adhésion d'*En. faecalis* sur téflon

Tableau V : Résultats du test de la pré-incubation avec *S. aureus* (30min dans le surnageant)

Tableau VI : Test de la pré-incubation avec *En. faecalis* (30min dans le surnageant)

Tableau VII : Test de la pré-incubation avec *P. aeruginosa* (30min dans le surnageant)

Tableau VIII : Test de la co-incubation avec *Staphylococcus aureus*

Tableau IX : Résultat de la post-incubation (le nombre détaché)

Tableau X : Matériel et appareillage utilisés

Listes des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm.....	4
Figure 2 : Observation par microscopie électronique à balayage de l'adhésion de <i>S. aureus</i> au verre et au téflon (x 2000).....	8
Figure 3 : Mécanismes d'inhibition des agents pathogènes dus à l'adhésion des bactéries lactiques.....	13
Figure 4 : Mécanisme d'action des lactobacilles dans l'inhibition des agents pathogènes...	17
Figure 5. Résultats de l'antibiogramme des souches cibles : <i>En. faecalis</i> (a), <i>P. aeruginosa</i> (b) et <i>S. aureus</i> (c).....	27
Figure 6. Résultats du test des spots à l'égard d' <i>En. faecalis</i> (a) et de <i>P. aeruginosa</i> (b)..	28
Figure 7. Adhésion des souches pathogènes sur le téflon après 3 et 6 h de contact (avec TS).....	31
Figure 8. Adhésion des souches pathogènes sur le téflon après 3 et 6 h de contact (avec BN).....	33
Figure 9. Résultats de l'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes dans la procédure de pré-incubation avec les surnageants des LAB.....	35
Figure 10. Résultats de l'inhibition de l'adhésion de <i>S. aureus</i> dans la procédure de pré-incubation avec les surnageants des LAB (concentré et non concentré).....	36
Figure 11. Résultats de l'inhibition de l'adhésion de <i>S. aureus</i> dans la procédure de co-incubation avec les surnageants des LAB.....	37
Figure 12: Résultat du détachement de <i>S. aureus</i> dans la post-incubation avec les surnageants des LAB.....	38

Sommaire

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

Partie Synthèse bibliographique

Chapitre I. Les biofilms bactériens

I-1 Définition et caractéristiques.....	3
I-2 Etapes de formation d'un biofilm.....	3
I-2-1 Adhésion primaire réversible et non spécifique à une surface	3
I-2-2 Adhésion permanente et réversible et spécifique à une surface	4
I-2-3 Sécrétion de la matrice extracellulaire (EPS)	5
I-2-4 Maturation du biofilm	5
I-2-5 dispersion des bactéries	5
I-3 Propriétés communes intervenant dans la formation d'un biofilm.....	6
I-4 Le Quorum Sensing : régulation de la formation des biofilms.....	6
I-5 Facteurs influençant la formation des biofilms.....	6
I-5-1 Facteurs influençant l'adhésion des biofilms aux supports.....	6
I-5-2 Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm.....	8
I-6 Cas des biofilms négatifs	8
I-7 Cas des biofilms positifs	11
I-7-1 Cas de <i>Lactococcus lactis</i>	12
I-7-2 Cas de <i>Lactobacillus paracasei</i>	12

*Chapitre II. Activité antibactérienne de *Lactococcus lactis* et de *Lactobacillus paracasei**

II-1 Résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques	14
II-2 Activité antibactérienne des métabolites sécrétés par les bactéries lactiques.....	15
II- 3 Métabolites pouvant interférer avec l'adhésion des agents pathogènes.....	16
II-3-1 Acides organiques.....	16
II-3-2 Peroxyde d'hydrogène.....	17
II-3-3 Bactériocines	17
II-3-4 Biosurfactants.....	17

Partie pratique

Chapitre I. Matériel et méthodes

I-1 Origine des souches utilisées	19
I-2 Préparation des <i>inocula</i> des souches utilisées	19
I-2-1 Revivification des souches.....	19
I-2-2 Standardisation des <i>inocula</i>	19
I-3 Résistance aux antibiotiques des souches pathogènes	20
I-3-1 Antibiotiques testés.....	20
I-3-2 Réalisation de l'antibiogramme.....	20
I-4 Recherche de l'activité antibactérienne des souches de LAB à l'égard des souches pathogènes	20
I-4-1 Méthode des spots.....	20
I-4-2 Méthode des puits	21
I-5 Tests d'adhésion sur téflon	21
I-5-1 Procédure de nettoyage et de désinfection du téflon	21
I-5-2 Test d'adhésion sur téflon	22
I-5-3 Tests d'inhibition de l'adhésion des souches pathogènes sur le téflon.....	22

Chapitre II. Résultats et discussion

II. 1 Aspect macroscopique des souches	24
II. 2 Standardisation des <i>inocula</i>	25
II. 3 Résistance aux antibiotiques	25
II.4 Recherche de l'activité antibactérienne	27
II.4.1 Test des spots.....	27
II.4.2 Test des puits.....	29
II. 5 Test d'adhésion sur téflon	30
II. 6 Tests d'inhibition	33
II.7 Discussion générale des tests d'adhésion	37
Conclusion	39

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

La capacité des microorganismes à coloniser les surfaces biotiques et abiotiques est un processus universel. Ce processus conduit à la formation de dépôts plus ou moins structurés, regroupés sous le terme générique de « **biofilm** ». Ce comportement des bactéries apparaît comme une réponse adaptative à un environnement plus ou moins hostile, ou du moins peu favorable, à une croissance sous forme planctonique. Cette « différenciation » bactérienne conduit à des modifications drastiques du comportement cellulaire, avec modification des fonctions métaboliques (**Davey et O'Toole, 2000**). Ce mode de vie protège les microorganismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre microorganismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress... (**Grasteau, 2011**).

L'adhésion des microorganismes aux surfaces constitue la première étape dans la formation d'un biofilm qui constitue une source de bio-contamination dans divers domaines tels que la santé, l'environnement et l'industrie alimentaire (**Wang et al., 1995; Jucker et al., 1996**).

Dans le secteur médical, les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques et d'infections nosocomiales, le plus souvent en rapport avec le port de prothèses médicales (**Grasteau, 2011**). On a rapporté que 65% des infections recensées dans les pays développés sont dues à des biofilms et plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à leur présence (**Hall-Stoodley et Costerton 2004**). Les infections à biofilms sont résistantes aux traitements antibiotiques, et posent de sérieux problèmes en matière de santé publique (**Grasteau, 2011**).

L'éradication des biofilms pose de réels problèmes dans le domaine médical. En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils révèlent parfois une efficacité quasiment nulle sur les biofilms (**Herard , 1998**)

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail qui a pour objectif d'étudier la capacité d'adhésion de trois bactéries pathogènes d'origine hospitalière (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*) sur un matériau abiotique (Téflon) ainsi que l'étude de l'interférence possible de métabolites de deux souches de bactéries lactiques bactériocinogènes (*Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*) sur cette adhésion.

Cette étude est structurée en deux parties:

1- La première partie est un recueil de données bibliographiques qui consiste à aborder quelques généralités sur :

- Les biofilms dits « négatifs » et les principales bactéries impliquées dans leur formation au niveau du secteur hospitalier.
- L'élaboration de métabolites antibactériens par les bactéries lactiques et la possibilité de leur utilisation pour inhiber la formation de ces biofilms ou leur décrochage.

2. La deuxième partie est une étude pratique visant à explorer:

- La capacité d'adhésion de trois souches pathogènes (*S. aureus*, *P. aeruginosa* et *En. faecalis*) sur une surface abiotique, le Téflon, un matériau très utilisé dans le domaine médical comme composant principal des cathéters, des sondes..etc.
- La résistance de ces souches aux antibiotiques à l'état planctonique.
- Le pouvoir antibactérien de deux souches lactiques (*Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*) à l'égard de ces trois souches pathogènes sous forme planctonique.
- L'effet inhibiteur possible des substances antibactériennes secrétées par ces souches lactiques sur l'adhésion des trois bactéries pathogènes.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Les biofilms bactériens

I-1 Définition et caractéristiques

Un biofilm est constitué d'une communauté de microorganismes fixés à une surface et généralement inclus dans une matrice extracellulaire (**Carpentier et Cerf, 1993**). Plus généralement, est considérée comme biofilm toute association de microorganismes adhérant entre eux ou à une surface (**Costerton et al., 1995**).

Ces microorganismes sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires ou EPS (extrapolymeric substances) sécrétés par ces mêmes microorganismes. Les EPS renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et des acides nucléiques (**Flemming et al., 1999; Sutherland, 2001**).

Le biofilm présente une structure hétérogène et discontinue, marquant une dispersion non uniforme des colonies à la surface du matériau. Les agrégats qui se différencient au niveau des biofilms sont entourés par des canaux qui peuvent occuper jusqu'à 50% du volume total du biofilm. Le biofilm permet de voir les microorganismes en tant qu'une communauté organisée, dynamique et caractérisée par un changement radical du phénotype (**Grasteau, 2011**).

I-2 Etapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (**Lappin-Scott et Costerton, 1995**). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (Figure 1).

I-2-1 Adhésion primaire réversible et non spécifique à une surface

Cette étape permet la transition de l'état planctonique à l'état sessile. L'hydrophobicité des cellules et de la surface de contact est associée à l'adhésion initiale (**Busscher et Weerkamp, 1984**). En général, l'hydrophobicité est associée à la présence de structures à la surface des cellules comme les flagelles, pili, lipopolysaccharides et bien d'autres, variant d'une espèce à une autre, de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales. La charge électrostatique peut également jouer un rôle dans l'attachement des bactéries à une surface (**Van der Mei et Busscher 2001**).

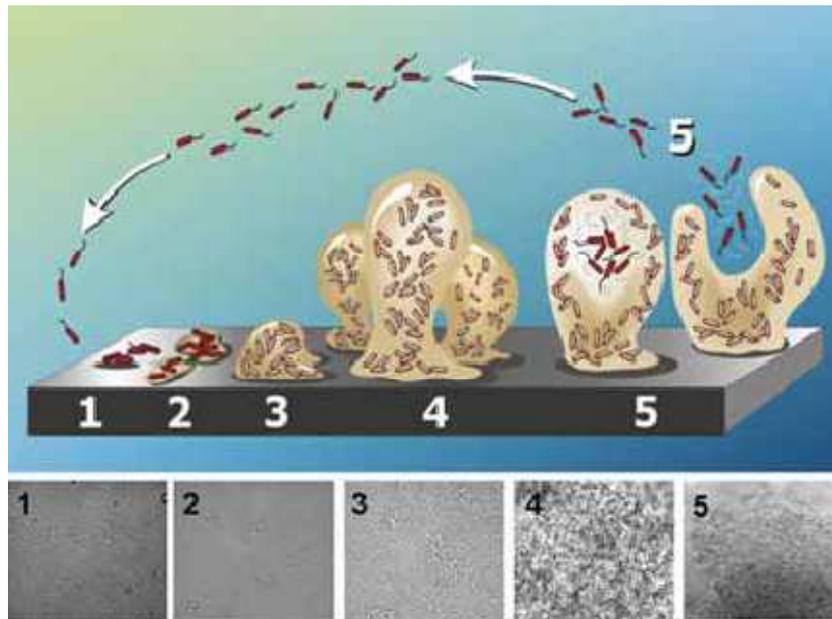


Figure 1. Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Stoodley et Sauer, 2002)

Sachant que les cellules bactériennes et les surfaces sont entourées d'une couche ionique négative, la superposition de celle-ci conduit à une répulsion électrostatique. La formation d'un film de conditionnement à la surface du support par l'adsorption d'éléments nutritifs du milieu va également intervenir dans les tous premiers instants de la rencontre entre la cellule et la surface et influencer son adhésion. Cette étape est suivie par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface (Grasteau, 2011).

I-2-2 Adhésion permanente irréversible et spécifique à une surface

Plusieurs facteurs sont responsables de cette adhésion irréversible. Parmi ceux-ci la formation de micro-colonies. Une micro-colonie consiste en un petit agrégat de cellules associées à une surface (O'Toole et Kolter, 1998 ; Sauer et Camper, 2001). La formation de micro-colonies est assurée par la présence de certains types de pili (Tfp) à la surface de la bactérie. Ces pili vont permettre une certaine forme de mouvement aléatoire des cellules à la surface faisant intervenir un mécanisme d'extension, d'attachement et de rétraction des pili et qui rendra possible l'agglomération des cellules et la formation de micro-colonies (Merz et So, 2000). Le pili de conjugaison intervient lors du contact initial avec la surface et lors de la maturation du biofilm et joue un rôle de stabilisation dans la structure du biofilm (Beloin et Roux, 2008).

I-2-3 Sécrétion de la matrice extracellulaire (EPS)

À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies commencent la sécrétion de la matrice extracellulaire (**Grasteau, 2011**). Le biofilm est connu pour être composé de multicouches de micro-colonies bactériennes englobées dans le biofilm. L'accumulation des bactéries en micro-colonies et la maturation du biofilm est contrôlée par une adhésine polysaccharidique intracellulaire (PIA) (**McKenney et Hubner, 1998**).

I-2-4 Maturation du biofilm

Le biofilm grandit et mûrit, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimales, c'est une étape déterminante dans la différenciation des biofilms. Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation (**Clutterbuck et Woods 2007**). La maturation du biofilm est divisée en deux phases

- La première phase est marquée par des régulations génétiques importantes, engendrant un changement marqué du phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elle concerne essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (**Sauer et al., 2002**).

- La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm. L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (**Clutterbuck et Woods 2007**). La mise en évidence du système de communication intercellulaire à l'intérieur du biofilm illustre bien le niveau de complexité de ce micro-environnement qui le distingue du mode de croissance planctonique (**Miller et Bassler, 2001**).

I-2-5 Dispersion des bactéries

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion : des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Cette dernière étape se produit lors du vieillissement du biofilm, ou de certains stress ou carences, les microorganismes peuvent activement se séparer du biofilm, parfois consommant la matrice qui représente une source d'énergie. Les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités: on parle d'«érosion» du biofilm. Mais on peut assister aussi à un détachement massif et rapide, « en lambeaux », de quantités importantes de bactéries, appelé «sloughing». Cette étape du développement du biofilm a été relativement peu étudiée jusqu'à présent (**Stoodley et Sauer, 2002**).

I-3 Propriétés communes intervenant dans la formation d'un biofilm

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 (**Goller et Romeo, 2008**):

- 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 (notion de 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.

I-4 Le Quorum Sensing : régulation de la formation des biofilms

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. Il s'agit de mécanismes de contrôle ayant lieu au sein des cellules, optimisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quorum. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (**Costerton, 1999; Tomlin et Malott, 2005**).

Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (**Costerton 1999; Irie et Parsek, 2008**).

I-5 Facteurs influençant la formation des biofilms

I-5-1 Facteurs influençant l'adhésion des biofilms aux supports

Ces paramètres peuvent se résumer en facteurs liés aux microorganismes, d'autres liés aux propriétés physico-chimiques (pH, température...), d'autres structuraux (nature du matériau) et hydrodynamiques (débits, régimes,...), d'autres qui se traduisent par la disponibilité en nutriments, et finalement, des facteurs liés à la présence de certains produits toxiques pour les bactéries, tels que les désinfectants (**Boutaleb, 2007**).

I-5-1-1 Facteurs liés aux supports

La formation d'un film de conditionnement à la surface du support par l'adsorption d'éléments nutritifs du milieu va également intervenir dans les tous premiers instants de la rencontre entre la cellule et la surface et influencer son adhésion. Cette étape est suivie par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface (**Grasteau, 2011**). En général,

l'adhésion est favorisée lorsque la surface de contact possède une rugosité élevée (**Arnold et Bailey, 2000**)

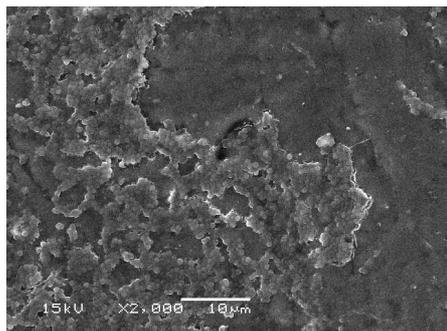
I-5-1-2 Facteurs liés à l'environnement

Une augmentation de la vitesse du flux, de la température du liquide ou de la concentration en nutriments peut aussi entraîner une augmentation de la fixation des bactéries à une surface, à condition que ces facteurs n'excèdent pas une valeur critique (**Donlan et Costerton, 2002**). De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms (**Clutterbuck et Woods 2007**).

I-5-1-3 Facteurs liés aux microorganismes

Les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire (charge, caractère hydrophobe/hydrophile, acide ou basique) dépendent de la composition de la paroi cellulaire (**Latrache et al., 1994**) et de leur métabolisme, celles-ci changeant en fonction des conditions de culture (température, composition du milieu nutritif...), le type de Gram (+ ou -) de l'espèce bactérienne, et donc influencent l'adhésion bactérienne aux supports (**Bellon-Fontaine et Cerf, 1991**).

Il est chimiquement accepté que les cellules hydrophobes aient tendance à adhérer sur un substrat hydrophobe et les cellules hydrophiles ont tendance à adhérer sur un substrat hydrophile. Par exemple, en considérant que les interactions électrostatiques sont négligeables, l'adhésion sur le téflon semble être gouvernée uniquement par les interactions acido-basiques. Dans le cas du verre, c'est la combinaison des interactions acido-basiques et des interactions hydrophile - hydrophiles qui serait à l'origine de l'adhésion (**Hamadi et al., 2009**). La figure 2 présente des micrographies électroniques (MEB) de cellules de *S. aureus* adhérentes sur du téflon et du verre.



Téflon

Verre

Figure 2. Observation par microscopie électronique à balayage de l'adhésion de *S. aureus* au verre et au téflon (x 2000) (**Hamadi et al., 2009**).

I-5-2 Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (**Spormann, 2008**).

Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans le détachement du biofilm et la dispersion de bactéries sous forme planctonique. Parmi ces facteurs, on peut citer selon **Spormann (2008)**:

- L'action mécanique exercée par un flux de liquide ;
- L'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple;
- La lyse de cellules du biofilm par l'EDTA, NaCl, le CaCl₂, ou encore d'autres agents chélateurs,
- Les changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments.

L'action de facteurs de détachements (surfactants ou enzymes dégradant la matrice) peuvent également être impliqués dans le détachement du biofilm (**Otto, 2008**).

I-6 Cas des biofilms négatifs

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé et de l'industrie générant des charges économiques importantes. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les maladies nosocomiales, les contaminations de produits alimentaires, la bio-détérioration des matériaux (en particulier la bio-corrosion), l'encrassement biologique des équipements

industriels, etc.... (Parot, 2007). Le tableau I résume les problèmes induits par ces biofilms dans différents secteurs (Klein *et al.*, 2010).

Tableau I. Effets néfastes des biofilms négatifs dans les différents secteurs (Klein *et al.*, 2010).

Secteur environnemental	Secteur medical	Secteur industriel
<ul style="list-style-type: none"> - Concentration des éléments toxiques comme le mercure, le sélénium ou l'arsenic. - Création de zones pauvres en oxygène dans les lacs, les rivières et les zones côtières. - Eutrophisation des milieux. 	<ul style="list-style-type: none"> - Développement d'infections nosocomiales à partir de sutures, lentilles de contact, cathéters, prothèses orthopédiques. - Développement d'infections chroniques comme la mucoviscidose, les ostéomyélites, les endocardites ou les infections urinaires. 	<ul style="list-style-type: none"> -Sont le lieu privilégié d'accumulation d'espèces pathogènes (legionelles, amibes...) qui peuvent ensuite contaminer l'environnement ; - Dégradation des installations immergées. - Contamination des équipements en agroalimentaire et des réseaux de distribution d'eau.

Les biofilms négatifs causent plusieurs infections dans le secteur médical. Le tableau II illustre les principales infections. Plusieurs bactéries ont été identifiées comme responsables d'infections chroniques suite à la formation de biofilms ; parmi elles nous pouvons citer *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* qui représentent les principales espèces rencontrées dans ce secteur.

Tableau II. Principales infections liées à la présence de biofilms (Lewis, 2008).

Infections ou maladies	Matériaux responsables d'infections nosocomiales
<ul style="list-style-type: none"> • Caries dentaires • Gingivites • Péritonite • Mucoviscidose • Otite moyenne (notamment chez l'enfant) • Ostéomyélites • Prostatites 	<ul style="list-style-type: none"> • Sutures • Lentilles de contact • Port d'un implant médical • Sonde urinaire • Cathéter veineux central • Sonde endotrachéale • Sonde de gastrotomie • Valve cardiaque artificielle • Prothèse orthopédique • Broches (ostéomyélite)

- *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa constitue le cas le plus étudié parmi les biofilms à l'origine des infections chez l'Homme, elle est responsable d'infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose lorsqu'elle est organisée en biofilm (Spoering et Lewis, 2001).

C'est un des plus importants agents pathogènes bactériens présents en milieu hospitalier, responsable de 30 % des infections, dont 47% sont des pneumonies "ventilatoires" (ventilator associated pneumonia, VAP). En effet, l'intubation prolongée avec un instrument endotrachéal entraîne de grands risques de développer une « VAP », puisqu'une colonisation du tractus respiratoire supérieur par *P. aeruginosa* apparaît chez 90% des patients, avec une mortalité atteignant 40% malgré une forte thérapie antibiotique. Par conséquent, il est nécessaire de mettre au point une nouvelle stratégie permettant d'empêcher, ou du moins de réduire l'apparition de VAP dues à *P. aeruginosa*. La colonisation bactérienne du tractus respiratoire implique la formation de biofilms sur la surface du matériel d'intubation (Triandafillu, 2003).

- *Staphylococcus aureus*

Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale (Avril et al., 1992). *S. aureus* peut être responsable d'endocardites, de septicémies, de pneumopathies, d'ostéomyélites, d'arthrites, d'infections urinaires ou de méningites

(Grundmann *et al.*, 2002) et sa résistance aux antibiotiques en particulier à la méthicilline est une préoccupation majeure.

La virulence de *S. aureus* est liée à la production d'enzymes, de toxines, à la présence de protéines de surface (adhésion), de protéines de liaison au fibrinogène et à sa capacité à former des biofilms par production d'exopolysaccharides (Fox *et al.*, 2005 ; Oliveira *et al.*, 2006). Cette bactérie présente aussi la capacité d'adhésion et à former des biofilms sur plusieurs surfaces telles que l'acier inoxydable et le plastique (Lahaye, 2006).

- *Enterococcus faecalis*

Le genre *Enterococcus* fait l'objet de nombreuses études en raison de sa position entre risque sanitaire et intérêt technologique. En effet, les espèces de ce genre peuvent participer à l'élaboration des caractéristiques sensorielles (Giraffa, 2003) mais elles ne sont pas reconnues sans risque et n'ont pas le statut de GRAS (Generally-Recognised-As-Safe) car elles possèdent des gènes codant pour des facteurs de virulence (Elsner *et al.*, 2000).

Les entérocoques, sont identifiés en tant que bactéries pathogènes opportunistes et font partie de la flore normale de la cavité buccale, intestinale et génitale. Se sont des agents nosocomiaux communs qui infectent l'appareil urinaire, circulation sanguine, régions intra-abdominales et pelviennes, emplacements chirurgicaux et le système nerveux central (Murray et Weinstock, 1999; Richards *et al.*, 2000).

En. faecalis, un agent commensal humain, est l'une des causes importantes des infections nosocomiales par sa capacité à former des biofilms sur les dispositifs biomédicaux tels que les cathéters urinaires et les cathéters veineux centraux (Donlan *et al.*, 2002). C'est l'espèce d'entérocoques la plus commune, et est responsable de 80-90% d'infections entérococciques humaines. Les pourcentages d'infections causées par la contamination des dispositifs médicaux par les biofilms d'*En. faecalis* sont étendus de 94 à 100% (Di Rosa *et al.*, 2006).

I-7 Cas des biofilms positifs

Dans la nature, les biofilms ont des impacts bénéfiques multiples, puisqu'ils sont responsables dans le sol du recyclage des nutriments, ils jouent un rôle important dans la production d'oxygène, dans la fixation du carbone et de l'azote, mais également dans les processus de bio-minéralisation ou de bio-remédiation (Parot, 2007).

Dans certains secteurs, les effets positifs des biofilms sont recherchés : implication dans la colonisation du tractus gastro-intestinal ou de la surface des racines des végétaux, probiotiques, traitements des déchets et dépollution (Klein *et al.*, 2010).

Parmi les genres les plus étudiés on a *Lactococcus* (dont *Lc. lactis*) et *Lactobacillus* (dont *Lb. paracasei*).

I-7-1 Cas de *Lactococcus lactis*

Le genre *Lactococcus* correspond au groupe des streptocoques lactiques de Sherman (1937) dont la principale espèce est *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis* ssp.). Se sont des cocci à Gram positif, anaérobies facultatives, à catalase négative, non sporulées, immobiles, isolées ou en courtes chaînettes. Ce genre comprend 4 espèces : *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* et *Lc. lactis*, elle-même divisée en 2 sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* (Stiles et Holzappel, 1997). Le genre *Lactococcus* possède une température optimale de croissance variant de 21°C à 30°C et un pH optimal de 5,6-6,5. Ces bactéries sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C. La thermo-résistance de ces bactéries est faible alors que leur viabilité est perdue après 30 minutes d'exposition à 63°C (Novel, 1993).

Selon une étude menée par Habimana *et al.* (2007), l'adhésion de *Lc. lactis* aux surfaces abiotiques (verre, polymères) a permis d'identifier certains déterminants moléculaires impliqués dans les processus bio-adhésifs, telles que les protéines de surface.

I-7-2 Cas de *Lactobacillus paracasei*

Le genre *Lactobacillus* est très répandu dans l'environnement, y compris les différents aliments et constitue une partie importante de la flore intestinale. Ce sont des bacilles à Gram positif, souvent groupés en chaînes, non sporulées, anaérobies facultatifs, homo-fermentaires et à catalase négative (Felten *et al.*, 1999).

Parmi les espèces du genre *Lactobacillus* on a *Lb. paracasei*.

Lb. paracasei est un bâtonnet de 2 à 4 µm de longueur, se présentant sous forme de cellules séparées ou regroupées en chaînes. Sa température de croissance est comprise entre 4 et 45°C avec un optimum de 30°C et peut survivre à une pasteurisation de 72°C pendant 40s (Dellaglio *et al.*, 1994).

L'adhésion et la colonisation des muqueuses semble être essentielle pour le contrôle de la croissance de microorganismes potentiellement pathogènes d'origine bactérienne, virale ou fongique par *Lb. paracasei* (Ait belgnaoui, 2006).

Selon Boris *et al.* (1998), *in vivo*, l'adhésion aux cellules se fait soit de manière non spécifique par des interactions électrostatiques ou hydrophobes, soit de manière spécifique par

des récepteurs impliquant des glycoprotéines ou des acides lipotéichoïques à la surface des bactéries et des glycolipides sur ces cellules.

En général, la compétition des lactobacilles avec les agents pathogènes est plutôt due à un encombrement stérique qu'à un blocage spécifique d'un site récepteur des agents pathogènes (**Boris et Barbes, 2000**). La figure 3 illustre les mécanismes spécifique et non spécifique d'inhibition de l'adhésion des agents pathogènes dus à l'adhésion des bactéries lactiques.

Figure 3. Mécanismes d'inhibition des agents pathogènes dus à l'adhésion des bactéries lactiques (D'après Rousseau, 2004).

Chapitre II

**Activité antibactérienne de *Lactococcus lactis*
et de *Lactobacillus paracasei***

II-1 Résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques est considérée comme étant le facteur le plus important pour l'apparition et la diffusion des microorganismes résistants aux antibiotiques. Cette résistance n'inclue pas que les agents pathogènes, mais aussi la flore endogène des individus (animaux et humains) exposés à ce type de médicaments (**Bogaard et al., 2001**).

Le problème d'apparition et de la dissémination de microorganismes résistants à plusieurs agents antimicrobiens est un phénomène mondial qui met en péril le traitement des maladies infectieuses. Tous les établissements de soins devront affronter, tôt ou tard, le problème de l'antibiorésistance (**O'Brien, 1997**).

Plus de 90 % des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G grâce à la production de pénicillinase d'origine plasmidique. Compte-tenu de la fréquence des infections à *S. aureus*, l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques constitue un problème préoccupant en santé publique (**Lowy, 1998**). La résistance de cette espèce à la méthicilline, à l'oxacilline et à la nafcilline, a des conséquences importantes sur les soins et est à l'origine de plusieurs éclosions dans les centres hospitaliers (**O'Brien, 1997**).

De même, *P. aeruginosa* présente une multi-résistance aux antibiotiques, qu'elle soit acquise (plasmides, transposons) ou naturelle, ce qui pose de sérieux problèmes thérapeutiques et favorise sa dissémination en milieu hospitalier (**Bricha et al., 2009**).

Une infection par des souches résistantes ne doit pas être prise à la légère car elle entraîne une augmentation de 3 fois du taux de mortalité, de 9 fois du risque de bactériémie secondaire et de 2 fois de la durée d'hospitalisation avec une inflation des coûts (**Mesaros et al., 2007**).

Les infections nosocomiales causées par les biofilms négatifs représentent aujourd'hui un défi microbiologique, pharmacologique et médical. L'évolution des résistances, induisant à l'apparition incessante de mécanismes nouveaux et la complexité des phénotypes de multi-résistance, exige la mise en place de nouveaux outils diagnostiques. Le développement de nouvelles stratégies, et la découverte de cibles nouvelles est une nécessité évidente. La conduite des traitements sur des bases microbiologiques et pharmacologiques plus solides doivent constituer des priorités (**Bricha et al., 2009**).

Il est évident que si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins probants sur un biofilm (**Brooun et al., 2000**). En effet, les bactéries au sein d'un biofilm sont dans un environnement pauvre en nutriments et par conséquent ont un métabolisme ralenti et une croissance lente, ce qui rend inefficace une grande majorité d'antibiotiques. Ou encore, la présence de la matrice d'EPS ralentit la pénétration d'antibiotiques et de biocides. Ainsi, l'alginate, produit par *P. aeruginosa*, peut capturer le

peroxyde d'oxygène, les radicaux libres relargués par les macrophages ou encore certains antibiotiques (Filloux *et al.*, 2003).

De ce fait, l'éradication d'un biofilm bactérien pose de graves problèmes sur le plan médical.

II-2 Activité antibactérienne des métabolites sécrétés par les bactéries lactiques

Afin de lutter contre les biofilms négatifs, d'autres stratégies, que l'usage des antibiotiques, sont envisagées telle que l'utilisation de métabolites antimicrobiens d'origine microbienne dont les bactériocines ou les bio-surfactants. L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques a été attribuée à la production de nombreux métabolites tels que les acides organiques (acide lactique et acétique), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), diacétyl, acétaldéhyde (Brki, 1995) et des substances de nature protéique (bactériocines) douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de microorganismes (Klaenhammer, 1993)

Les substances antimicrobiennes produites par des bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes principaux : substances à faible masse moléculaire (<1000 Da) et substances à masse moléculaire élevée (> 1000 Da) (Collins *et al.*, 2009).

La production d'acide lactique, d'H₂O₂, de bactériocines et d'autres substances antimicrobiennes par les bactéries lactiques contribuent, *in vivo*, avec le maintien d'un pH acide inférieur à 4,5, à produire un effet barrière réduisant fortement les risques d'infection (Rousseau, 2004).

La figure 4 illustre les différents mécanismes d'antagonisme mis en jeu par les bactéries lactiques probiotiques.

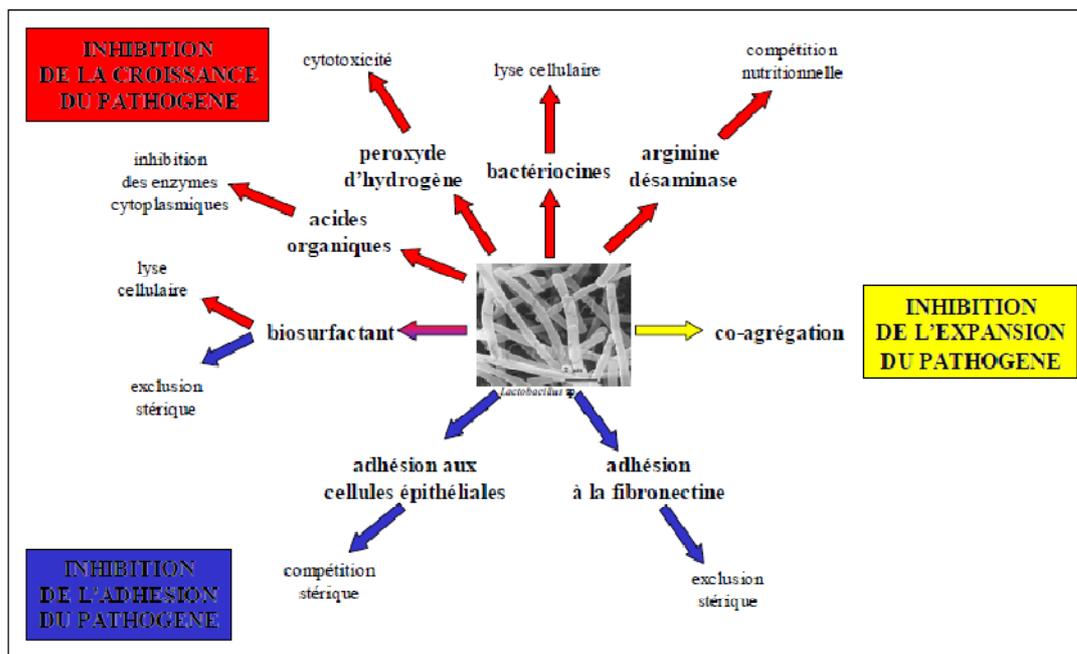


Figure 4. Mécanisme d'action des lactobacilles dans l'inhibition des agents pathogènes (d'après Rousseau, 2004).

II- 3 Métabolites pouvant interférer avec l'adhésion des agents pathogènes

Parmi les principaux métabolites antimicrobiens excrétés par les bactéries lactiques et pouvant interférer sur l'adhésion des bactéries pathogènes nous trouvons les suivants :

II-3-1 Acides organiques

Parmi les substances antimicrobiennes les plus importantes produites par les bactéries lactiques on a l'acide lactique et l'acide acétique (Suskovic *et al.*, 2010).

Les lactobacilles sont les microorganismes les plus fréquemment utilisés pour la production d'acide lactique. L'effet inhibiteur de l'acide lactique s'explique par une consommation accrue d'énergie pour maintenir la force proton-motrice qui assure les échanges avec le milieu extérieur et la stabilité du pH interne des cellules (Djidel, 2007).

Les acides organiques produits peuvent diffuser passivement à travers la membrane sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des agents pathogènes acidosensibles (Boskey *et al.*, 2001).

Selon Annuk *et al.* (2003), *Lb. paracasei* DSM 5622 produit une quantité importante d'acides lactique et acétique avec une faible quantité d'acide succinique.

II-3-2 Peroxyde d'hydrogène

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) semble être une caractéristique de grande importance des lactobacilles (**Rousseau, 2004**). Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Ces derniers sont généralement à catalase négative mais certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en micro aérobiose (**Juillard et al., 1987**). Selon **Otero et Nader-Macias (2006)**, le peroxyde d'hydrogène, à une concentration comprise entre 1,65 et 3,3 mM, a un effet bactériostatique sur *S. aureus*. Alors qu'une concentration supérieure à 3,3 mM a un effet bactéricide en milieu de laboratoire.

II-3-3 Bactériocines

Les bactériocines, telle que définies par **Klaenhammer, (1993)**, sont des molécules de nature protéique à effet bactéricide dirigé contre les espèces généralement apparentées aux bactéries productrices.

La majorité des bactériocines identifiées agissent sur les bactéries à Gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles. Elles provoquent des changements dans la perméabilité membranaire, ce qui diminue la force proton motrice des cellules sensibles (**Ennahar et al., 2000**)

En plus de leur rôle antibactérien, les bactériocines possèdent aussi une propriété antiadhésive. Une étude réalisée par **Fontana et al. (2006)** a montré que la « nisine », une bactériocine produite par une souche de *Lc. lactis*, possède une capacité d'adsorption sur des surfaces ce qui empêche l'attachement des bactéries. En effet, l'adhésion de trois bactéries pathogènes répondues dans le domaine médical (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *En. faecalis*) a été significativement inhibée sur les cathéters préalablement traités par la nisine.

La même étude a montré qu'une autre bactériocine appelée « Pep 5 », produite par *S. epidermidis* 5 est capable d'inhiber l'adhésion et l'attachement de certaines souches de *S. epidermidis* telles que *S. epidermidis* ATCC29887 et de *S. aureus* (*S. aureus* 648450) à une concentration de 640 UA/ml sur des cathéters préalablement traités avec cette bactériocine.

II-3-4 Biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles produits par des microorganismes tels que les lactobacilles avec des activités de surface émulsifiantes prononcées (**Van Hamme et al.,**

2006). *Lb. paracasei* produit un biosurfactant qui a, à la fois, une activité antimicrobienne et antiadhésive contre plusieurs bactéries pathogènes. De ce fait, ce biosurfactant pourrait être utilisé comme un agent antimicrobien alternatif dans le domaine médical, à la place des antibiotiques conventionnels, pour des applications contre des microorganismes responsables de maladies et d'infections de l'appareil gastro-intestinal, urinaire, vaginal, ainsi que dans le cas d'infections cutanées (**Gudina et al., 2009**).

Dans une étude menée par **Gudina et al. (2009)**, on a révélé que le biosurfactant sécrété par *Lb. paracasei* a une activité antiadhésive considérable contre la plupart des microorganismes nuisibles examinés tels que *S. aureus*.

Dans une autre étude (**Fracchia et al., 2010**), un autre biosurfactant (CV8LAC) produit par une souche de *Lb. paracasei* a montré une activité antiadhésive considérable contre deux souches de *Candida albicans* productrices de biofilms. La formation du biofilm par une de ces souches a été réduite de 81% dans une expérience de co-incubation en présence du biosurfactant.

Partie pratique



Matériel
et
Méthodes

Cette étude est réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie appliquée. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Bejaia.

I- 1 Origine des souches utilisées

Deux souches de LAB, appartenant respectivement aux deux sous-espèces *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* et *Lactococcus lactis ssp. lactis* sont utilisées dans cette étude. Ces deux souches font partie de la collection des souches microbiennes du laboratoire de Microbiologie du Lait et des Probiotiques (Université A. Mira de Béjaia); toutes les deux sont identifiées génotypiquement par séquençage de leur ADNr 16S.

Trois souches d'origine hospitalière (hôpital d'Amizour, Béjaia), appartenant aux espèces pathogènes, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* sont incluses en tant que souches cibles.

I-2 Préparation des *inocula* des souches utilisées

I-2-1 Revivification des souches

La revivification des souches consiste à les repiquer sur des milieux de culture appropriés puis à les incuber jusqu'à l'obtention de cultures fraîches.

Les souches de bactéries lactiques et des bactéries pathogènes, conservées dans des bouillons à 4°C, sont repiquées dans 5 ml de bouillon de de Man, Rogaza et Sharpe (MRS) et dans du bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur d'Algérie) respectivement puis incubées à 30°C/24 h à l'étuve (Memmert).

I-2-2 Standardisation des *inocula*

Afin de pouvoir comparer entre les souches de LAB et entre les souches de bactéries pathogènes, une standardisation des conditions de culture et des *inocula* est indispensable.

À partir d'une culture fraîche, de la bactérie lactique ou de la bactérie pathogène, obtenue dans 5 ml de bouillon (MRS ou BN respectivement), un ensemencement est réalisé sur le même milieu gélosé. Après 48 h d'incubation à 30°C ou de 24 h à 37°C, huit ou cinq colonies bien isolées et distinctes sont repiquées dans 5 ml de bouillon MRS ou BN et incubées à 30°C ou à 37°C pendant 18 h, respectivement.

Au terme de la période d'incubation, l'absorbance de la culture obtenue est mesurée à 620 nm ou à 600 nm avec un spectrophotomètre (SPECORD 50, analytikjena, Allemagne) et un

dénombrement est effectué en masse dans la gélose MRS ou nutritive avec incubation à 30°C ou à 37°C pendant 24 h respectivement.

I-3 Résistance aux antibiotiques des souches pathogènes

I-3-1 Antibiotiques testés

Afin d'étudier la résistance des souches pathogènes (souches cibles) aux antibiotiques, plusieurs disques d'antibiotiques sont testés :

Spiramycine (Sp₁₀₀), Ampicilline (Am₁₀), Vancomycine (Va₃₀), Amikacine (Ak), Ceftazidime (Caz₃₀), Cefotaxime (Ctx₃₀), Erythromycin (E₁₅), Doxycycline (Do₃₀), Acide Nalidixique (Na₃₀), Pefloxacin (Pef₅), Tétracycline (Te₃₀), Gentamicine (CN₁₀), Pénicilline (P₁₀), Ofloxacin (Ofx₅), Ciprofloxacine (Cip₅).

I-3-2 Réalisation de l'antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie (CA-SFM 2009).

A l'aide d'un écouvillon stérile, les *inocula* des souches cibles sont ensemencés sur gélose Muller Hinton (coulée et solidifiée), puis des disques d'antibiotiques sont déposés stérilement sur les boîtes ensemencées. Ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24h.

Au terme de l'incubation, les résistances et les zones d'inhibition sont notées, puis comparées au tableau des normes des recommandations du CA-SFM (2009).

I-4 Recherche de l'activité antibactérienne des souches de LAB a l'égard des souches pathogènes

Pour la mise en évidence de la production éventuelle de substances antibactériennes par les souches de LAB, actives à l'égard des souches pathogènes, les méthodes des spots et des puits, telles que décrites par **Bendali et al. (2008)** sont utilisées.

I-4-1 Méthode des spots

Après avoir coulé de la gélose MRS en boîte de Pétri (solidifiée et séchée), 10 µl de chaque culture bactérienne (10⁸ UFC/ml) des souches de LAB (*Lc. lactis* et *Lb. paracasei*) sont déposées en spots à la surface de la gélose. Après séchage des boîtes, elles sont incubées à 30°C pendant 18 h. Au terme de la période d'incubation, les spots sont recouverts de 9 ml de gélose de

Muller Hinton (MH, IPA) ensemencés avec 1 ml d'une culture fraîche de la souche pathogène (10^7 UFC/ml). Les boîtes sont ré-incubées à 37°C pendant 18 h et à l'issue de la période

d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition, apparues éventuellement autour des spots, est mesuré.

I-4-2 Méthode des puits

La méthode des puits est une méthode indirecte qui permet de mettre en contact le surnageant contenant les substances antibactériennes produites par les LAB avec les souches cibles. Les deux souches de LAB (*Lc. lactis* et *Lb. paracasei*) sont cultivées dans du bouillon MRS puis incubées pendant 18 h à 30°C. Après incubation, le surnageant des deux cultures (10^8 UFC/ml) est récupéré par centrifugation à 8000g/20min à 4°C (ROTINA 380 R, Hettich Zentifugeu, Allemagne).

De la gélose MRS est coulée en boîtes Pétri, après solidification, la première couche de gélose est recouverte avec une autre couche de 10 ml d'une gélose en surfusion de Muller Hinton ensemencée avec la suspension de chaque souche pathogène (*S. aureus*, *P. aeruginosa* et *En. faecalis*) à raison de 10^6 UFC/ml.

Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre et de 3 mm de profondeur sont creusés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et scellés avec une goutte de gélose MRS. Les puits sont ensuite remplis avec 100 µl du surnageant natif et neutralisé (NaOH 3N), filtrés à l'aide d'un filtre à seringue (0,45 µm). Les boîtes sont d'abord entreposées pendant 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des principes actifs contenus dans le surnageant puis incubées à 37°C/18 h. L'activité antibactérienne des souches tests est révélée par la présence de zones claires autour des puits. Le diamètre de ces zones est mesuré.

I-5 Tests d'adhésion sur téflon

I-5-1 Procédure de nettoyage et de désinfection du téflon

Dans le but d'éliminer les impuretés minérales et organiques présentes à la surface du téflon, et de le désinfecter, les traitements suivants sont appliqués :

- Émersion dans l'éthanol absolu pendant 10 min
- Lavage 10 min dans un détergent RBS 35
- Rinçage dans de l'eau chaude (50°C)
- Rinçage 5 fois dans de l'eau distillée stérile
- Séchage

- Enrobage dans du papier aluminium
- Autoclavage à 120°C/20min

I-5-2 Test d'adhésion sur téflon

Les tests d'adhésion sur le téflon sont effectués selon le protocole suivant : Les cultures de bactéries pathogènes (*En. faecalis*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*) dans bouillon nutritif, obtenues au bout de 18 h à 37°C, sont centrifugées à 8000g/20 min à 4°C. Après lavage, les culots bactériens sont remis en suspension dans un diluant, Tryptone-Sel-Eau (TS) stérile et fortement homogénéisés.

Les coupons de téflon sont déposés dans des boîtes de Pétri stériles puis recouverts avec les suspensions bactériennes et incubées à 37°C pendant 3 et 6 h. Après incubation, chaque coupon est lavé avec du TS et les cellules sont détachées par agitation vigoureuse dans un erlen stérile contenant 10 ml de TS et des billes en verre stériles. Après agitation, un dénombrement des bactéries viables adhérentes est effectué en masse dans la gélose Trypticase Soja (TSA, IPA). Le même test est repris en incubant les coupons de téflon dans le BN (à la place du TS). Des tests témoins avec du BN, pour chaque souche de bactéries pathogènes, sont effectués comme suit :

Les coupons de téflon sont déposés dans des boîtes de Pétri stériles puis recouverts avec les suspensions bactériennes et incubées à 37°C pendant 3 h. Après incubation, chaque coupon est lavé avec du TS puis ré-incubé dans du BN stérile pendant 3 h à 37°C. Le dénombrement est effectué en masse dans la gélose TSA.

I-5-3 Tests d'inhibition de l'adhésion des souches pathogènes sur le téflon

Les deux souches de bactéries lactiques sont cultivées dans du bouillon MRS et incubées pendant 18 h à 30°C. Après incubation, la culture (10^8 UFC/ml) est centrifugée à 8000g/10 min à 4°C (ROTINA 380R, Hettich Zentrifugeu, Allemagne) et les surnageants sont récupérés, dans des tubes stériles puis leur pH est ajusté à pH 6,7 et filtrés.

Des échantillons de ces surnageants sont testés envers les souches pathogènes suivant la procédure de pré-incubation.

Dans le cas de *S. aureus*, deux autres procédures (co- et post-incubation) sont également utilisées.

I-5-3-1 La Pré-incubation

Les coupons de téflon sont déposés stérilement dans des boîtes de Pétri stériles et recouverts pendant 30 min avec le surnageant de culture neutralisé, de chaque souche de LAB. Les coupons sont par la suite retirés et séchés à l'étuve, puis inoculés avec une suspension de bactéries pathogènes (10^6 UFC/ml) puis ré-incubés pendant 3 h à 37°C. Le dénombrement de bactéries adhérentes au téflon est effectué comme décrit précédemment. Le test est refait en utilisant un surnageant concentré (3 fois).

I-5-3-2 La co-incubation

Les coupons de téflon sont incubés en présence de chaque surnageant de culture des LAB (neutralisé), ensemencé la souche de *S. aureus* (10^7 UFC /ml) puis incubés à 37°C pendant 3 h. Le dénombrement des bactéries adhérentes au téflon est effectué au terme de la période d'incubation comme décrit précédemment.

I-5-3-3 La post-incubation

Des biofilms de *S. aureus* formés comme décrit plus haut, sont séchés puis immergés dans le surnageant de culture (neutralisé) de chaque souche de bactérie lactique pendant 30 min, 1 et 2 h. Au terme de chaque période d'incubation, les cellules viables sont dénombrées comme décrit précédemment.

Remarque

Le surnageant concentré (trois fois) et neutralisé, n'est testé qu'avec la souche de *S. aureus* selon la procédure de la pré-incubation.



Résultats
et
Discussion

Deux souches de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*) ont été utilisées (souches tests) afin d'étudier leur pouvoir antibactérien à l'égard de 3 souches cibles (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*) ainsi que leur capacité d'adhésion sur une surface abiotique (Téflon).

II. 1 Aspect macroscopique des souches

L'aspect macroscopique des souches tests de *Lactococcus lactis* et de *Lactobacillus paracasei* est présenté dans le **tableau III**.

Tableau III. Aspect macroscopique des souches tests sur gélose MRS

Espèce	Aspects des colonies sur MRS	
<i>Lactococcus lactis</i>		Petites colonies, arrondies et bombées.
<i>Lactobacillus paracasei</i>		Petites colonies, arrondies, bombées et crémeuses.

L'aspect macroscopique des souches cibles est illustré dans le **tableau IV**.

Tableau IV. Aspect macroscopique des souches cibles sur gélose nutritive (GN).

Espèce	Aspect macroscopique sur GN	
<i>Staphylococcus aureus</i>		Colonies moyennes, blanchâtres et arrondies.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Colonies moyennes, lisses, verdâtres et muqueuses.
<i>Enterococcus faecalis</i>		Petites colonies, arrondies,

II. 2 Standardisation des *inocula*

Afin de déterminer l'activité antibactérienne des deux souches de bactéries lactiques testées ainsi le nombre de cellules des souches cibles adhérees au téflon, les *inocula* des souches utilisées dans la présente étude ont été standardisés. Le taux des souches lactiques a été standardisé à 10^8 UFC/ml et celui des souches pathogènes à 10^6 UFC/ml.

II. 3 Résistance aux antibiotiques

Trois souches pathogènes (*S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis*) ont été testées pour leur résistance à certains antibiotiques.

En comparant aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie (CA-SFM, 2009), les résultats montrent :

- Une résistance de *S. aureus* à certains antibiotiques tels que : la Ceftazidine (4mm) et la Vancomycine (14mm), et une sensibilité à la plupart des autres antibiotiques testés (la Gentamicine et la Penicilline...).
- D'après les résultats obtenus, *P. aeruginosa* a une sensibilité à l'Amikacine (20mm) et à la Ciprofloxacine (34mm) et une résistance totale à certains antibiotiques tels que : l'Ampicilline, la Vancomycine et la Pénicilline, ainsi qu'une résistance avec différents diamètres à quelques antibiotiques (Tétracycline (6mm), Cefotaxime (8mm) et Spiramycine (8mm)).
- *En. faecalis* présente une résistance à tout les antibiotiques testés, dont une résistance totale à l'Amikacine et à la Ceftazidin et une résistance avec différents diamètres à l'encontre de l'Ampicilline (10mm), Vancomycine (16mm) et autres (tableau II, annexe I).

Quelques images des résultats de l'antibiogramme sont présentées sur la figure 5.

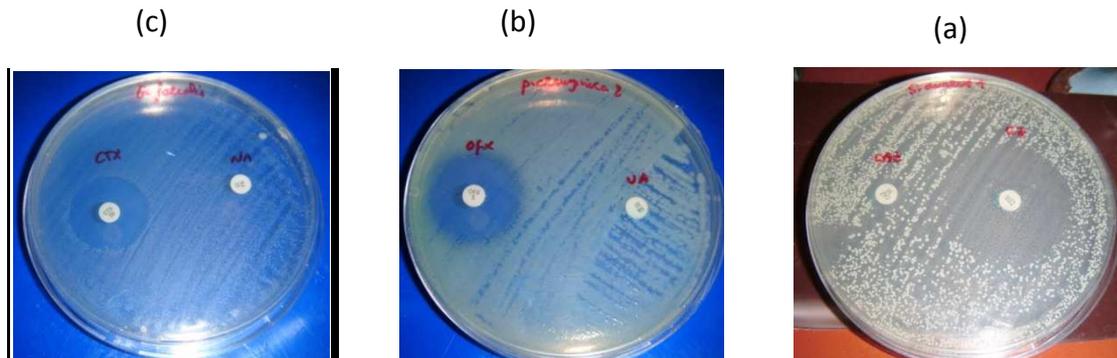


Figure 5. Résultats de l'antibiogramme des souches cibles : *En. faecalis* (a), *P. aeruginosa* (b) et *S. aureus* (c)

Selon **Lammi (2011)**, les souches bactériennes possédant un plasmide R, peuvent produire des enzymes qui modifient chimiquement les antibiotiques par phosphorylation, acétylation ou adénylation.

La molécule modifiée perd alors son activité antibiotique. D'autres mécanismes de résistance sont mis en place par les bactéries, tel le système d'efflux qui permet de relarguer un antibiotique entré dans la cellule, présent à titre d'exemple chez *P. aeruginosa*, ce qui lui offre une résistance à de nombreux antibiotiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

Les mêmes auteurs affirment que *S. aureus* résiste à l'Erythromycine et d'autres antibiotiques tel que la Streptomycine et cela par la modification de la cible par exemple, l'ARN polymérase. De même *En. faecalis* a une résistance accrue à plusieurs antibiotiques comme la Tétracycline, l'Erythromycine et la Pénicilline par le système d'efflux.

II.4 Recherche de l'activité antibactérienne

Afin de vérifier l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'encontre des souches pathogènes, deux tests de diffusion en milieu gélosé ont été réalisés.

II.4.1 Test des spots

Les souches de *Lc. lactis* et *Lb. paracasei*, testées à un taux de 10^8 UFC/ml, montrent une activité antibactérienne vis-à-vis de deux souches pathogènes (*P. aeruginosa* et *En. faecalis*) parmi les trois souches testées. Cette activité est révélée par l'apparition de zones d'inhibition autour des cultures lactiques déposées en spots (Figure 6). Par contre, à l'encontre de *S. aureus* aucune zone d'inhibition n'est détectée (tableau V).

Tableau V. Diamètres des zones d'inhibition (sans diamètre du spot) avec le test des spots

		Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
		<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. paracasei</i>
Souche cible	<i>S. aureus</i>	0	0
	<i>P. aeruginosa</i>	20	6
	<i>En. faecalis</i>	6	6

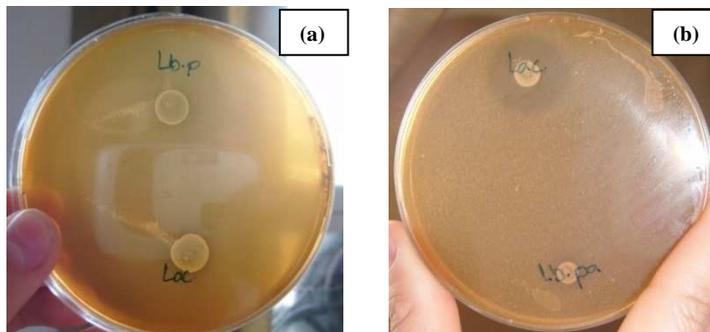


Figure 6. Résultats du test des spots à l'égard d'*En. faecalis* (a) et de *P. aeruginosa* (b).

Les résultats obtenus montrent une activité antibactérienne des deux souches lactiques à l'égard de *P. aeruginosa* avec un diamètre de zone d'inhibition plus élevé avec *Lc. lactis* (20 mm) par rapport à celui révélé avec *Lb. paracasei* qui ne dépasse pas 6 mm.

L'activité antibactérienne des deux souches lactiques à l'égard d'*En. faecalis* est faible, exprimée par un diamètre de zone d'inhibition de 6 mm.

Selon **Schillinger et Lucke (1989)**, l'inhibition est notée positive lorsqu'elle s'exprime par un diamètre supérieur à 1mm.

Parmi les métabolites ayant un pouvoir inhibiteur à l'égard des agents pathogènes, on trouve : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines.

L'acide lactique est l'un des acides organiques produits par les bactéries lactiques qui peut diffuser passivement à travers la membrane cellulaire, il acidifie le cytoplasme et inhibe l'activité enzymatique cellulaire des agents pathogènes acidosensibles (**Boskey et al., 2001**).

Les LAB notamment *Lc. lactis* ont une capacité de produire le H₂O₂ qui a un rôle inhibiteur vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes. Cependant, **Ito et al., (2003)**, après avoir évalué la production de H₂O₂ par plusieurs souches de bactéries lactiques, ont constaté que la souche de *Lc. Lactis* produit une quantité importante de H₂O₂ qui possède un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries à Gram positif (*En. faecalis*) et à Gram négatif (*P. aeruginosa*).

Lc. lactis est une des espèces qui peuvent synthétiser des bactériocines telle que la nisine qui est active sur plusieurs bactéries à Gram positif tel qu'*En. faecalis* (**Guiga et al., 2007**).

Dans une étude réalisée par **Elmoualdi et al. (2008)**, quatre souches, de LAB, ont été retenues pour leur pouvoir acidifiant dont une souche de *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ayant montré un effet bactéricide à l'égard de nombreuses souches pathogènes y compris *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Les vingt souches de *Lactococcus lactis* testées par **Metlef et Dilmi-Bouras (2009)** présentent une activité inhibitrice très importante à l'égard des espèces à Gram positif dont *Enterococcus* sp. D'après une étude réalisée par **Izquierdo Alerge (2009)**, parmi cinq souches de lactococques testées, *Lc. lactis* WHE 53 et *Lc. lactis* WHE 99 exerçaient une activité inhibitrice vis-à-vis d'*En. faecalis*, révélée par le test des spots (2 mm de diamètre).

De plus, l'effet inhibiteur pourrait être due à l'existence d'une compétition nutritionnelle dans le milieu de culture entre les souches tests et la souche cible ce qui expliquerait l'apparition des zones d'inhibition autour des spots (**Mastromarino et al., 2002**).

L'absence d'activité inhibitrice à l'égard de *S. aureus* pourrait être due à plusieurs causes :

- Une résistance de *S. aureus* à l'acidité. En effet, une étude menée par **Bremer et al. (2004)** a montré que certaines souches de *S. aureus* sont capables à croître à des pH très bas (jusqu'à 4,5).
- *S. aureus* possède une catalase qui peut dégrader le H₂O₂, un des métabolites inhibiteurs des bactéries lactiques (**Mami et al., 2010**).

II.4.2 Test des puits

Cette méthode permet de mettre en évidence l'implication de métabolites, excrétés dans le milieu de culture liquide, dans l'effet antibactérien exercé par la bactérie testée. Les surnageants de culture des deux souches lactiques testées ont été neutralisés à un pH de 6,7 avant la réalisation du test. Les résultats obtenus ne montrent aucune zone d'inhibition des trois bactéries pathogènes.

L'absence de toute activité antibactérienne pourrait être due à la dilution du surnageant d'où dilution des métabolites antibactériens éventuellement excrétés dans le milieu de culture. En effet, **Doumandji et al. (2010)** ont rapporté que la concentration du surnageant de culture des bactéries lactiques peut améliorer son activité antibactérienne, du fait que certaines molécules (bactériocines) sont généralement produites en faible quantité.

Nos résultats à l'égard d'*En. faecalis* sont en accord avec ceux de **Allouche et al. (2010)** qui n'ont retrouvé aucune activité antibactérienne à l'égard d'*En. faecalis* suite au traitement avec le surnageant de culture neutralisé de souches de *Lb. thermophilus*.

Dans une étude réalisée par **Mami et al. (2008)**, uniquement 11 souches de lactobacilles parmi les 64 isolées, montraient une activité inhibitrice à l'égard de *S. aureus* ATCC25923 et aucune activité n'a été révélée vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

En supposant la synthèse d'une bactériocine par les deux souches lactiques, l'absence d'activité antibactérienne suite au test des puits pourrait s'expliquer par :

1. La perte d'activité à pH neutre. En effet, d'après **Allouche et al. (2010)**, les bactériocines exercent leur effet antibactérien lorsqu'elles sont stables et cette stabilité n'est généralement maintenue que sur une gamme de pH comprise entre 5 à 6 avec un pH optimum estimé à 5.
2. *P. aeruginosa* est insensible à l'action de la bactériocine en raison d'une part :
 - L'activité ne s'exerce que sur des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice (**Tahara et Kanatani, 1996**) et d'autre part :
 - L'activité des bactériocines est dépendante de son insertion au niveau de la membrane cytoplasmique et celle des bactéries à Gram négatif en est répulsive (**Mami et al. 2010**).

Selon **Yang et al. (1992)**, les bactériocines peuvent s'adsorber sur la paroi de la cellule bactériocinogène. La fraction adsorbée pourrait représentée environ 80% de la totalité de la bactériocine produite.

Ammor et al. (2006) ont rapporté que l'activité antibactérienne est mieux exprimée sur un milieu solide (milieu gélosé), mimant l'environnement naturel où se trouvent les bactéries, que dans un milieu liquide.

II. 5 Test d'adhésion sur téflon

Afin d'étudier l'adhésion des trois souches de bactéries pathogènes sur un support inerte « téflon », ce dernier a été nettoyé et désinfecté puis mis en contact avec les suspensions bactériennes pendant 3 et 6 h dans deux milieux différents : le Tryptone-Sel-Eau (TS) et le bouillon nutritif (BN). Le nombre de cellules adhérentes est ensuite déterminé par détachement suivi par un dénombrement en masse sur gélose TSA.

Les résultats d'adhésion des trois souches sont présentés sur la **figure 7**

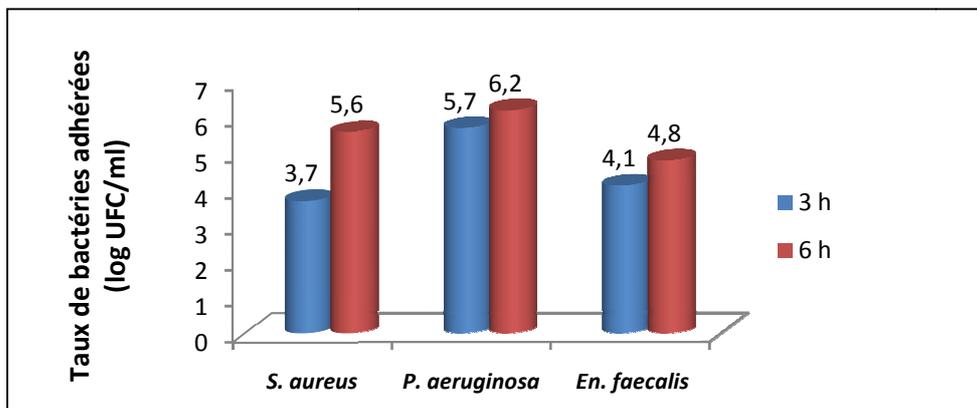


Figure 7. Adhésion des souches pathogènes sur le téflon après 3 et 6 h (avec TS)

Après 3 h de contact (bactérie-support), les résultats obtenus montrent que les trois souches ont tendance à adhérer au téflon à des taux différents. *P. aeruginosa* présente le taux d'adhésion le plus élevé (9,11%) par rapport à *En. faecalis* (1,6%) et *S. aureus* (0,14%).

Après une période de contact prolongée jusqu'à 6 h, le nombre de cellules de *S. aureus* adhérentes a augmenté considérablement atteignant 12%, c'est à dire 81 fois supérieur au taux enregistré après 3 h de contact.

Dans le cas d'*En. faecalis*, le taux d'adhésion observé après 6 h de contact est de 4 fois supérieur en le comparant avec le nombre adhérent après 3 h (de 1,6% à 6,6%).

Alors que, dans le cas de *P. aeruginosa*, le taux d'adhésion a doublé, passant de 9,11% (3 h) à 22,05% (6 h de contact).

L'utilisation du bouillon nutritif (BN) comme milieu d'incubation a permis une augmentation du nombre de bactéries adhérentes au téflon en comparant avec les résultats obtenus en utilisant du TS. Les résultats du dénombrement des bactéries viables adhérentes en fonction du temps de contact et la nature du milieu d'incubation pour les trois souches pathogènes sont présentés sur la figure (tableau III, IV, V, annexe I).

Les résultats obtenus montrent que :

- *P. aeruginosa* a une capacité d'adhésion plus élevée au téflon par rapport aux deux autres souches.
- *S. aureus* nécessite un temps de contact plus long (6 h) pour pouvoir adhérer au téflon par rapport aux deux autres souches.
- *En. faecalis* a une capacité d'adhésion moindre au téflon en comparant avec les deux autres souches (*S. aureus* et *P. aeruginosa*).
- Le taux d'adhésion des cellules au téflon augmente entre 3 h et 6 h atteignant de valeurs supérieures aux taux initiaux d'ensemencement ce qui montre une multiplication des cellules au sein du biofilm. On peut donc déduire que la surface du téflon permet une multiplication des bactéries adhérentes en présence d'éléments nutritifs.

Les résultats d'adhésion des trois souches sont présentés sur la **figure 8**

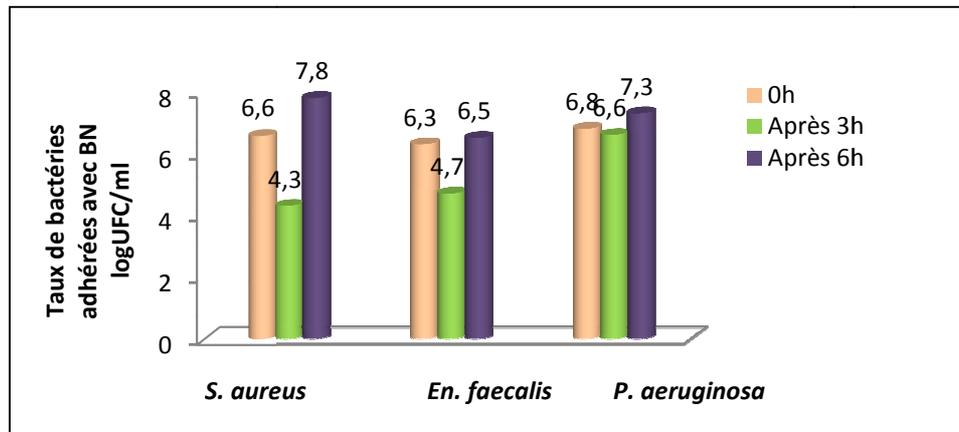


Figure 8. Adhésion des souches pathogènes sur le téflon après 3 et 6 h (avec BN)

La surface des cellules bactériennes possède plusieurs structures et des propriétés qui contribuent à leur adhérence sur les surfaces : les fimbriae (pili), la paroi cellulaire (acides téichoïques chez les bactéries à Gram positif) et la membrane externe (lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif). Ces caractéristiques influencent la charge extérieure et

l'hydrophobicité de la cellule bactérienne, affectant directement leur adhésion (**Pace et al., 2006**).

S. aureus est reconnu pour sa capacité d'adhésion et de formation de biofilms sur différentes surfaces ce qui l'a rendu l'agent principal des infections nosocomiales (**Seidl et al., 2008**).

Hamadi et al. (2009) ont montré que *S. aureus* est capable d'adhérer et de former des biofilms sur le verre et le téflon. Les cellules adhérentes sont sous forme d'agrégats sur les deux supports. La comparaison des surfaces occupées montre que l'organisation des cellules sur les deux supports n'est pas la même. Le phénomène d'agrégation semble être plus important sur le téflon que sur le verre. Les mêmes auteurs affirment que l'adhésion de *S. aureus* sur le téflon semble être gouvernée uniquement par des interactions acido-basiques.

Par contre **Foster et Hook (1998)** rapportent qu'en plus de l'hydrophobicité et la charge cellulaire, *S. aureus* possède aussi un nombre élevé d'adhésines de surface permettant l'attachement de ce dernier sur différents substrats. Ceci a été démontré par **Trotonda et al., (2008)** qui ont mis en évidence une Adhésine Polysaccharidique Intracellulaire /Poly-N-

acetylglucosamine (PIA/PNAG) responsable de l'adhésion, la micro-agrégation ou la macro-agrégation de *S. aureus* à un substrat.

A l'instar de *S. aureus*, *P. aeruginosa* est considérée parmi les espèces des plus reconnues pour leur capacité à former des biofilms à l'origine d'infections nosocomiales (**Southey et al., 2005**).

L'hydrophobicité et la charge électrostatique de la cellule bactérienne influence l'adhérence sur les surfaces biotique et abiotique. Les souches hydrophobes de *P. aeruginosa* montrent une plus grande adhérence aux polyuréthanes et à la silicone que les souches hydrophiles (**Pace et al., 2006**). Les mêmes auteurs rapportent que parmi les principaux facteurs responsables de l'adhésion et de la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* on a le flagelle et les pilis de type IV.

Concernant les entérocoques, **Tamilvanan et al. (2008)** affirment que la détection d'un biofilm formé par les entérocoques est l'une des étapes essentielles qui aboutit à la prévention des infections nosocomiales, d'autant que la plupart des infections acquises au niveau hospitalier sont dues au biofilms.

Dans une étude réalisée par **Providencia et al. (1999)** ayant pour objectif la mise en évidence du pouvoir d'adhésion d'*En. faecalis* sur six différents biomatériaux, il a été prouvé que cette espèce est capable de former un biofilm sur le téflon avec un taux d'adhésion considérable (jusqu'à $1,6 \cdot 10^6$ UFC/ml à partir d'une suspension de $2,5 \cdot 10^5$ UFC/ml après 24 h de contact).

Selon **Van Merode et al. (2006)**, la majorité des espèces cliniques d'*En. faecalis* ont la capacité de former un biofilm *in vitro* impliquant plusieurs facteurs tels que : la protéine de surface Esp et la gélatinase E (GeIE).

II. 6 Tests d'inhibition

Afin de lutter contre les biofilms formés par les bactéries pathogènes testées, les surnageants de culture des deux LAB ont été utilisés dans ce contexte, en trois différentes procédures :

II. 6. 1 La pré-incubation

Après immersion des coupons de téflon, pendant 30 min, dans le surnageant de culture (neutralisé et filtré) de chaque LAB, ils sont déposés dans une suspension contenant 10^6 UFC/ml de chaque bactérie pathogène pendant 3 h. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 9.

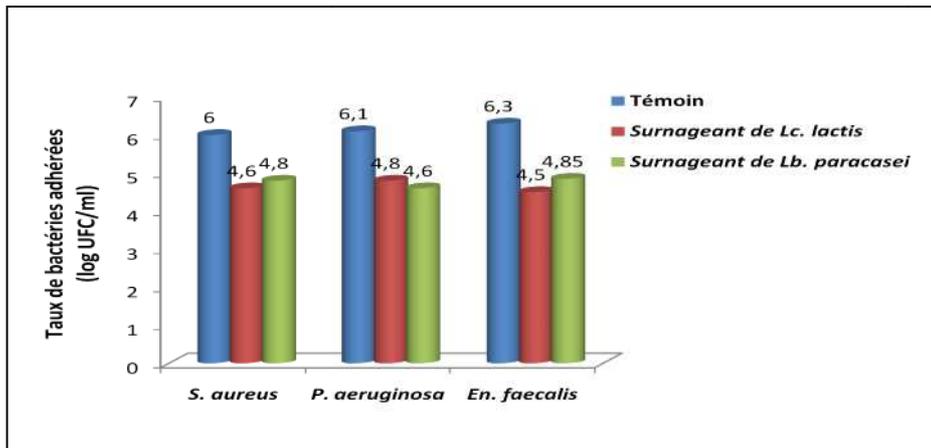


Figure 9. Résultats de l'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes dans la procédure de pré-incubation avec les surnageants des LAB.

Après 3 h d'incubation, la diminution du nombre de bactéries adhérentes sur les coupons de téflon, après traitement avec le surnageant des LAB, a été remarquable pour les trois souches pathogènes. Néanmoins, le taux d'inhibition de l'adhésion varie d'une espèce à une autre.

En effet, le taux d'inhibition de l'adhésion d'*En. faecalis* est plus élevé en le comparant aux taux enregistrés avec les deux autres souches et cela avec le surnageant de *Lc. lactis* (seulement 1,7% du nombre total des bactéries, ont pu adhérer en présence du surnageant). Par contre, le taux d'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* était le plus faible; 6% du nombre initial ont pu adhérer en présence du surnageant de *Lb. paracasei*.

En comparant entre le taux moyen d'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes par les deux souches lactiques testées, *Lc. lactis* montre un meilleur effet inhibiteur que *Lb. paracasei*.

Le test d'inhibition de l'adhésion en pré-incubation a été refait avec un surnageant concentré (3 fois) et cela avec *S. aureus*.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 10**.

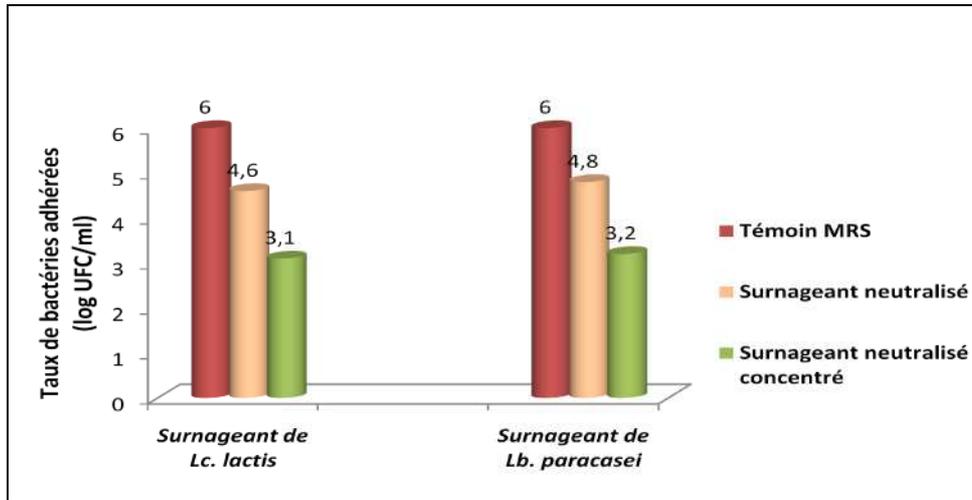


Figure 10. Résultats de l'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* dans la procédure de pré-incubation avec les surnageants des LAB (concentré et non concentré).

Les résultats obtenus avec le surnageant concentré montre une meilleure inhibition de l'adhésion de *S. aureus*. Dans le cas de *Lc. lactis*, le taux d'adhésion diminue de 4% (surnageant non concentré) à 0,14% (surnageant concentré). De même dans le cas de *Lb. paracasei*, l'utilisation du surnageant concentré a réduit le taux d'adhésion de *S. aureus* à 0,16% tandis qu'il était de 6% après traitement avec le surnageant non concentré.

Les résultats obtenus pour les tests d'inhibition en pré-incubation des trois souches sont présentés dans le tableau VI, VII, VIII (annexe I).

II. 6. 2 La co-incubation

Les deux surnageants de LAB sont inoculés par la suspension de *S. aureus* puis sont mis en contact avec les coupons de téflon pendant 3 h. Les résultats du dénombrement des bactéries viables adhérentes sont représentés sur la **figure 11**.

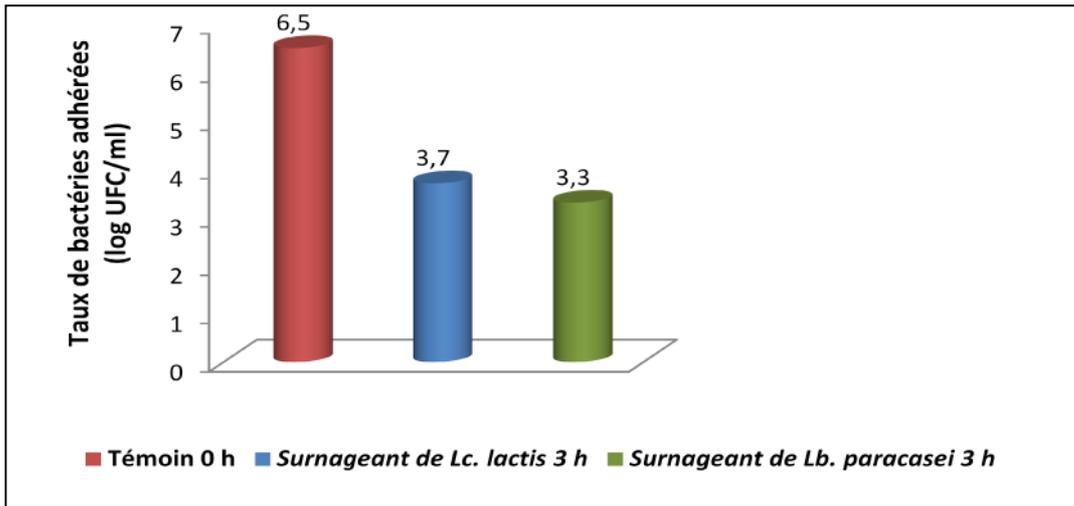


Figure 11. Résultats de l'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* dans la procédure de co-incubation avec les surnageants des LAB

Les résultats du dénombrement montrent une inhibition remarquable de l'adhésion de *S. aureus* avec les deux surnageants des LAB. Le taux d'adhésion n'est que de 0,16% en présence du surnageant de culture de *Lc. lactis* et de 0,06% en présence du surnageant de culture de *Lb. paracasei*.

L'effet inhibiteur de l'adhésion de *S. aureus* apparait non différent entre les deux surnageants testés (taux d'adhésion de 5.10^3 UFC/ml avec le surnageant de *Lc. lactis* et 2.10^3 UFC/ml avec le surnageant de *Lb. paracasei*) après 3 h de contact. Les résultats obtenus pour les tests d'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* en co-incubation sont indiqués dans le tableau IX (annexe I).

II .6. 3 La post –incubation

Après 3 h d'incubation des coupons de téflon en présence de la suspension de *S. aureus* (10^6 UFC/ml), les bactéries adhérees ont été traitées avec chaque surnageant de culture sur une période allant de 30 min à 2 h.

Les résultats du dénombrement des cellules viables détachées par les surnageants de culture au cours des trois périodes de temps testées (30 min, 1 et 2 h) sont représentés dans la **figure 12**.

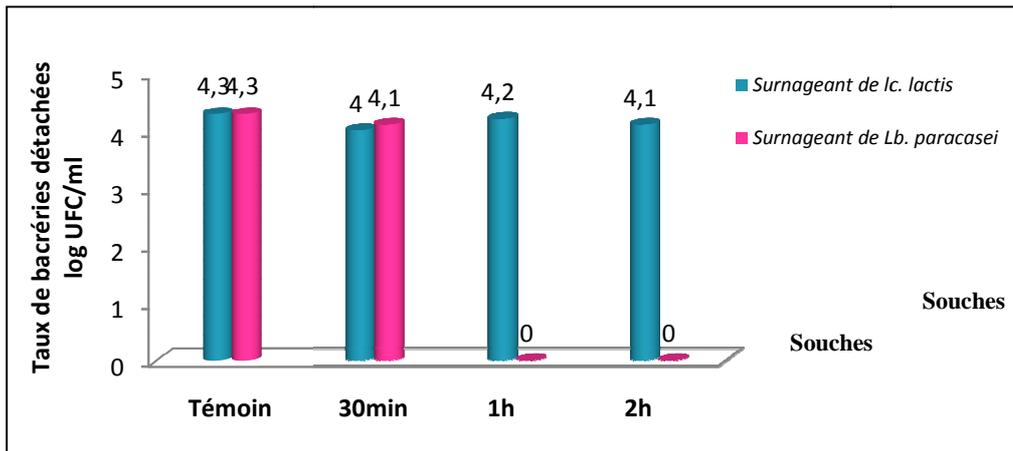


Figure 12: Résultat du détachement de *S. aureus* dans la post-incubation avec les surnageants des LAB.

Les résultats obtenus après traitement avec les deux surnageants de LAB montrent un détachement remarquable (65-80%). L'évolution de l'effet antiadhésif, en fonction de temps de contact (30 min, 1 et 2 h), est différente entre les deux souches lactiques.

- Dans le cas du traitement avec le surnageant de *Lc. lactis*, l'effet antiadhésif augmente au cours du temps : un détachement de 65% des bactéries adhérees est enregistré après 30 min, augmentant à 80% après 1 h et restant stable jusqu'à 2 h.
- Dans le cas du traitement avec le surnageant de *Lb. paracasei*, l'effet antiadhésif est stable tout au long de la période de contact, atteignant 70% après 30 min et restant stable après 1 h et 2 h de contact.

Les résultats obtenus pour les tests d'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* en post-incubation sont indiqués dans le tableau X (annexe I).

II. 7. Discussion générale des tests d'adhésion

Rodrigues et al. (2006) ont montré que la souche *Lc. lactis* 53 possède une capacité d'inhibition de la formation de biofilms sur les prothèses en silicone qui a été liée à la

sécrétion de biosurfactants. En effet, cette souche secrète un biosurfactant qui possède une propriété antiadhésive à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes. Cette propriété dépend de la

Concentration du biosurfactant. Un meilleur effet a été observé vis-à-vis de souches de *S. epidermidis* et de *S. aureus* avec un pourcentage d'inhibition de 70% à une concentration de 2,5 g/l.

L'étude de **Velraeds et al. (1996)** montre qu'il est possible d'utiliser un biosurfactant extrait d'une souche de *Lactobacillus* possédant un effet antiadhésif de souches d'*En. faecalis* et par conséquent de la colonisation des biomatériaux dans les insertion médicale.

D'après **Fracchia et al. (2010)**, un biosurfactant produit par des lactobacilles peut réduire l'adhésion des bactéries pathogènes sur différents matériaux (verre, silicone, téflon, implants chirurgicaux, prothèses). Par conséquent, l'adsorption de ce biosurfactant sur les cathéters et d'autres matériaux médicaux peut être employée comme stratégie préventive afin de retarder la formation d'un biofilm réduisant ainsi l'utilisation d'autres produits chimiques synthétiques.

Gudina et al. (2010), de leur part, ont montré que le biosurfactant produit par *Lb. paracasei* A20 possède une activité antiadhésive vis-à-vis de plusieurs souches pathogènes à des taux d'inhibition différents : *Streptococcus sanguis* (72,9%), *S. aureus* (76,8%), *S. epidermidis* (72,9%) et *Streptococcus agalactiae* (66,6%).

Fontana et al. (2006) affirment que l'adhésion de trois bactéries pathogènes testés (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *En. faecalis*) a été significativement inhibée sur les cathéters préalablement traités par la nisine (une bactériocine produite par la souche de *Lc. lactis*).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail, réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie du lait et des probiotiques (MLP), avait pour but d'étudier l'effet antibactérien de deux souches de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*) à l'égard de trois souches de bactéries pathogènes (*S. aureus*, *En. faecalis* et *P. aeruginosa*). Cette étude a visé également l'exploitation du potentiel d'adhésion de ces trois agents pathogènes sur un support abiotique (Téflon) et leur inhibition par des métabolites secrétés dans le surnageant des deux bactéries lactiques.

De plus, la résistance des souches utilisées a été testée envers quelques antibiotiques. Les résultats obtenus montrent une multi-résistance des trois souches pathogènes aux antibiotiques testés tels que la Vancomycine et la Pénicilline témoignant d'une grande virulence.

La mise en évidence de l'activité inhibitrice des deux souches lactiques en milieu gélosé vis-à-vis des trois souches pathogènes a été réalisée par les tests de spots et de puits.

Les résultats enregistrés avec le test des spots montrent une activité antibactérienne des deux souches lactiques (*Lc. lactis* et *Lb. paracasei*) à l'égard de *P. aeruginosa* et *En. faecalis* avec un diamètre allant de 6 à 20 mm. Alors qu'aucun effet n'a été observé à l'égard de *S. aureus*. La meilleure activité a été notée avec la souche de *Lc. lactis* à l'égard de *P. aeruginosa*. Cependant, l'activité n'a pas pu être détectée dans les surnageants de culture (test des puits).

La capacité d'adhésion des souches pathogènes sur le téflon a été testée avec deux milieux différents (TS et BN) pendant 3 et 6 h à un taux initial de 10^6 UFC/ml. Après 6 h de contact, *P. aeruginosa* a montré une forte capacité d'adhésion (22,05%) suivi de *S. aureus* (12%) et d'*En. faecalis* (6,6%). Une meilleure adhésion a été obtenue en présence du BN au lieu du TS se qui démontre l'influence du milieu d'adhésion.

Le test d'inhibition de l'adhésion des trois souches pathogènes a été effectué suivant trois procédures différentes. L'utilisation des surnageants lors de la procédure de la pré-incubation a montré une inhibition importante avec les trois souches. À partir d'un taux initial de 10^6 UFC/ml, le taux de bactéries adhérentes après 3 h de contact est en moyenne de 4% pour les trois souches. L'utilisation d'un surnageant concentré 3 fois montre un effet meilleur

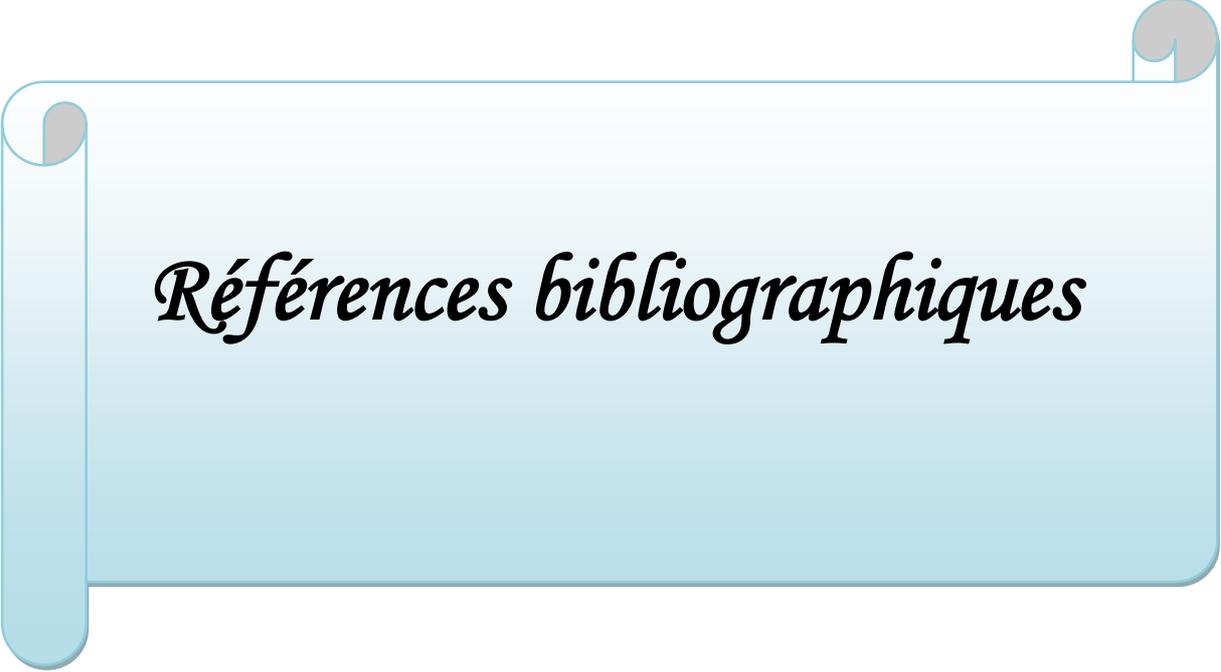
sur l'inhibition de l'adhésion de *S. aureus* dans cette procédure, l'adhésion de *S. aureus* est diminué de 10^4 UFC/ml avec le surnageant non concentré à 10^3 UFC/ml avec le surnageant concentré.

L'utilisation du surnageant de *Lb. paracasei* dans la co-incubation a montré un meilleur effet antiadhésif sur *S. aureus* (seulement 0,06% ont pu adhérer) par contre, dans le cas *Lc. lactis*, le taux d'adhésion est de 0,16% après 3 h de contact.

La post-incubation est effectuée dans le but de détacher les bactéries adhérees au téflon. L'effet inhibiteur du surnageant de *Lb. paracasei* s'est manifesté après 30 min de contact et est resté stable au delà (1 h). Tandis que, l'effet du surnageant de *Lc. lactis* a été plus important après 1 h de contact.

Cette étude étant la première réalisée au niveau du laboratoire, elle reste donc préliminaire. Des études plus approfondies doivent être envisagées, parmi elles :

- Répétition des tests et étude de la signification des résultats obtenus (étude statistique).
- Détermination des propriétés de la surface du téflon et des souches bactériennes.
- Etude de l'adhésion sur plusieurs supports de différente nature et comparaison avec le téflon.
- Détermination de la nature des métabolites antibactériens secrétés par les deux souches lactiques et étude de leur effet antiadhésif.
- Etude de l'effet antibactérien de ces souches lactiques sur des biofilms formés sur téflon.



Références bibliographiques

References bibliographiques

A

- Ait belgnaoui A. (2006). Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de Doctorat de Qualité et Sécurité des Aliments. INRA, Toulouse. 153p.
- Allouche FN, Hellal A et laraba A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Rev. Nat. Technol.* pp 13-20.
- Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food control* .**17**, 454-461.
- Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M et Mikelsaar M. (2003). Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 403-412.
- Arnold JW et Bailey GW. (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult Sci.* **79**(12), 1839-1845.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H. (1992). Bacteriologie clinique. Ellipse. Pp 9-21.

B

- Busscher H J, et Weerkamp AH. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(5), 980-983.
- Bellon- Fontaine MN et Cerf O. (1991). Mechanisms of microorganism adhesion to surfaces : factors influencing the adhesion. *J. Indust. Agro. Alim.* **108**, 13-17.
- Beloin C. et Roux A. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* **322**, 249-289.
- Bendali F, Gaillard-Martinie B, Hebraud M, Sadoun D., 2008. Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT Food Sci Technol.* **41**,1784–92.

- Bogaard VD, London N, Driessen C et Stobberingh EE. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 763-771.
- Boris S, et Barbes C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infections.* **2**(5), 543-546.
- Boris S, Suarez J, Vazques F, et Barbes C. (1998). Adherence of Human vaginal Lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* **66**(5), 1985-1989.
- Boskey E, Cone R, Whaley K, et Moench T. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction.* **16**(9), 1809-1813.
- Boutaleb N. (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de Doctorat de chimie. Université de Bretagne-Sud, France. pp153.
- Bremer PJ, Fletcher GC et Osborne C. (2004). *Staphylococcus aureus*. New Zealand Institut for Crop et Food Research Limited.

www.apothicom.org/Backoffice/ActuFolder/docs/4bfcbe807953.pdf. (accessed 08.04.2012)

- Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, EL Haloui NE, et Attarassi B. (2009). Facteurs de violence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Tunis. Infectiol.* **2**, 7-14.
- Brooun A, Liu S et Lewis K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**, 640-6.

C

- Carpentier B, et Cerf O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 499-511.
- Clutterbuck AL, et Woods EJ. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* **121**,(1-2), 1-17.
- Collins JW, La Ragione MJ, Woodward LE, et Searle J. (2009). Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. *Preb. Prob. Scien. Technol.* pp. 1123-1192.
- Costerton JW. (1999). Introduction to biofilm. *In J Antimicrob Agents.* **11**(4), 217-221.

- Costerton Z, Lewandowski DE, Caldwell DR, Korber HM, et Lappin-Scott. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Reviv. Microbiol.* 49, 711-745.

D

- Davey ME, et O'Toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847-867.
- Dellaglio F, De Roissart H, Torriani S, Curk M, et Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques, p. Lorica, Grenoble, France. pp25-116.
- Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et Baldassarri L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett.* **256**, 145–150.
- Djidel A. (2007). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sur jus de datte : Cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. Thèse de Doctorat de Génie Chimique. Institut National Polytechnique de Lorraine. pp 217.
- Donlan RM. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* **8**(9), 881-890.
- Donlan, R M et Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(2), 167-193.
- Doumandji A, Hellal A et Saidi N. (2010). Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus*. *Microb. Indust. San. Environ.* **4**(2), 25-47.

E

- Elmoualdi L, Labioui H, Boushama L, Benzakour A, Ouhssine M et El yachioui M. (2008). Activité bactéricide d'une de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux. **147**,7-18.
- Elsner HA, sobottka I, Mack D, Laufs R, Claussen M. et Wirth R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Euro J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 39-42.
- Ennahar S, et Deschamps N. (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 449-457.

F

- Felten A, Barreau C, Bizet C, Lagrange PH et Philippon A. (1999). *Lactobacillus species* identification, H₂O₂ production, antibiotic resistances and correlation with human clinical status. *J. Clin. Microbiol.* **37**(3), 729-733.
- Filloux A et Vallet I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine Sciences* .**19**, 77-83.
- Flemming HC, Wingender J, Moritz R, Borchard W, et Mayer C. (1999). Physico-chemical properties of biofilms. Short review, Biofilms in the aquatic environment. Edt The Royal Society of Chemistry. pp 1-12.
- Fontana M, de Bastos M, et Brandelli A. (2006). Pep 5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Curr. Microbiol.* **52**, 350-353.
- Foster T J, et Hook M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**,484-488.
- Fox, LK, Zadoks RN, et Gaskins CT. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* **107**, 295-299.
- Fracchia L, Cavallo M, Allegrone G, et Martinotti MG. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Tech. Edu. Topics. Appl. Microbiol. Micr Biotech.* 827-837.

G

- Giraffa G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 215-222.
- Goller CC,et Romeo T .(2008). Environmental influences on biofilm development. *Curr Top Microbiol Immunol.* **322**, 37-66.
- Grasteau A. (2011). Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Thèse de Doctorat en médecine vétérinaire. Université de Montréal. pp111.
- Gudina J, Teixeira A, et Rodrigues LR.(2009). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* A20. *Appl. Microbiol.* **50**, 419-424.
- Guiga W, Chollet E, Galland S, Peyrol E, Carnet- Pantiez A et Sebti I. (2007). Films plastiques antimicrobiens : caractérisation et modélisation de la désorption de la nisine. Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire, Université Claude Bernard, Lyon. *Microbiol. Immunol.* **322**, 107-131.

H

- Habimana O, Le Goff C, Juillard V, Bellon-Fontaine MN, Buist G, Kulakauskas S et Briandet R. (2007). Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *Curr. Microbiol.* **7** (36), 1471-2180.
- Hall-Stoodley L, et Costerton JW. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* **2**(2), 95-108.
- Hamadi F, Latrache H, Mliji E, Mallouki B, Mbrouki, M et Ellouali M. (2009). Adhésion de *Staphylococcus aureus* au verre et au téflon. *Microbiol. Indust. San. Environ.* **3**(1), 1-6.
- Hechard Y, et Sahl HG. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie.* **84**, 545-557.

I

- Irie Y, et Parsek MR. (2008). "Quorum sensing and microbial biofilms." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 67-84.
- Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H et Toba T. (2003). The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychotrophic food-borne pathogens. *Curr. Microbiol.* **47**, 231-236.
- Izquierdo Alerge E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité. Thèse de Doctorat de Chimie Analytique. Université de Strasbourg. pp140.

J

- Jucker BA, Harms H, et Zehnder AJB. (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J. Bacteriol.* **178**, 5472-5479.
- Juillard V, Spinnler HE, Desmazeaud MJ et Boquien CY. (1987). Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait.* **67**, 149-172.

K

- Klaenhammer R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Microbiol. Rev.* **12**, 39-86.
- Klein L, Alain Dufour et Chantal Compère. (2010). De nouvelles voies d'inhibition des biofilms. *Actualités techniques et industrielles.* pp 2-4.

ℒ

- Lahaye E. (2006). Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Thèse de l'Université de Bretagne-Sud. pp 4-6.
- Lammi S. (2011). Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. Mémoire de Magister de Microbiologie Appliquée. Université Mentouri de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine. pp 71.
- Lappin-Scott HM, J.W et Costerton.(1995).Microbial biofilms. Cambridge University Press,Cambridge,England.
www.Liris.cnrs.fr/cnriut08/actes/articles/127.pdf.(accessed 26.04.2012)
- Latrache H, Moses N, Pelletier C, et Bourlioux P. (1994). Chemical and physicochemical nproperties on *Escherichia coli* : Variations among three strains and influence of culture conditions. Colloid Surf B. **2**, 47-56.
- Lewis K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 107-131.
- Lowy FD. (1998). Staphylococcus aureus infections. *Nat. Eng. J. Medec.* **339**(8), 32-520.

ℳ

- Madigan M, Martinko J. (2007). Brock-Biologie des microorganismes.11^{ème} édition. Pearson Education. France. pp1047.
- Mami A, Hamedi AR, Henni JE, Kerfouf A et Kihal M. (2010). Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. Les Technologie De Laboratoire. **5**, (21).
- Mami A, Henni JE et Kihal M. (2008). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy. Food. Sc.* **3**(2) 39-49.
- Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U et Matteuzi D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J. Appl. Microbiol.* **93**(5), 884-893.
- McKenney D, et Hubner J. (1998). The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* **66**(10), 4711-4720.

- Merz A J, et So M. (2000). "Pilus retraction powers bacterial twitching motility." *Nature*. **407**(6800), 98-102.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvailliez M, et Van Eldere J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* : Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Pharmacologie cellulaire et moléculaire*. **126** (8), 305-316.
- Metlef S et Dilmi-Bouras A. (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Nat. Technol.* **1**, 45-53.
- Miller MB, et Bassler BL (2001). Quorum sensing in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**, 165-199.
- Murray BE et Weinstock GM. (1999). Enterococci: new aspects of an old organism. *Proc Assoc Am Physicians*. **111**, 328–334.

N

- Novel G. (1993). Les bactéries lactiques. In : Leveau GY et Bouix M. *Microbiologie industrielle*. (Eds), Techniques et Documentation. Paris. pp170-247.

O

- O'Brien TF. (1997).the global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to manitor and manage it locally. *Clin infect Dis*. **24**,2-8.
- Oliveira, M, Bexiga R, Nunes SF , Carneiro C , Cavaco LM, Bernardo F, et Vilela CL. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* **118**, 133-140.
- Otero M, et Nader-Macias ME. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim. Repro. Sci.* **96**, 35-46.
- O'Toole G A, et Kolter R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**(2), 295-304.
- Otto M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 207-254.

P

- Pace JL, Rupp ME, Finch RG. (2006). Biofilms, Infection, And Antimicrobial Therapy. pp 494.

- Parot S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de Doctorat en Génie des procédés et l'environnement. Institut national polytechnique de Toulouse. pp 9-12.
- Providencia J , Alvaro P , Luis Martinez M, Alberto H, et Evelio J P.(1998). In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**, 382-386.

R

- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, et Gaynes RP. (2000). Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **21**, 510–515.
- Rodrigues LR, Teixeira JA, Van der Mei HC, et Oliveira R. (2006) Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **49**, 78–85.
- Rousseau V. (2004). Evaluation d'oligosaccharides à effet probiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat de Microbiologie et Biocatalyse Industrielle. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse. pp185.

S

- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, et Davies DG. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**, 1140–1154.
- Sauer K, et Camper AK. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **15**, 125-150.
- Schillinger U, et Lucke FK. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1901–1906.
- Seidl K, Goerke C, Wolz C, Dietrich M, Berger B, et Bischoff M. (2008). *Staphylococcus aureus* CcpA Affects Biofilm Formation. *Infect. Immun.* **76**(5), 044–2050.
- Southey J, David G. Davies, et Sauer K. (2005). Characterization of Temporal Protein Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* **187**(23), 8114- 8126.
- Spoering AL et Lewis K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**(23), 6746-6751.

- Spormann AM. (2008). Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 17-36.
- Stiles ME, et Holzapfel WH. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1-29.
- Stoodley PK, et Sauer. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187-209.
- Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Lebos Pavunc A, Habjani K et Matosic S. (2010). Antimicrobial activity-The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotech.* **48**(3), 296-307.
- Sutherland IW. (2001). The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**, 222-227.

T

- Tahara T et Kanatani K. (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 669-677.
- Tamilvanan S, Venkateshan N, Ludwig A. (2008). The potential of lipid- and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. *J. Control. Release.* **128**, 2-22.
- Tomlin K L, et Malott RJ . (2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(9), 5208-5218.
- Triandafillu R. (2003). Physico-chemical aspects of the adhesion and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on unmodified and modified PVC from endotracheal tubes. Thèse de Doctorat. Institut des sciences et technologies de l'environnement. pp 117.
- Trotonda MP, Tamber S, Memmi J et Cheung A L. (2008). MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **76**(12):45-54.

V

- Van der Mei H. C, et Busscher HJ. (2001). Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 491- 494.
- Van Hamme JD, Singh A, et Ward OP. (2006). Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **24**, 604-620.

- Van Merode, Henny C, Annet EJ, van der Mei, Henk J, Busscher, et Bastiaan P. Krom. (2006). Influence of Culture Heterogeneity in Cell Surface Charge on Adhesion and Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **188**(7), 2421–2426.
- Velraeds MM, Van der Mei HC, Reid G, et Busscher HJ. (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1958–1963.

W

- Wang I, Anderson JM, Jacobs MR, et Marchant RE. (1995) Adhesion of *staphylococcus epidermidis* to biomedical polymers: Contributions of surface thermodynamics and hemodynamic shear conditions. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 485-493.

Y

- Yang R, Johnson M et Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3355-3359.



Annexes

Annexes

Annexes I : Partie Pratique

Tableau I. Matériel et appareillage utilisés

Matériels/ Appareils	Photos
Bain marie (Termostatic Bath Raypa). (France).	
Centrifugeuse (Potina 38R, Hettich, Zentrifugeu). (Allemagne)	
Etuves (Allemagne)	
Spectrophotomètre (analytikjena specord 50) (Allemagne).	
Plaque agitatrice (rpm, Heidolph, Vibramax-100) (Allemagne).	
Vortex (vortex-Genic2) (Allemagne).	
Plaque chauffante (velp scientifica). (Europe).	

<p>Four Pasteur (Heraeus GS geprüfte Sicherheit) (Allemagne).</p>	 A photograph of a white Four Pasteur autoclave. A large white paper with text and diagrams is taped to the front of the machine. To the left, a red vertical level is visible.	
<p>pH mètre (Hanna pH 211, Instruments Microprocessor pH Meter) (Mauritius).</p>	 A photograph of a Hanna pH 211 microprocessor pH meter. The device is grey with a small LCD screen and several buttons. It is connected to a red and black electrode probe.	
<p>Balance (Sartorius) (Allemagne).</p>	 A photograph of a yellow Sartorius laboratory balance scale. It features a circular weighing pan on top and a digital display with buttons on the front panel.	

Tableau II. Test de Résistance des souches cibles aux antibiotiques

Antibiotiques	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>P. aeruginosa</i> (mm)	<i>E. faecalis</i> (mm)	Norme (CA-SFM, 2009)
Spiramycine Sp ₁₀₀	20	8	22	≥24 <19
Ampicilline Am ₁₀	22	0	10	>19 <14
Vancomycine Va ₃₀	14	0	16	≥17 -
Amikacine Ak	18	20	0	≥17 <15
Ceftazidine Caz ₃₀	4	6	0	≥21 <15
Cefotaxime Ctx ₃₀	26	8	18	≥21 <15
Erythromycine E ₁₅	20	4	16	≥22 <17
Doxycycline DO ₃₀	30	0	6	≥19 <17
Acide Nalidixique Na ₃₀	14	0	0	≥20 <15
Pefloxacine Pef ₅	26	16	10	≥22 <16
Tétracycline Te ₃₀	24	6	4	≥19 <17
Gentamicine CN ₁₀	24	16	6	≥17 <11
Pénicilline P ₁₀	40	0	20	≥22 <08
Ofloxacine Ofx ₅	26	20	14	≥22 <16
Ciprofloxacine Cip ₅	26	34	14	≥22 <19

Tableau III. Résultats des tests d'adhésion de *S. aureus* au téflon

	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	TS (UFC/ml)	Adhésion (%)	BN (UFC/ml)	Adhésion (%)	Témoin BN (UFC/ml)
0h	3,6. 10 ⁶	0	4,5. 10 ⁶	0	2. 10 ⁶
3h	5,2. 10 ³	0,14	2. 10 ⁴	0,44	/
6h	4,2. 10 ⁵	12	7,2. 10 ⁷	1600	1,5. 10 ⁶

/ : Reincubation avec du BN stérile

3,1.10 ⁶	2,2.10 ⁵	10 ⁶	4.10 ⁴	10 ⁶	6.10 ⁴	10 ⁶	1,4.10 ³	10 ⁶	1,6.10 ³
Adhésion (%)									
0	7,09	0	4	0	6	0	0,14	0	0,16

Tableau VII. Résultat du test de la pré-incubation avec *En. faecalis* (30min dans le surnageant)

<i>Enterococcus faecalis</i>					
Témoin MRS (UFC/ml)		Surnageant non concentré <i>L. lactis</i> (UFC/ml)		Surnageant non concentré <i>Lb. paracasei</i> (UFC/ml)	
0h	3h	0h	3h	0h	3h
3,2.10 ⁶	4,1.10 ⁵	2.10 ⁶	3,4.10 ⁴	2.10 ⁶	7,2.10 ⁴
Adhésion (%)					
0	12,8	0	1,7	0	3,6

Tableau VIII. Résultat du test de la pré-incubation avec *P. aeruginosa* (30min dans le surnageant)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Témoin MRS (UFC/ml)		Surnageant non concentré <i>L. lactis</i> (UFC/ml)		Surnageant non concentré <i>Lb. paracasei</i> (UFC/ml)	
0h	3h	0h	3h	0h	3h
6,8.10 ⁶	9.10 ⁵	1,4.10 ⁶	7,1.10 ⁴	1,4.10 ⁶	4.10 ⁴
Adhésion (%)					
0	13,23	0	5,07	0	2,85

Tableau IX. Résultat du test de la co-incubation avec *S. aureus*

	Surnageant non concentré <i>L. lactis</i> (UFC/ml)	Surnageant non concentré <i>Lb. paracasei</i> (UFC/ml)
0h	3h	3h
3,1.10 ⁶	5.10 ³	2.10 ³
Adhésion (%)		
0	0,16	0,06

Tableau X. Résultat du test du post -traitement avec le surnageant (cas du *S. aureus*)

	Témoin après 3h sans surnageant (UFC/ml)	30min (UFC/ml)	1h (UFC/ml)	2h (UFC/ml)
Surnageant de <i>Lc. lactis</i> (UFC/ml)	2.10⁴	1,3 .10⁴	1,6 .10⁴	1,6.10⁴
Détachement (%)	0	65	80	80
Surnageant de <i>Lb. paracasei</i> (UFC/ml)	2.10⁴	1,4 .10⁴	0	0
Détachement (%)	0	70	0	0

Annexe II : Milieux de culture

Bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe) (IPA)

Composant	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammonique	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillée	Qsp.1L

pH 6,5

Pour milieu gélosé, ajuster 15g/l d'agar.

Bouillon nutritif (BN, IPA)

Composant	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	Qsp.1L

pH 7,2

Pour milieu gélosé, ajuster 15g/l d'agar.

Gélose Muller Hinton (MH, IPA)

Composant	g/l
Extrait de viande	2
Hdrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	10
Eau distillée	Qsp.1L

pH 7,4

Gélose Chapman (IPA)

Composant	g/l
Extrait de viande	1
Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
Agar	15
Eau distillée	Qsp.1L

pH 7,4

Gélose Trypticase Soja Agar (TSA)

Composant	g/l
Hydrolysats enzymatique de caséine	15
Peptone de soja	5
Chlorure de sodium	5
Agar A	12
Eau distillée	Qsp.1L

pH 7,3

Eau physiologique

Composant	g/l
Chlorure de sodium	9
Eau distillée	Qsp.1L

pH 7

Tryptone sel (TS)

Composant	g/l
Tryptone	1
Chlorure de sodium	9
Eau distillée	Qsp.1L

pH 7

Les milieux de culture sont tous autoclavés à 120°C pendant 20min.

Résumé

Cette étude avait pour objectif de tester l'activité antibactérienne de deux souches lactiques (*Lc. lactis* et *Lb. paracasei*) à l'égard de trois souches pathogènes d'origine hospitalière : *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *En. faecalis* et la capacité d'adhésion de ces trois souches pathogènes sur un matériau abiotique (téflon), qui est très utilisé dans le domaine médical. Cette étude a été également menée pour tester l'inhibition de ces derniers par l'interférence possible des métabolites sécrétés par les deux souches lactiques sur cette adhésion. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré que les deux souches lactiques exercent une activité antibactérienne à l'égard de *P. aeruginosa* et *En. faecalis*, mais une inefficacité à l'égard de *S. aureus*. Concernant l'adhésion, les trois souches pathogènes ont montré une forte capacité d'adhésion après 6h de contact (22% pour *P. aeruginosa*, 12% pour *S. aureus* et 6,6% pour *En. faecalis*). Les tests d'inhibition en utilisant les surnageants des deux souches lactiques ont montré un bon pouvoir inhibiteur, des métabolites produits par ces souches, en utilisant trois procédures différentes (Pré-incubation, Co-incubation et Post-incubation). Le taux d'adhésion des bactéries pathogènes a été largement réduit en utilisant le surnageant concentré des deux souches lactiques en pré-incubation avec *S. aureus*.

Mots clés : Biofilm, activité antibactérienne, *Lc. lactis*, *Lb. paracasei*, adhésion, téflon.

Abstract

This study aims to test the antibacterial activity of two lactic strains (*Lc. lactis* et *Lb. paracasei*) against three pathogenic strains of hospital origin: *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *En. faecalis*, and the adhesion potential of these three pathogens into an abiotic material (Teflon), which is usually used in the medical field. This study was also undertaken to test the adhesion inhibition of these pathogens by the possible interference of antibacterial metabolites secreted by the two LAB strains. The results obtained showed that the two lactic acid bacteria have an antibacterial activity against both *P. aeruginosa* and *En. faecalis* but an inefficiency against *S. aureus*. Concerning adhesion, the three pathogens show a strong capacity of adhesion with different percentages after 6 hours: 22% for *P. aeruginosa*, 12% for *S. aureus* and 6,6% for *En. faecalis*. The inhibition tests using the supernatants of the two lactic acid bacteria showed a good inhibiting capacity of the metabolites on different procedures (Pre-incubation, Co-incubation and Post-incubation). The adhesion rate of *S. aureus* strain was highly reduced when using the concentrated supernatant of the two lactic strains in the Pre-incubation procedure.

Keywords: Biofilm, antibacterial activity, *Lc. lactis*, *Lb. paracasei*, adhesion, teflon.