

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

Présenté par
Melle IDIR Fouzia

Pour l'obtention du Diplôme de Magister
Filière : Biologie
Option : Microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes

Thème

Criblage de souches de bactéries lactiques et pathogènes productrices de biofilms sur surfaces en plastique et effets antibactérien et antiadhésif des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes

Soutenu le :

Devant le jury composé de:

Noms et Prénoms

Grade

Mme SADOUN D.

Professeur

Univ. de Béjaia

Présidente

Melle BENDALI F.

MCA

Univ. de Béjaia

Promotrice

Mme BEDJOU F.

Professeur

Univ. de Béjaia

Examinatrice

Mr OUCHEMOUKH S.

MCA

Univ. de Béjaia

Examineur

2013 -2014

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements tous d'abord au «Bon Dieu» de m'avoir offert la force et la santé qui m'ont été indispensables tout au long de mon parcours.

Aux membres de jury, la présidente Pr. Mme SADOUN D., et les examinateurs Pr. Mme BEDJOU F. et Dr. Mr OUCHEMOUKH S. pour l'honneur qu'ils me font en examinant ce mémoire et pour le temps et l'attention qu'ils ont bien voulu consacrer à ce travail.

A ma promotrice Dr. BENDALI F. pour ses orientation, ses conseils éclairés, ses encouragements et pour la confiance qu'elle m'a témoigné.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe de Microbiologie du Lait et des Probiotiques (Laboratoire de Microbiologie Appliquée) qui m'ont permis de réaliser ce travail avec un grand esprit d'équipe et dans une bonne ambiance.

Enfin, finalement il m'est agréable d'adresser mes remerciements à tous les chercheurs et les ingénieurs du laboratoire pour leur aide, leur optimisme et leurs encouragements.



Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce travail A :

Mes très chers parents qui m'ont appris la patience et le courage

Mes très chères sœurs : Farida, Chahra et Yasmine

Mes deux frères : Sofiane et Nadir

Mon adorable petite nièce : Chaima

Mes chers amis et camarades du laboratoire et de la promotion de Post-

Graduation 2012-2013

Tous ceux que je n'ai pas cité et qui m'ont pourtant aidé

Fouzia

Liste des abréviations

A: Absorbance

ADN: Acide désoxyribonucléique

AHL: Acyl homosérine lactone

AIP: Autoinducing peptides

ANOVA: Analysis of Variance

ARN: Acide ribonucléique

BN: Bouillon nutritif

E.: *Escherichia coli*

EHEC: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

En.: *Enterococcus*

EPS: Exopolymeric substances

L.: *Listeria*

Lb.: *Lactobacillus*

Lc.: *Lactococcus*

LPS: Lipopolysaccharide

LSD: Least Significant Difference

MRS: de Man Rogosa et Sharpe

PCR: Polymerase chains reaction

PIA: Polysaccharidic intercellular Adhesin

QS: Quorum sensing

S.: *Staphylococcus*

SLP: Surface layer proteins

St.: *Streptococcus*

TS: Tryptone sel

TSA: Trypticase soy Agar

TSB: Trypticase soy broth

VRBL: Violet crystal, neutral red, bile, lactose

YE: Yeast extract

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm.....	3
Figure 2 : Système par paire auto-inducteur/détecteur (LasI/ LasR) chez <i>P. aeruginosa</i>	8
Figure 3 : Schéma de la paroi des bactéries: A) à Gram négatif, B) à Gram positif	14
Figure 4 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	20
Figure 5 : Photographies de biofilms dans des puits de microplaques en polystyrène de 96 puits. (A): après 24 h d'incubation à 30°C, (B): après coloration au cristal violet	33
Figure 6 : Résultats du pré-criblage des souches lactiques quant à leur capacité d'adhésion sur microplaques en polystyrène (Lb.: Lactobacilles; Lc.: Lactocoques; En.: Entérocoques; F1 et F2 : Première et deuxième ferme d'exploitation laitières). Du bouillon TSB-YE est inclus en tant que témoin négatif.....	34
Figure 7 : Résultats du pré-criblage de souches pathogènes quant à leur capacité d'adhésion sur microplaques en polystyrène (Ps: <i>Pseudomonas</i> ; Sl: <i>Salmonella</i> ; E: <i>Escherichia coli</i> ; SA: <i>Staphylococcus aureus</i> ; F1, F2: Première et deuxième ferme d'exploitation laitière. Du bouillon TSB est inclus en tant que témoin négatif.....	37
Figure 8 : Résultats du deuxième criblage des 30 souches lactiques pré-criblées. Du bouillon TSB-YE est inclus en tant que témoin négatif.....	39
Figure 9 : Résultats du deuxième criblage des 30 souches pathogènes pré-criblées. Du bouillon TSB est inclus en tant que témoin négatif.....	41
Figure 10 : Cinétique de formation de biofilms par les cinq souches lactiques sur la surface interne de tubes en polypropylène durant six jours d'incubation. a) sans renouvellement du milieu de culture, b) avec renouvellement du milieu de culture tout les deux jours d'incubation.....	44
Figure 11 : Cinétique de formation de biofilms par les cinq souches pathogènes sur la surface interne de tubes en polypropylène durant six jours d'incubation. a) sans renouvellement de milieu de culture, b) avec renouvellement de milieu de culture tout les deux jours d'incubation.....	47
Figure 12 : Inhibition de l'adhésion de cinq souches pathogènes par les biofilms de 24 h des cinq souches lactiques.....	50

Figure 13 : Test de l'activité antibactérienne des cinq souches lactiques (1: Lb2F2; 2: Lb3F2; 3: Lb4F2; 4: Lb7F2; 5: Lb9F2) à l'égard des souches pathogènes (A partir de la flèche et suivant les aiguilles d'une montre on a : SA9F2; S11F2; S14F2; E10F2; Ps1F2). (A : surnageant brute issu du bouillon TSB-YE, B : surnageant brute et neutralisé issu du bouillon MRS).....54

Figure 14 : Résultats du test de l'effet antiadhésif des surnageants de culture des cinq souches lactiques à l'égard des cinq souches pathogènes, a) après conditionnement des tubes en polypropylène avec le surnageant de culture de chacune des souches lactiques issu du bouillon TSB-YE, b) en présence de 50 % de bouillon TSB-YE et de 50 % du surnageant de culture de chaque souche lactique issu du bouillon TSB-YE.L'adhésion de la souche pathogène en absence du surnageant de culture de la souche lactique représente le témoin négatif.....58

Liste des tableaux

Tableau I : Taux d'augmentation (log UFC/ml) de l'adhésion des souches lactiques après renouvellement du milieu de culture (tous les deux jours d'incubation).....45

Tableau II : Taux d'augmentation (log UFC/ml) de l'adhésion des souches pathogènes après renouvellement du milieu de culture (tout les deux jours d'incubation).....48

Tableau III : Taux de diminution (log UFC/ml) de l'adhésion des souches pathogènes en présence des souches lactiques.51

Tableau IV : Valeurs du pH des surnageants de culture des souches lactiques, dans les bouillons MRS et TSB-YE, obtenus après 18 h d'incubation à 30°C.....55

Liste de tableaux en annexes

Annexe 1: Codes et caractéristiques des souches utilisées dans cette étude

Tableau I:Souchesde bactéries lactiques isolées de la première et de la deuxième ferme d'exploitation laitière

Tableau II: Souches pathogènes isolées de la première et de la deuxième ferme d'exploitation laitière

Annexe 2 : Composition des milieux de culture (Selon fournisseurs)

Tableau I: Bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe, pH 6,5)

Tableau II: Bouillon TSB-YE (Trypticase-Soy Broth- Yeast Extract, pH 7)

Tableau III: Solution TS (Tryptone-Sel, préparée au laboratoire)

Tableau IV: Gélose Chapman (pH 7)

Tableau V: Gélose nutritive (pH 7)

Tableau VI: Milieu Hektoen (pH = 7,6)

Tableau VII: Milieu VRBL (pH 7,4)

Annexe 3 : Conditions de culture appropriées pour dénombrement sélectif des souches pathogènes

Tableau I: Milieu de culture, température et durée d'incubation utilisées pour chacune des cinq souches pathogènes

Sommaire

Sommaire

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

Partie bibliographique

Chapitre I : Biofilms

1. Définition.....	3
2. Etapes de formation sur surfaces abiotiques.....	3
2.1. Adhésion primaire réversible et non spécifique.....	4
2.2. Adhésion permanente irréversible et spécifique.....	4
2.3. Formation de micro-colonies et sécrétion de la matrice extracellulaire	4
2.4. Maturation.....	5
2.5. Dispersion.....	5
3. Facteurs influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces abiotiques.....	6
3.1. Propriétés de la surface abiotique.....	6
3.2. Propriétés de la surface cellulaire.....	6
3.3. Propriétés du milieu environnant.....	7
4. <i>Quorum Sensing</i> : régulation de la formation des biofilms.....	8
4.1. Chez les bactéries à Gram négatif.....	8
4.2. Chez les bactéries à Gram positif.....	9
5. Biofilms dans l'industrie agroalimentaire.....	9
5.1. Biofilms « négatifs ».....	10
5.2. Biofilms « positifs».....	12
6. Capacité des bactéries à former des biofilms : Composition et structure de la surface cellulaire.....	13
6.1. Peptidoglycane.....	15
6. 2. Acides teichoïques et lipoteïchoïques.....	15
6.3. Polysaccharides pariétaux.....	15
6.4. Protéines.....	16
6.5. Lipopolysaccharides (LPS).....	16
6.6. Appendices de surface.....	16

Chapitre II : Bactéries lactiques

1. Définition et caractères généraux.....	19
2. Taxonomie.....	19
3. Caractéristiques des principaux genres.....	21
3.1. <i>Lactobacillus</i>	21
3.2. <i>Lactococcus</i>	21
3.3. <i>Enterococcus</i>	22
4. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	22
4.1. Acides organiques.....	22
4.2. Peroxyde d'hydrogène.....	22
4.3. Dioxyde de carbone.....	23
4.4. Bactériocines	23
5. Propriétés antiadhésives des bactéries lactiques.....	24
5. 1. Bactériocines.....	24
5. 2. Bio-surfactants.....	24
5. 3. Exopolysaccharides.....	25

Partie pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Criblage de souches de bactéries lactiques et de bactéries pathogènes quant à leur pouvoir d'adhésion sur des surfaces en polystyrène (méthode des microplaques).....	26
1.1. Origine des souches utilisées.....	26
1.2. Revivification et vérification de la pureté des souches utilisées.....	26
1.3. Premier criblage : Etude de la capacité d'adhésion (de formation de biofilm) des souches lactiques et des souches pathogènes sur microplaques en polystyrène	27
1.4. Deuxième criblage : Sélection des meilleures souches adhérentes (lactiques et pathogènes).....	28
2. Identification génotypique des souches lactiques sélectionnées.....	28
3. Cinétique de formation de biofilms des souches (lactiques et pathogènes) criblées (Méthode des tubes).....	30
3.1. Formation de biofilms sur la surface interne de tubes en polypropylène.....	30
3.2. Dénombrement des cellules adhérentes.....	30

4. Effet barrière des souches lactiques criblées sur l'installation de biofilms de bactéries pathogènes.....	31
5. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antiadhésive (anti-biofilm) des souches lactiques criblées.....	31
5. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	31
5. 2. Mise en évidence de l'activité antiadhésive (anti-biofilm).....	32
6. Analyse statistique.....	32

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Premier criblage : Etude de la capacité d'adhésion (de formation de biofilms) de souches de bactéries lactiques et de bactéries pathogènes sur microplaques en polystyrène.....	33
1. 1. Capacité d'adhésion des souches lactiques.....	33
1. 2. Capacité d'adhésion des souches pathogènes.....	35
2. Deuxième criblage : Sélection des meilleures souches adhérentes.....	38
2. 1. Souches lactiques.....	38
2. 2. Souches pathogènes.....	40
3. Cinétique de formation de biofilms des souches criblées (méthode des tubes).....	42
3. 1. Souches lactiques.....	42
3. 2. Souches pathogènes.....	46
4. Effet barrière des souches lactiques sur l'installation de biofilms de bactéries pathogènes.....	50
5. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antiadhésive (anti-biofilm) des souches lactiques criblées.....	53
5. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	53
5. 2. Mise en évidence de l'activité antiadhésive (anti-biofilm).....	56
Conclusion	59

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de microorganismes à la surface des dents (**Donlan, 2002**). La vie en biofilms permet aux bactéries de créer leurs propres niches écologiques et ainsi pouvoir se protéger contre les conditions environnementales défavorables et renforcer les mécanismes d'accès aux nutriments (**Roszak et Cowell, 1987**).

Les biofilms microbiens, lorsqu'ils sont constitués de bactéries pathogènes ou d'altération, peuvent avoir des conséquences considérables dans le secteur agro-alimentaire, tant sur le plan économique que sanitaire. En effet, la consommation d'aliments ayant été en contact direct avec des microorganismes pathogènes peut entraîner des troubles digestifs allant jusqu'au décès du consommateur.

Les bactéries sous forme de biofilms sont 10 à 1000 fois plus résistantes à l'action des agents antimicrobiens que celles sous forme planctonique (en suspension). Plusieurs stratégies ont été adoptées pour prévenir la formation de ces biofilms sur les surfaces abiotiques comme l'utilisation de détergents et de désinfectants couplés à des méthodes physiques. Cependant, des études ont montré que les bactéries exposées, à plusieurs reprises, à des concentrations sub-létales de désinfectants, peuvent acquérir une résistance à ces produits, suite à une ou plusieurs mutations. De plus, les biofilms possèdent la possibilité de détoxification des substances toxiques, par l'action combinée d'enzymes présentes en forte teneur au sein de la matrice exo-polysaccharidique (**Anwar et Costerton, 1992**).

L'utilisation d'une « flore barrière » peut prévenir l'implantation de la flore pathogène ou d'altération sur les supports abiotiques. De nombreuses études ont rapporté la capacité des bactéries lactiques à former des biofilms sur différents matériaux (**Rodriguez et al., 2006; Kubota et al., 2008; Seneviratne et al., 2013**), ces biofilms pourraient, entre autres prévenir l'installation de biofilms de bactéries pathogènes (**Guerrieri et al., 2009**). Cet effet antiadhésif est notamment attribué à la production de bactériocines par ces bactéries lactiques (**Winkelströter et al., 2011**). De plus, la production de biosurfactants intervient dans le détachement des bactéries au sein d'un biofilm, permettant ainsi de le déplacer (**Gudin et al., 2010**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a comme objectif dans un premier temps de cribler des souches lactiques et des souches pathogènes faisant partie de la collection

des souches du laboratoire de microbiologie appliquée, capables d'adhérer et de former des biofilms sur des surfaces en plastique. Dans un deuxième temps, de tester la capacité des biofilms formés par les souches lactiques à empêcher l'adhésion des souches pathogènes.

Pour ce faire, une synthèse bibliographique relative au phénomène "biofilm" avec des notions sur les bactéries lactiques est présentée dans ce document, suivie par la description de la partie matériel et méthodes et enfin les résultats obtenus sont illustrés, accompagnés de leur discussion et des principales conclusions auxquelles ils nous ont amenés.

Synthèse bibliographique

Chapitre I
Biofilms

1. Définition

Le terme « biofilm » a été proposé pour la première fois en 1978 par **John William Costerton** et ses collaborateurs et définis comme étant des populations de bactéries, adhérents les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces et englobées dans une matrice. Depuis, la notion de biofilm n'a cessé d'évoluer en fonction des avancements des travaux visant la compréhension profonde de ce phénomène (**Costerton et al., 1978**).

Actuellement, un biofilm est considéré comme une communauté microbienne sessile composée de cellules irréversiblement attachées à une surface ou interface, contenue dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par elles mêmes, et présentant un phénotype modifié concernant le taux de croissance et la transcription des gènes (**Lazar, 2011**).

2. Etapes de formation sur surfaces abiotiques

Les étapes de formation d'un biofilm sont schématisées sur la figure 1.

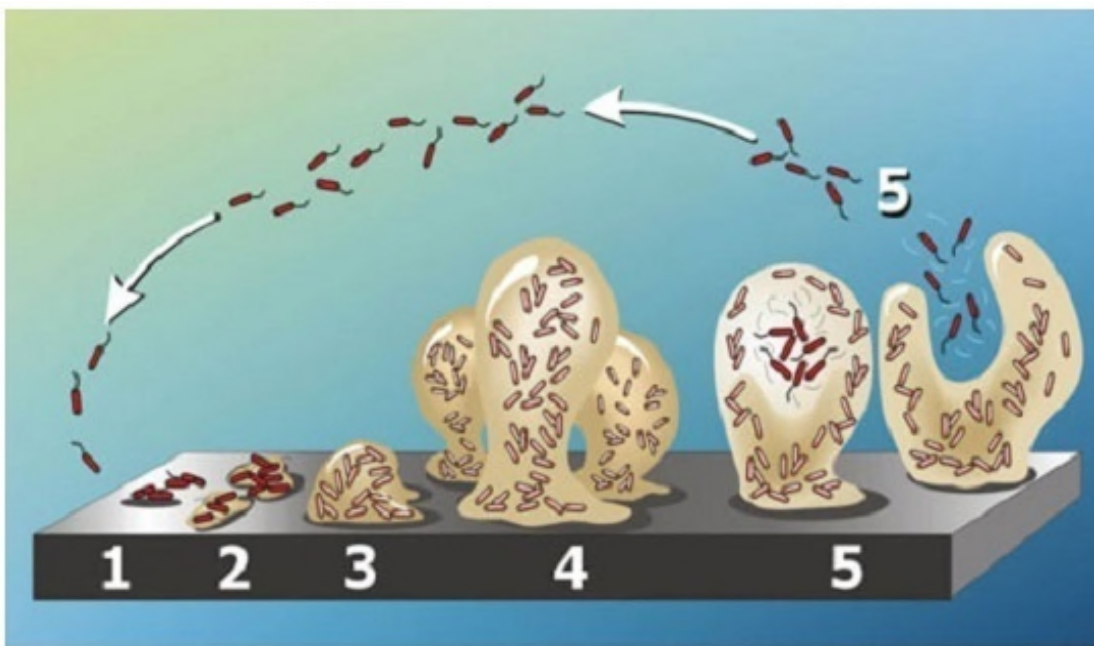


Figure 1: Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm. Étape 1 : adhésion initiale (réversible); étape 2 : adhésion permanente (irréversible); étape 3 : formation de microcolonies et sécrétion de la matrice extracellulaire; étape 4: maturation du biofilm et étape 5 : dispersion des cellules (**Stoodley et al., 2002**).

2. 1. Adhésion primaire réversible et non spécifique

La formation d'un biofilm débute d'abord par le conditionnement de la surface qui s'amorce souvent par une adsorption non spécifique de molécules organiques et d'ions présents dans le milieu modifiant certaines de ses propriétés. Ce film de conditionnement influence la vitesse et la qualité de l'attachement des bactéries aux surfaces (**Ganesh Kumar et Anand, 1998**). Cette adhésion réversible est caractérisée par l'adsorption faible des cellules bactériennes sur la surface par des liaisons chimiques non covalentes. Ces liaisons sont de type Van der Waals, électrostatique et hydrophobe (**Costerton et al., 1981**).

2. 2. Adhésion permanente irréversible et spécifique

Cette adhésion stable est rendue possible par la sécrétion de polymères extracellulaires formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface (**Bellon-Fontaine et Cerf, 1991**). Ces exopolymères permettent de maintenir le biofilm assemblé tout en le protégeant contre les biocides et certaines conditions de vie défavorables (hautes températures, séchage). En plus, il agit comme un système d'échange d'ions afin de concentrer les nutriments pour la multiplication des cellules (**Dreeszen, 2003**). Dans cette étape, les interactions mises en jeu sont de types ioniques, hydrogènes, covalentes et hydrophobes (**Ganesh Kumar et Anand, 1998**).

2. 3. Formation de microcolonies et sécrétion de la matrice extracellulaire

Les micro-organismes se divisent en formant des microcolonies. À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, ils commencent la sécrétion de la matrice extracellulaire. Ces micro-organismes sont englobés dans un matériel adhésif et mucoïde (**Kodjikian et Burillon, 2003**). Selon l'espèce impliquée, une microcolonie peut se composer de 10 à 25 % de cellules microbiennes et de 75 à 90 % de la matrice exopolysaccharidique (**Costerton, 1999**).

Chez *Staphylococcus*, l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) contrôle l'adhésion intercellulaire et est ainsi responsable de l'accumulation des bactéries en microcolonies et de la maturation du biofilm (**McKenney et Hubner, 1998**). A titre d'exemple, une étude sur 179 souches de *Staphylococcus epidermidis* a montré une corrélation positive significative entre la capacité de production de biofilm et l'expression de la PIA; 86,8 % des

souches de *S. epidermidis* productrices de biofilm exprimaient la PIA. En revanche, 88,6 % des souches ne produisant pas de biofilm n'exprimaient pas cette adhésine qui semble ainsi essentielle dans la formation du biofilm par *S. epidermidis* (Mack, 1999).

2. 4. Maturation

Le biofilm grandit et mûrit, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimales. La maturation du biofilm est divisée en deux phases ; la première phase est marquée par des régulations importantes de gènes, 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. La seconde phase est marquée par des synthèses protéiques (Clutterbuck *et al.*, 2007).

La communication intercellulaire (*quorum sensing*) est également indispensable lors de la formation et la maturation du biofilm (Irie et Parsek, 2008). Des études ont montré que les appendices de surface, nécessaires dans l'étape initiale de l'adhésion de micro-organismes aux surfaces, avaient tendance à disparaître lors de l'étape de maturation du biofilm, laissant place à d'autres déterminants qui permettent la structuration et le maintien du biofilm (Costerton, 1995; Filloux et Vallet, 2003).

2. 5. Dispersion

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur. Cette dernière étape se produit lors du vieillissement du biofilm, ou lors de certains stress ou carences. Davey (2003) a également rapporté que la production de biosurfactants (rhamnolipides) pourrait aussi favoriser la dispersion des cellules de la matrice du biofilm.

La dispersion des cellules du biofilm mature pourrait aussi être sous l'influence du système de communication intercellulaire où une augmentation de la concentration en molécules inductrices serait responsable de la régulation de la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (lyase) (Stoodley *et al.*, 2002).

3. Facteurs influençant l'adhésion des bactéries aux surfaces abiotiques

3. 1. Propriétés de la surface abiotique

La surface abiotique possède plusieurs caractéristiques importantes dans le processus d'adhésion. En général, les bactéries adhèrent davantage sur des surfaces rugueuses en raison d'une plus grande surface de contact disponible (**Donlan, 2000**). Cependant, plusieurs auteurs contredisent cette corrélation entre la rugosité d'une surface et la colonisation bactérienne. Aucune relation dans l'étude de **Mafu et al. (1990)** n'a pu être démontrée entre les irrégularités de plusieurs surfaces testées (verre, polypropylène, acier inoxydable, caoutchouc) et l'adhésion de *Listeria monocytogenes* Scott A. Toutefois, certains chercheurs ont démontré que l'adhésion de *S. aureus* diminuait sur des surfaces lisses (**Allion et al., 2006**).

Les propriétés physico-chimiques ainsi que la nature de la surface exercent aussi une forte influence sur l'adhésion des bactéries. Ces dernières semblent s'attacher plus rapidement sur des surfaces hydrophobes non polaires telles que le téflon et autres plastiques que sur les surfaces hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Ganesh Kumar et Anand, 1998**).

Une autre caractéristique importante favorisant l'adhésion sur la surface d'un support est la présence du film de conditionnement concentré en cations (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ...) (**Sheng et al., 2007**). En effet, toute surface exposée à un milieu humide deviendra recouverte d'une pellicule formée de polymères et de molécules organiques du milieu et cette modification physico-chimique affectera la vitesse et l'extension de l'adhésion microbienne (**Ganesh Kumar et Anand, 1998**).

3. 2. Propriétés de la surface cellulaire

Tout comme la surface du support, la surface des bactéries joue un rôle important sur l'adhésion. Généralement, les membranes bactériennes ont une charge négative nette. De plus, l'intensité de cette charge peut varier d'une espèce à l'autre, voir même entre les souches elles-mêmes. Ce paramètre est par ailleurs influencé par les conditions de croissance (**Chmielewski et Frank, 2003**).

L'hydrophobicité de la surface bactérienne est aussi reconnue comme un facteur déterminant dans l'adhésion microbienne sur les surfaces inertes (**Briandet et al., 1999**). Les molécules de surface semblent être impliquées au niveau de l'adhésion initiale, les flagelles, les *fimbriae* et les pilis contribuent à l'hydrophobicité de la surface puisque la majorité contiennent

une haute proportion d'acides aminés hydrophobes (**Costerton et al., 1981**). Plusieurs recherches ont démontré que les *fimbriae* jouaient un rôle important lors des étapes précoces de l'attachement en surmontant la répulsion électrostatique qui existe entre la cellule et la surface (**Donlan, 2000**). Finalement, les lipopolysaccharides (LPS) retrouvés au niveau des bactéries à Gram négatif sont aussi reconnus comme molécules impliquées au niveau de l'adhésion de ces bactéries (**Caro et al., 2005**).

La capacité des bactéries à produire des Substances polymériques extracellulaires "Exo-Polymeric Substances" ou EPS est également un facteur important qui favorise leur adhésion aux supports. Les EPS sont des polymères organiques produits par les bactéries, et qui sont surproduits en général en réponse à un stress environnemental. Dans les biofilms, ces polymères sont responsables de la cohésion des cellules au support (**Ganesh Kumar et Anand, 1998**).

Les EPS sont composées d'une grande variété de macromolécules de haut poids moléculaire tels que des polysaccharides (75 à 90 % de la masse), des protéines, des acides nucléiques et également des phospholipides et quelques molécules de faible poids moléculaire non-polymériques. Ces composés peuvent être présents à l'état pur ou en liaison avec différents groupes fonctionnels. Souvent les protéines sont associées avec des oligosaccharides pour former des glycoprotéines ou avec des oligoéléments pour former des lipoprotéines (**Wingender, 1999**). Ainsi, la matrice d'EPS joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages (**Donlan, 2002**).

3. 3. Propriétés du milieu environnant

Une température élevée est souvent associée à une augmentation de l'adhésion bactérienne possiblement à cause de la production de protéines de stress associées à la surface cellulaire (**Chmielewski et Frank, 2003**). Le pH ainsi que la composition du milieu ont aussi un impact majeur sur l'attachement des bactéries aux surfaces; il est souvent stipulé que les biofilms se développent mieux en condition de limitation de nutriments (**Dewanti et Wong, 1995**).

4. Quorum Sensing : régulation de la formation des biofilms

Le *Quorum Sensing* est un mécanisme de contrôle ayant lieu au sein des cellules, optimisé par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes. Il régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de sa population, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et de dissémination de bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie et Parsek, 2008). La communication intercellulaire est indispensable à la maturation et à la dispersion du biofilm. Différentes molécules sont impliquées dans le *QS* selon le type de bactéries.

4.1. Chez les bactéries à Gram négatif

En général, on trouve des acyl homosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries à Gram négatif (Irie et Parsek, 2008). La figure 2 illustre le système à deux composants chez *Pseudomonas aeruginosa*.

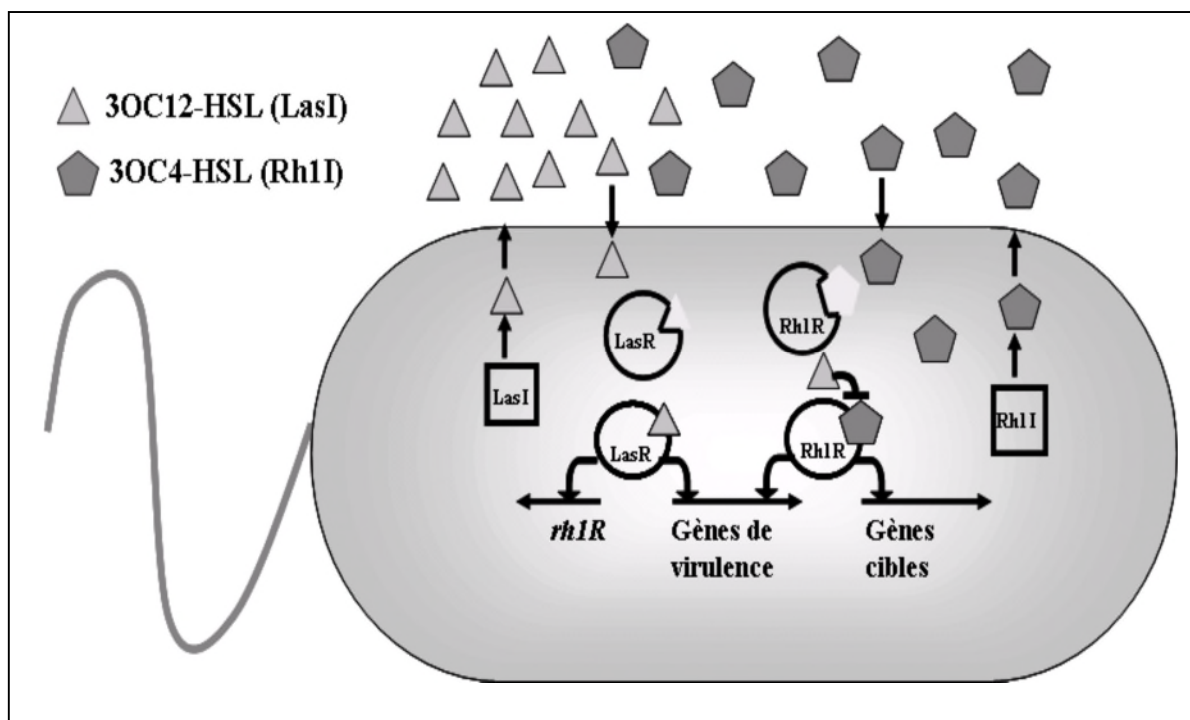


Figure 2. Système par paire auto-inducteur/détecteur (LasI/ LasR) chez *P. aeruginosa* (Irie et Parsek, 2008). 3OC12-HSL = *N*-(3-oxododecanoyl)-homosérine lactone, 3OC4-HSL= *N*-(3-oxobutanoyl)-homosérine lactone.

La protéine LasI produit la molécule auto-inductrice 3OC12-HSL (triangles) et la protéine RhII synthétise la molécule auto-inductrice 3OC4-HSL (pentagones). L'activateur

transcriptionnel LasR se lie à l'auto-inducteur LasI dépendant quand cette molécule signal atteint une concentration critique. Le complexe LasR–LasI se fixe aux régions promotrices d'une variété de facteurs de virulence et stimule leur transcription.

De plus, le complexe LasR–LasI induit la transcription de *rhlR* pour initier un deuxième circuit de *quorum sensing* (QS). RhlR fixé à l'auto-inducteur RhII-dépendant active la transcription d'une partie des gènes de virulence, qui sont aussi activés par LasR en plus d'autres gènes cibles non régulés par LasR. Ces gènes cibles sont entre autres les gènes responsables de l'adhésion, mobilité, formation de biofilms, réponse au stress oxydant et synthèse de vitamines (Dobretsov *et al.*, 2009). Dans l'étude de Ruimy et Andreumont (2004), 97 gènes sont impliqués dans le QS.

L'auto-inducteur LasI-dépendant interfère avec la fixation entre RhII et son auto-inducteur. Cette action assure que le circuit LasI/LasR est établi prioritairement au circuit RhII/RhlR.

4.2. Chez les bactéries à Gram positif

Les bactéries à Gram positif communiquent en utilisant des oligopeptides modifiés, également nommés «autoinducing peptides» (AIP). Ces peptides signal sont généralement constitués de cinq à quatre-vingt-sept acides aminés (Irie et Parsek, 2008), et ne sont pas diffusibles à travers la membrane. Par conséquent, la libération des molécules-signal est effectuée par des systèmes transporteurs dédiés aux oligopeptides (Waters et Bassler, 2005).

5. Biofilms dans l'industrie agroalimentaire

L'attachement des bactéries aux surfaces inertes en contact avec les aliments a fait l'objet de la première publication en 1981 (Zoltai *et al.*, 1981). En effet, l'environnement agroalimentaire fournit des conditions particulières favorisant l'installation de biofilms comme l'humidité et la présence de matière organique (Bower *et al.*, 1996).

Deux types de biofilms sont rencontrés dans l'industrie agroalimentaire : les biofilms dits « négatifs » et les biofilms dits « positifs ».

5. 1. Biofilms « négatifs »

Les biofilms dit "négatifs" sont des biofilms formés par des microorganismes indésirables, qui lorsqu'ils sont présents sur les équipements peuvent être à l'origine d'une contamination des produits et la détérioration du matériel sur lequel ils s'installent.

La présence de ces biofilms a un impact considérable dans l'industrie agroalimentaire touchant tous les secteurs: laiteries, industries de transformation de la viande, brasseries, sucreries...En effet, tout équipement non stérilisé abrite des bactéries qui peuvent initier un processus de colonisation notamment dans des zones peu accessibles au nettoyage et à la désinfection. Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de devenir résistantes aux agents extérieurs engendrant d'éventuelles contaminations (**Carpentier et Cerf, 1993**).

La formation de biofilms indésirables dans l'industrie agroalimentaire peut entraîner de sérieux problèmes hygiéniques et des pertes économiques dues à la contamination des aliments et la bio-détérioration des équipements. Les micro-organismes au sein des biofilms peuvent aussi catalyser des réactions chimiques causant la corrosion du métal dans les canalisations et les réservoirs et ils peuvent réduire l'efficacité du transfert thermique si les biofilms atteignent une épaisseur suffisamment élevée dans les échangeurs de chaleur et dans les canalisations (**Simoès et al., 2010**).

L'adhésion de *Salmonella* aux surfaces en contact avec les aliments, a fait l'objet la première publication sur les biofilms bactériens d'origine alimentaire (**Duguid et al., 1966**). Depuis, de nombreuses études ont rapporté la persistance de bactéries pathogènes d'origine alimentaire sur des surfaces en contact avec les aliments sous forme de biofilms; ces derniers peuvent affecter la qualité et la salubrité de ces aliments. Ceci est principalement lié à la présence de biofilms formés par *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. et *Staphylococcus aureus* (**Simoès et al., 2010**).

5.1.1. Quelques exemples de biofilms « négatifs»

- *Salmonella*

De nombreuses études ont montré que les salmonelles étaient capables de survivre sur des surfaces abiotiques comme l'acier inoxydable (**Chorianopoulos et al., 2010**), polystyrène (**Stepanovic et al., 2004**), verre (**Kim et Wei, 2009**), ciment (**Joseph et al., 2001**), marbre et

granite (**Rodrigues et al., 2011**). Sachant que ces surfaces sont couramment utilisées dans les fermes et dans l'industrie agroalimentaire, il est clair que ces biofilms représentent un danger sur la santé publique.

En effet, ces biofilms deviennent plus résistants aux agents de nettoyage et de désinfection. Comparés aux cellules planctoniques, les biofilms de *Salmonella* sont plus résistants au phosphate trisodique (Na_3PO_4) (**Scher et al., 2005**), et aux chlorines et aux iodines (**Joseph et al., 2001**). Dans une autre étude, des isolats de *Salmonella* Enteridis en biofilms étaient capables de survivre dans des conditions très acides et en présence de peroxyde d'hydrogène et ont montré une grande tolérance à des températures élevées (**Humphrey et al., 1995**).

- *L. monocytogenes*

L. monocytogenes est régulièrement impliquée dans les toxi-infections alimentaires pour lesquelles la viande et le lait étaient les produits incriminés, cette espèce adhère et forme des biofilms sur de nombreuses surfaces abiotiques, généralement en association avec d'autres microorganismes telles que des espèces de *Pseudomonas*. Les biofilms de *L. monocytogenes* deviennent plus résistants aux agents de nettoyage et aux désinfectants tels que la chlorure et l'iode (**Leriche et al., 1999**).

- *E. coli*

E. coli O157:H7, parmi les serovars d'*E. coli*, découvert en 1982 et appartenant au pathovar entérohémorragique (EHEC) est le plus incriminé dans les toxi-infections alimentaires, avec un taux de létalité variant de 3 à 5% (**Parry et Palmer, 2000**). En plus d'adhérer aux surfaces cellulaires, ce microorganisme colonise aussi des surfaces inertes peu importe leur composition: acier inoxydable, verre, polystyrène et cuivre (**Tuttle et al., 1999**). En effet, *E. coli* O157:H7 est susceptible de former des biofilms sur ces surfaces augmentant ainsi sa résistance aux désinfectants et aux autres agents antimicrobiens (**Mafu et al., 2002**).

- *S. aureus*

S. aureus est parmi les agents pathogènes les plus isolés des surfaces de l'industrie agroalimentaire, ou ils peuvent adhérer et former des biofilms (**Jerônimo et al., 2012**). La persistance de ces derniers dans le milieu agroalimentaire peut causer de graves problèmes

d'intoxications dues à la présence de souches entérotoxigènes dans les aliments (Normanno *et al.*, 2007).

5. 2. Biofilms « positifs »

Contrairement aux biofilms « négatifs », les biofilms « positifs » sont bénéfiques, leur formation est recherchée pour leurs nombreux avantages ; entre autres la prévention de l'installation de bactéries pathogènes.

Dans l'industrie, les biofilms sont de plus en plus utilisés dans la biotechnologie et ils interviennent dans de nombreux procédés dans l'industrie agro-alimentaire. La production biotechnologique par des cellules fixées et organisées en biofilms présente plusieurs avantages, notamment la capacité de production de grands volumes sur un long terme et d'éviter la perte de temps induite par les redémarrages de production. La production de vinaigre sur copeaux de bois est un exemple d'utilisation des biofilms dans les industries alimentaires, on trouve également la production de divers alcools, acides et polysaccharides utilisés en industries agro-alimentaires (Parot, 2007).

Des études ont montré que les biofilms « positifs » lorsqu'ils sont en contact avec les agents pathogènes peuvent jouer un rôle de compétition et ceci en limitant les sources en nutriments ou par production de composés antimicrobiens comme les bactériocines qui inhibent l'adhésion et la croissance de ces agents pathogènes. Certaines bactéries au sein d'un biofilm peuvent aussi sécréter des biosurfactants, des polysaccharides, ou des enzymes comme les nucléases et les protéases, qui peuvent réduire l'adhésion d'autres microorganismes ou même le détachement des cellules au sein d'un biofilm (Rendueles et Ghigo, 2012). Quelques exemples de bactéries ayant montré un effet anti-adhésif sont rapportés ci-après.

5. 2.1. Quelques exemples de biofilms « positifs » à effet anti-adhésif

Les biofilms formés par *S. sciuri* et *S. xylosus* ont été décrits comme des biofilms « positifs » sur des surfaces abiotiques fréquemment rencontrées en industrie agroalimentaire. En effet, les biofilms formés par *S. sciuri* ont été capables de prévenir l'adhésion et la croissance de *L. monocytogenes* sur des surfaces en acier inoxydable (Planchon, 2006).

Récemment, une étude menée par **Kolodkin-Gal et al. (2012)** a montré que *Bacillus subtilis* secrète des acides aminés de forme D qui peuvent réduire l'adhésion d'*E. coli* et de *S. aureus*.

Les bactéries lactiques peuvent aussi grâce à la production de métabolites antimicrobiens réduire l'implantation de microorganismes pathogènes. Il a été rapporté (**Speranza et al., 2009**) que des bactéries lactiques, utilisées comme « non-starters » et spécifiquement *Lactobacillus* sp., possèdent une grande capacité d'adhésion sur des surfaces en acier inoxydable et peuvent être utilisées pour empêcher la croissance de *L. monocytogenes*.

En effet, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus acidophilus* adsorbées sur des surfaces en verre produisaient des biosurfactants capables de réduire de 77% le nombre de cellules adhérentes d'*Enterococcus faecalis* (**Velraeds et al., 1996**).

De mêmes, le rôle de biofilms « positifs » composés d'une souche de *Lactococcus lactis*, productrice de nisine, a été démontré dans l'inhibition de l'adhésion de *L. monocytogenes* sur des surfaces inertes (**Leriche et al., 1999**).

6. Capacité des bactéries à former des biofilms : Composition et structure de la surface cellulaire

L'adhésion des bactéries repose sur l'interaction des constituants de surface de la cellule bactérienne avec la surface inerte. Les caractéristiques de la surface bactérienne étant fonction de sa composition et les bactéries sont généralement divisées en deux groupes en fonction de la composition de leur paroi:

Groupe des bactéries à Gram négatif dont la structure est plus complexe constituée d'une couche de faible épaisseur de peptidoglycane entourée d'une membrane externe formée d'une double couche de phospholipides dans laquelle des protéines sont ancrées. Le feuillet externe contient des lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 3A**) (**Coulibaly, 2010**).

Groupe des bactéries à Gram positif avec une paroi renfermant une épaisse couche de peptidoglycane, située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, et dans laquelle différentes structures sont greffées tels que les acides teichoïques, acides lipoteichoïques, polyosides et les protéines (**Figure 3B**) (**Delcour et al., 1999**).

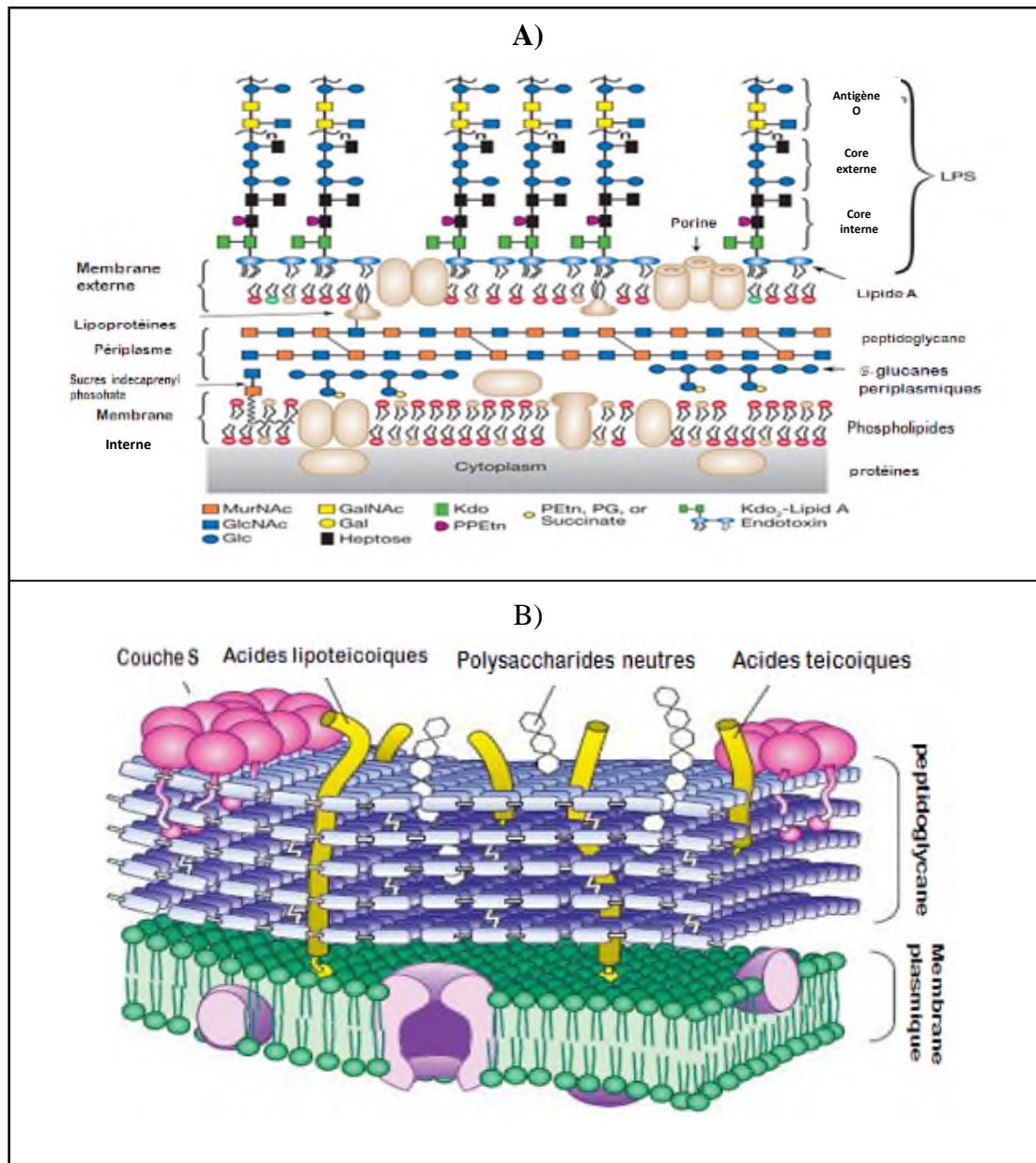


Figure 3 : Schéma de la paroi des bactéries : A) à Gram négatif (Coulibaly, 2010), B) à Gram positif (Delcour *et al.*, 1999).

Légende. MucNac: acide N-acétyl-muramique; GlcNac: N acétyl glucosamine; Glc: glucose ; GalNac: N-acétyl galactosamine; Gal: galactose; Kdo: acide 3-desoxy-D-manno octulosonique; PPEtn: pyrophospho-éthanolamine; PG: phosphatidyl-glycerol; PEtn: phosphatidyl-éthanolamine.

6. 1. Peptidoglycane

Le composé majeur de la paroi bactérienne est le peptidoglycane, qui est principalement composé de N-acétyl-glucosamine β (1-4)-N-acide-acétyl-muramique. Ces longues chaînes de glycanes sont liées transversalement par des tétra-peptides linéaires attachés aux résidus d'acide N-acétyl-muramique et par un pont inter-peptidique constitué d'un ou plusieurs acides aminés. Le peptidoglycane est d'abord formé à l'intérieur, avant d'être repoussé vers l'extérieur par le peptidoglycane nouvellement formé. Le réseau cristallin, fourni par le peptidoglycane, permet la fixation de molécules amorphes, telles que les polysaccharides, les protéines, liées ou non de façon covalente, pour finalement former une structure de surface complexe. Le peptidoglycane est le responsable de la détermination de la forme de la cellule, et il permet à la bactérie de supporter des pressions allant jusqu'à 20 atmosphères pour les bactéries à Gram positif (Delcour *et al.*, 1999). L'étude de Mercier *et al.* (2002) a révélé que la rupture du peptidoglycane est un facteur favorisant l'adhésion bactérienne aux surfaces.

6. 2. Acides teichoïques et lipoteïchoïques

Les acides teichoïques peuvent représenter jusqu'à 50 % (w/w) de la paroi bactérienne. Ils sont généralement imbriqués dans le peptidoglycane et confèrent à la paroi une bonne partie de sa fonctionnalité. Ce sont des polymères chargés négativement qui séquestrent les cations (en particulier Mg^{2+}) dans la paroi bactérienne et qui forment des complexes avec les protéines résidentes. Ces composants bactériens sont impliqués dans diverses activités biologiques comme la régulation de la balance cationique, la division cellulaire et l'autolyse du peptidoglycane (Palumbo *et al.*, 2006). Entre autres, le caractère hydrophobe de l'enveloppe cellulaire est apporté par les acides lipoteïchoïques, ce caractère étant étroitement lié aux propriétés d'adhésion de la cellule (Delcour *et al.*, 1999).

6. 3. Polysaccharides pariétaux

Les polysaccharides sont des composés ubiquitaires de la paroi cellulaire. Ils sont parfois appelés polysaccharides neutres, en opposition aux polysaccharides des acides teichoïques, chargés négativement, bien qu'en réalité, leur association avec des composés anioniques comme le glycérol-phosphate peut les rendre chargés (Delcour *et al.*, 1999). Il a été rapporté que la co-agrégation entre ces polysaccharides de la paroi était responsable de la formation de la plaque dentaire par les streptocoques oraux (Whittaker *et al.*, 1996).

6.4. Protéines

Les protéines de surface, présentes en quantités importantes chez les bactéries à Gram positif, peuvent exercer plusieurs fonctions, comme l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques. Les protéines sont soit liées de façon covalente, soit maintenues en place par d'autres interactions (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes) (Archibald *et al.*, 1993).

La couche S (ou S-layer) est formée par un assemblage macromoléculaire de protéines ou de glycoprotéines à la surface des bactéries, apportant de la rigidité à la structure cellulaire. Les sous-unités protéiques de la couche S sont liées de façon non covalente entre elles et à la paroi cellulaire. Plusieurs rôles sont attribués à cette couche incluant un rôle protecteur, site d'adhésion des coenzymes, rôle d'adhésion cellulaire ou encore reconnaissance des surfaces (Sleytr et Beveridge, 1999).

6.5. Lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des constituants lipidiques situés dans la couche externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont constitués de trois parties : le lipide A situé du côté externe de la bicouche membranaire, le polysaccharide central et la chaîne antigénique O exposé à la surface de la bactérie (Coulibaly, 2010). Les lipopolysaccharides semblent avoir un rôle dans la formation de biofilms. Par exemple, des mutants de l'antigène O de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ont montré une réduction dans l'adhésion sur le support (Barak *et al.*, 2007). La partie glucidique (antigène O) de ces LPS, confère à la cellule des propriétés hydrophiles. De ce fait, des mutants de *P. fluorescens* incapables de produire des LPS adhèrent en plus grand nombre sur un support hydrophobe (Williams et Fletcher, 1996).

Chez *E. coli* des coupures dans le LPS, engendrent des altérations dans la biosynthèse du pili de type I et du flagelle. Ceci provoque une réduction de l'adhésion (Genevaux *et al.*, 1999).

6.6. Appendices de surface

Parmi les appendices cellulaires on distingue les flagelles, les pilis ou les *fimbriae* et les curli. Ils sont des structures de surface, essentielles à la formation du biofilm, plus particulièrement dans sa phase initiale de formation (Costerton *et al.*, 1981).

6.6.1. Flagelles

Les flagelles sont des structures fines (environ 10 à 20 nm de diamètre), et de nature protéique, permettant la mobilité des bactéries. Etant polaires, ils confèrent à la bactérie la capacité de se déplacer non seulement en milieu aqueux, mais également sur des surfaces semi-solides (swarming) (Coulibaly, 2010). En plus de leur rôle dans la locomotion, ils auraient une fonction importante lors des premières étapes d'adhésion en permettant de surpasser les forces répulsives entre la bactérie et la surface (Vatanyoopaisam *et al.*, 2000).

Chez *E. coli*, les flagelles jouent un rôle crucial dans l'initiation de l'adhésion sur des surfaces inertes en permettant aux bactéries de s'approcher de celles-ci tout en favorisant la maturité du biofilm (Pratt et Kolter, 1998). Dans l'étude de O'Toole et Kolter (1998), des mutants de *P.aeruginosa*, défectueux dans la mobilité liée au flagelle n'adhéraient que très faiblement sur support inerte.

6.6.2. Pilis

On distingue deux types de pilis

Les pilis de type I (*fimbriae*) : peuvent avoir deux aspects, soit de bâtonnets rigides de 5 à 7 nm de diamètre, soit de filaments flexibles de 2 à 3nm de diamètre. Ces *fimbriae* semblent être présents chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et plus rares chez les bactéries à Gram positif. Ce sont des appendices non-flagellés, qui contribuent à l'hydrophobicité de la surface grâce à leurs fortes proportions en acides aminés hydrophobes (Khalilzadeh, 2009).

Dans l'étude de Donlan (2000), le *fimbriae* F9, retrouvé chez *E. coli*, est impliqué dans son attachement aux surfaces en annulant la répulsion électrostatique entre la cellule et la surface. Des mutations dans les gènes *cupA* (pour *chaperone usher pathway*) empêchent l'attachement au plastique. La voie *chaperone usher pathway* permet l'assemblage des *fimbriae*, qui sont essentiels à l'adhésion des souches d'*E. coli* uropathogènes (Sauer *et al.*, 2000).

Les pilis de type IV : ce sont des structures fibrillaires, constitués essentiellement de monomères de piline (PilA), présentes aux pôles de certaines bactéries à Gram négatif, leurs capacités de rétraction permettent une mobilité de type « twitching », permettant la dispersion sur des surfaces humides (Khalilzadeh, 2009). Les pilis de type IV permettent de mettre un

terme à une mobilité désorganisée des bactéries, les interactions deviennent stables, et l'attachement devient donc irréversible (O'Toole et Kolter 1998). L'étude de Vallet *et al.* (2001) a montré que des mutants de *P. aeruginosa* défectueux dans la biogenèse des pili de type IV, étaient capables de former une monocouche cellulaire sur le support, mais étaient incapables de former des microcolonies caractéristiques au phénotype sauvage.

6.6.3. Curli

Les curli sont des fibres protéiques extracellulaires produites par des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. Leur synthèse est sous l'influence de nombreuses conditions environnementales comme la température, l'osmolarité, le pH et les concentrations en oxygène (Beloin *et al.*, 2008). Les curli ont un rôle dans l'adhésion, la colonisation des surfaces et la formation de biofilms (Vidal *et al.*, 1998). Dans l'étude de Castonguay *et al.* (2006), la capacité de souches environnementales d'*E. coli* à former des biofilms dépendait de leur capacité à exprimer des curli à leurs surfaces.

Vidal *et al.* (1998) ont pu observer une hyperproduction de curli par un mutant d'*E. coli* présentant une capacité accrue d'adhésion aux surfaces inertes. Dans une autre étude, des mutations dans le gène *agfB*, impliqué dans le fonctionnement des curli de *Salmonella enterica*, engendraient une diminution de l'adhésion de ces mutants par rapport aux souches sauvages (Barak *et al.*, 2005).

Chapitre II
Bactéries lactiques

1. Définition et caractères généraux

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de bactéries produisant de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles sont non pigmentées, à Gram positif, catalase négative, nitrate réductase négative et dépourvues du système cytochrome oxydase. Elles sont généralement immobiles, asporulées, leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives qui possèdent des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, peptides, vitamines, sels minéraux, acides gras et les glucides fermentescibles. Sur la base des caractéristiques de fermentation, ces bactéries sont homofermentaires ou hétérofermentaires. Dans le premier cas, l'acide lactique est le produit majoritaire de la fermentation. Dans le second, en plus de l'acide lactique sont produits de l'acide acétique, de l'éthanol, du dioxyde de carbone et de l'acide formique (**Dellaglio et al., 1994**).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles sont aussi très répandues dans l'environnement et peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'Homme et des animaux (**Hogg, 2005**).

2. Taxonomie

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen, basée sur le type de fermentation anaérobie des sucres. Par la suite, d'autres propositions de classification ont été formulées en se basant sur des critères phénotypiques. Ces critères étant la morphologie, l'étude des protéines membranaires et leurs fonctions, la gamme de sucres métabolisés, la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires et le type de quinones (accepteur d'électrons) (**Vandamme et al., 1996**).

La phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques a révolutionné profondément la taxonomie des bactéries lactiques. Cependant, la caractérisation phénotypique et biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les sucres, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate

déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 2007).

La figure 4 montre l'arbre phylogénétique des différents genres de bactéries lactiques et genres associés.

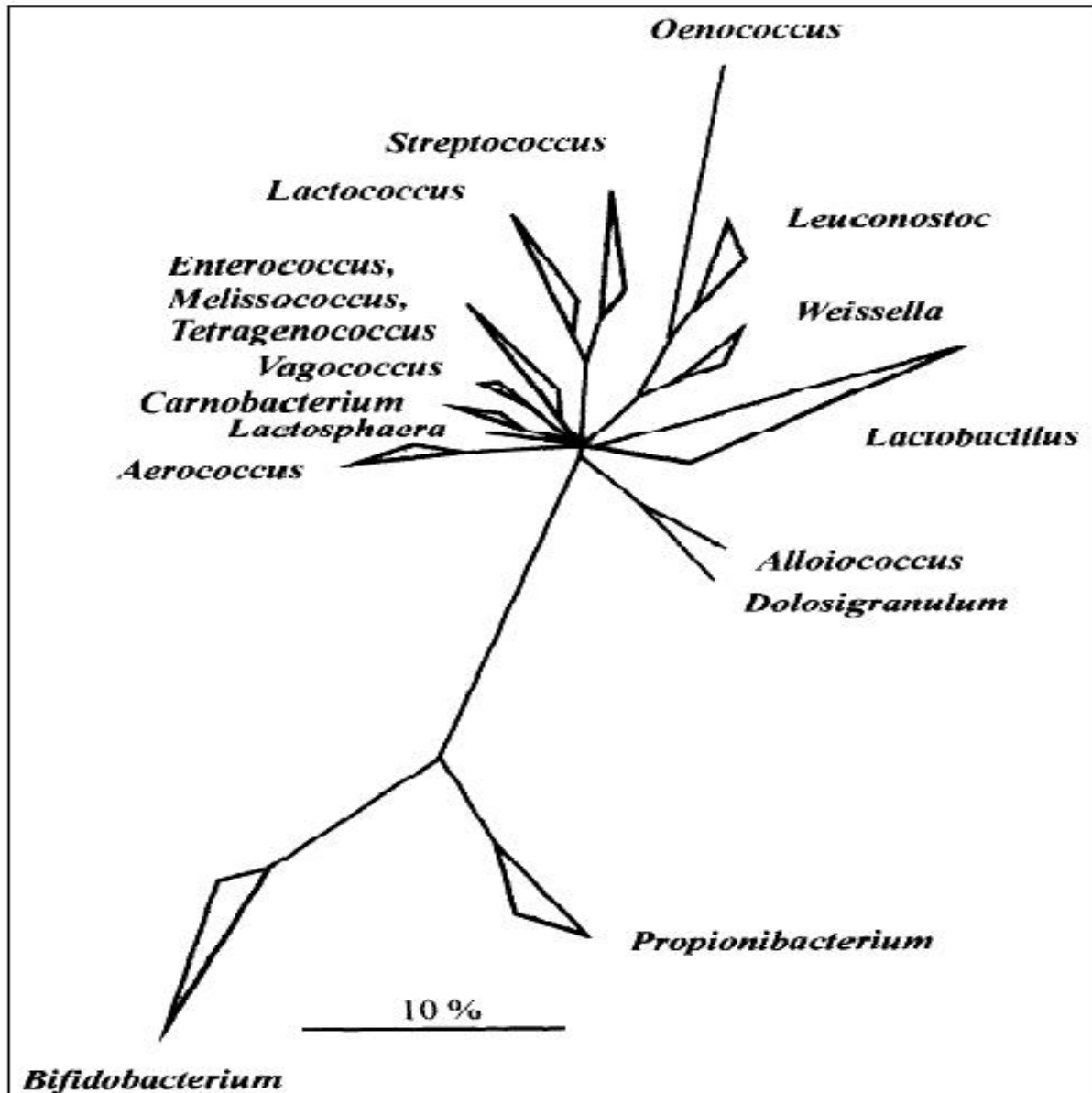


Figure 4 : Arbre phylogénétique des différents genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (tiré de Stiles et Holzappel, 1997 ; Pilet *et al.*, 2005).

3. Caractéristiques des principaux genres

3. 1. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le principal genre de la famille des *Lactobacillaceae*. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés ou gros) souvent groupés en chaînes, immobiles, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Le genre *Lactobacillus* contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses fabrications ou qui sont rencontrées comme contaminants (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**). Ce genre a été subdivisé par Orla- Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Guiraud et Rosec, 2004**):

- **Groupe I « *Thermobacterium* »:** Comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 40°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans les aliments (lait, yaourt, fromage...) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* et *Lb. acidophilus*.
- **Groupe II « *Streptobacterium* »:** Regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans les aliments sont : *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*.
- **Groupe III « *Betabacterium* »:** Ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

3. 2. *Lactococcus*

Les lactocoques appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Ils se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, ils sont capables de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* produit le diacétyle. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**).

Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces dont *Lactococcus lactis* qui est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces: *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (**Pot, 2008**).

3. 3. *Enterococcus*

Les entérocoques appartiennent à la famille des *Enterococcaceae*, se sont des coques capables de croître entre 10°C et 45°C et comprenant quelques espèces mobiles. Ils sont homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et du sorbitol. Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques qui appartiennent au groupe D de Lancefield. Ce sont des agents commensaux de l'intestin de l'Homme et des animaux. L'espèce généralement rencontrée dans les aliments est *Enterococcus faecalis* (Tamime, 2002 ; Ho *et al.*, 2007).

4. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques dont les principaux sont :

4. 1. Acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques, produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Grâce à la production de ces acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (Liu, 2003). Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane des cellules et acidifier le cytoplasme par libération de protons, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Brul et Coote, 1999; Cotter et Hill, 2003).

4. 2. Peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de cytochromes pour assurer la phosphorylation oxydative mais utilisent des flavoprotéines pour l'oxydation terminale (conversion d'O₂ en H₂O₂). Un autre mécanisme de synthèse du H₂O₂ a été détecté chez les bactéries lactiques, il consiste en la transformation d'O₂⁻ et H⁺ en H₂O₂ et O₂ catalysée par des complexes enzymatiques à manganèse (Lepargneur et Rousseau, 2002).

L'effet antimicrobien du H₂O₂ pourrait résulter de l'oxydation de groupes sulfhydryles causant la dénaturation de nombreuses enzymes et de la peroxydation des lipides

membranaires et par conséquent de l'augmentation de la perméabilité membranaire (**Kong et Davison, 1980**).

L' H_2O_2 pourrait également être un précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que l'ion superoxyde (O_2^-) et hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner, 1988**).

Les bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalases hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases. La concentration en peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques varie entre 0,001 et 8 mM, en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de culture (**Dortu, 2008**).

4. 3. Dioxyde de carbone (CO_2)

Le CO_2 est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité. Le CO_2 peut effectivement inhiber la croissance de nombreux microorganismes, en particulier les bactéries psychotrophes à Gram négatif dont *Pseudomonas* sp. (**Ammor et al., 2006**).

4. 4. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomale, le plus souvent cationiques, post-traductionnellement modifiés ou non (**Heng et al., 2007**). Elles sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice (**Cotter et al., 2005**). Leur activité antimicrobienne est soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, ou bactériostatique inhibant la croissance bactérienne (**Cotter et al., 2005**). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par l'action d'une ou de plusieurs protéines d'immunité (**Heng et al., 2007**).

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie productrice (**Savijoki et al., 2006**) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans le milieu de culture.

Les bactériocines des bactéries lactiques ont un intérêt particulier dans l'industrie agro-alimentaire comme bio-conservateurs. Au bout de ces dernières années, l'utilisation des

bactéries lactiques ou de leurs métabolites antimicrobiens comme barrière naturelle contre les bactéries pathogènes a démontré son efficacité. De plus, l'utilisation de la technique des cellules immobilisées pourrait permettre d'augmenter la durée et la stabilité de la production de bactériocines. Récemment, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (Galvez *et al.*, 2007).

5. Propriétés antiadhésives des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques possèdent des propriétés antiadhésives relatives à la production de certains métabolites tels que les bactériocines, les bio-surfactants et les polysaccharides.

5. 1. Bactériocines

Des études ont rapporté que l'application de cultures de bactéries lactiques, ou de leurs surnageants ou quelques métabolites comme les bactériocines pouvait prévenir l'adhésion de microorganismes sur des surfaces abiotiques (Maldonadol *et al.*, 2007; Guerrieri *et al.*, 2009). En effet, l'adsorption de bactériocines telle que la nisine sur des surfaces solides pouvait inhiber les premières étapes de l'adhésion bactérienne (Bower *et al.*, 1998).

Zhao *et al.* (2004) ont également rapporté que l'application de bactéries lactiques productrices de bactériocines pouvait contrôler la croissance d'agents pathogènes au sein d'un biofilm. Par exemple, la nisine A produite par *Lc. lactis* UQ2 et la sakacine 1 produite par *Lb. sakei* pouvaient être appliquées pour inhiber les premières étapes de l'adhésion de *L. monocytogenes* sur des surfaces en acier inoxydable (Blanca *et al.*, 2008; Winkelstroter *et al.*, 2011).

5. 2. Bio-surfactants

Les bio-surfactants ont été définis comme des molécules amphiphiles produites par des microorganismes. Ce sont principalement des glycolipides ou des lipoprotéines agissant grâce à leurs propriétés amphiphiles sur les tensions de surface aux interfaces. Différents rôles physiologiques sont attribués aux bio-surfactants comme la stimulation de la croissance sur substrats organiques (adhésion aux substrats organiques ou émulsification des sources carbonées hydrophobes), participation à l'adhésion des bactéries productrices et création d'une barrière compétitive vis-à-vis de l'adhésion des agents pathogènes (Lepargeur et Rousseau, 2002).

En effet, les bio-surfactants sont impliqués dans des phénomènes de désorption et d'anti-adhésion. La première description des bio-surfactants a été relative à *Streptococcus mitis* qui secrète un bio-surfactant capable d'empêcher l'adhésion de *St. mutans*. Depuis, de nombreux autres dérivés ont été décrits chez les bactéries. Par exemple, la surlactine produite par *Lb. acidophilus* et *Lb. fermentum* fut capable d'inhiber l'adhésion initiale d'*En. faecalis*, *E. coli* et de *Candida albicans* (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

Dans l'étude de **Martine et al. (1996)**, la surlactine produite par *Lb. acidophilus* RC14 était capable d'inhiber l'adhésion initiale d'*En. faecalis* 1131 sur du matériel en caoutchouc hydrophile ou hydrophobe. Dans une autre étude, *St. thermophilus*, isolée à partir de lait, produisait un bio-surfactant entraînant sa propre désorption d'une surface en verre. De même, des bio-surfactants, obtenus à partir de *Lb. helveticus*, adsorbés sur de l'acier inoxydable étaient capables d'inhiber l'adhésion de *L. monocytogenes* (**Meylheuc et al., 2006**).

Walencka et al. (2008) ont démontré que les bio-surfactants, obtenus à partir de trois souches de *Lb. acidophilus* étaient capables d'inhiber la formation et de perturber l'intégrité des biofilms de *S. epidermidis* et *S. aureus*. Dans ce dernier cas, l'addition de ces bio-surfactants à des biofilms matures accélérât leur dispersion et altérât leur morphologie.

5. 3. Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides font partie des métabolites primaires produits par les bactéries lactiques, synthétisés et excrétés hors de la cellule. Parmi ceux-ci, on peut distinguer les polysaccharides extracellulaires, qui ne restent pas liés à la cellule mais qui sont excrétés dans le milieu et les polysaccharides constitutifs d'une capsule épaisse ou d'une pellicule autour de la paroi bactérienne (**Cerning et al., 1992**).

Une étude a révélé que des exopolysaccharides extraits à partir d'un lait fermenté commercialisé "villi" étaient capables d'inhiber l'adhésion de nombreuses souches entéropathogènes (**Ruas-Madiedo et al., 2006**).

Dans une autre étude des exopolysaccharides produits par *Lb. acidophilus* A4 pouvaient réduire la formation d'un biofilm formé par EHEC de 87% sur microplaques en polystyrène, et ceci en affectant les gènes liés à la production de curli (*crl*, *csgA* et *csgB*) (**Kim et al., 2009**).

Partie pratique

Chapitre I
Matériel et Méthodes

1. Criblage de souches de bactéries lactiques et de bactéries pathogènes quant à leur pouvoir d'adhésion sur des surfaces en polystyrène (méthode des microplaques)

1. 1. Origine des souches utilisées

Soixante et une (61) souches appartenant au groupe des bactéries lactiques, dont 12 lactocoques, 20 entérocoques et 29 lactobacilles sont utilisées dans cette étude. Ces dernières ont été récemment isolées et identifiées phénotypiquement par AIT OUALI Fatma (Doctorante, LMA) à partir de différents matériels de collecte de lait de deux fermes d'exploitation laitière situées respectivement dans les régions d'Akbou et de Tazmalt (wilaya de Béjaïa).

De même, soixante-seize (76) souches de bactéries pathogènes dont 21 appartenant à *Salmonella* sp., 21 à *Staphylococcus aureus*, 19 à *Escherichia coli* et 15 à *Pseudomonas* sp., prélevées à partir des mêmes surfaces, sont aussi incluses dans cette étude.

1. 2. Revivification et vérification de la pureté des souches utilisées

Les souches conservées pendant un mois à 4°C dans du bouillon de De Man, Rogosa et Sharpe (MRS, CONDA, Pronadisa, Espagne, annexe 2) pour les bactéries lactiques et dans du bouillon nutritif (BN, Fluka, Espagne, annexe 2) pour les bactéries pathogènes, sont repiquées dans 5 ml de bouillon TSB-YE (bouillon Trypticase-Soja, Institut Pasteur d'Algérie, supplémenté avec 6 g/l [w/v] d'extrait de levure, Fluka, Espagne, annexe 2) et dans 5 ml de bouillon TSB (Trypticase-Soja, Institut Pasteur d'Algérie, annexe 2) respectivement, puis incubées pendant 24 h à 30°C.

A partir de ces cultures fraîches, un repiquage est effectué sur gélose TSA-YE (gélose Trypticase- Soja supplémentée avec 6 g/l [w/v] d'extrait de levure, Fluka, Espagne, annexe 2) pour les bactéries lactiques, et sur gélose TSA pour les bactéries pathogènes, suivi d'une incubation de 24 à 48 h à 30°C.

Tout au long de cette étude, du bouillon TSB-YE et de la gélose TSA-YE sont utilisés pour la culture des bactéries lactiques, et du bouillon TSB ainsi que de la gélose TSA sont utilisés pour la culture des bactéries pathogènes.

1. 3. Premier criblage : Etude de la capacité d'adhésion (de formation de biofilm) des souches lactiques et des souches pathogènes sur microplaques en polystyrène

1.3.1. Standardisation des *inocula* (DO₆₀₀)

A partir de cultures fraîches de 24 ou de 48 h sur gélose TSA et TSA-YE respectivement, une colonie est repiquée dans leurs bouillons respectifs. Les bouillons sont incubés pendant 18 h à 30°C, puis à partir de ces derniers des dilutions sont réalisées dans une solution de Tryptone- Sel (TS, annexe 2) afin d'obtenir une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1.

1. 3.2. Ensemencement de la microplaque

La formation de biofilms est testée sur des microplaques en polystyrène (Zellkultur Testplatte 96U 1Stk, Suisse) stériles suivant la méthode d'O'Toole *et al.* (1999), avec quelques modifications.

Les puits de la microplaque, préalablement remplis avec 100 µl de bouillon TSB-YE ou de TSB, sont ensemencés en triple (trois répétitions par souche dans la même microplaque) avec 100 µl d'une suspension bactérienne fraîche de 18 h standardisée à une DO₆₀₀ de 0,1, puis la microplaque est incubée à 30°C pendant 24 h. Six puits contenant 200 µl de bouillon stérile sont utilisés comme témoins. Le test d'adhésion sur microplaques est répété deux fois (deux expériences indépendantes).

1. 3.3. Coloration au cristal violet (0,1%)

Après incubation, les suspensions bactériennes, dans les puits, sont aspirées soigneusement puis ces derniers sont rincés deux fois avec 200 µl de TS stérile. Les cellules adhérentes sont fixées avec 200 µl d'éthanol à 96% (Sigma, Allemagne) pendant 15 minutes, puis l'éthanol est aspiré et les puits sont laissés sécher stérilement. Par la suite, les cellules fixées sont colorées avec 200 µl d'une solution de cristal violet (Biochem, Québec, Canada) à 0,1% (w/v) pendant 20 min, puis lavées avec 200 µl de TS stérile jusqu'à obtention d'une couleur claire du liquide de lavage. Enfin, le colorant fixé aux cellules est solubilisé en ajoutant 200 µl d'acide acétique 33% (v/v) (Sigma, Allemagne). La solution obtenue dans chaque puit est transférée dans une cuve de spectrophotomètre et la quantité de colorant fixé (indirectement la quantité de cellules fixées) est estimée par la mesure de l'absorbance à 595 nm (Spectrophotomètre, SPECORD 50 analytikajena, Allemagne).

1.4. Deuxième criblage : Sélection des meilleures souches adhérentes (lactiques et pathogènes)

Après avoir effectué le premier criblage, les souches lactiques et pathogènes, ayant montré une bonne capacité d'adhésion, comparées aux autres souches testées, sont encore testées quant à leur aptitude à adhérer sur microplaques et ceci pour confirmer les résultats obtenus.

1. 4. 1. Standardisation des *inocula* (log UFC/ml)

Les *inocula* des souches lactiques et pathogènes, sélectionnées lors du premier criblage, sont standardisés dans les bouillons TSB-YE et TSB respectivement à un nombre de 10^8 UFC/ml par la méthode de dénombrement classique sur géloses TSA-YE et TSA après incubation à 30°C pendant 48 h.

1. 4. 2. Formation des biofilms sur microplaques

Les puits des microplaques sont remplis avec 200 µl des suspensions bactériennes de 18 h contenant 10^8 UFC/ml, puis incubés pendant 24 h à 30°C. L'expérience est répétée deux fois avec trois répétitions pour chaque souche dans la même microplaque.

L'ensemencement et la lecture des microplaques sont effectués comme décrit précédemment (paragraphe 1.3.2 et 1.3.3).

2. Identification génotypique des souches lactiques sélectionnées

L'identification moléculaire des souches a été réalisée au laboratoire ProBioGEM (université Lille 1) par BENDALI F. et AIT OUALI F. (LMA, université de Bejaia).

Afin d'identifier les souches lactiques au niveau du genre, une PCR spécifique au genre *Lactobacillus* a été réalisée suivant le protocole de **Messaoudi *et al.* (2011)**.

2. 1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN total est extrait en utilisant le kit « Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega Corp., France) ». L'utilisation du Kit « Wizard® Genomic DNA » est une méthode simple, rapide et adaptable pour l'extraction de l'ADN à partir de sources variées.

2. 2. Identification au niveau du genre

Les amorces utilisées sont LbLMA1 et R16-1. Le mélange réactionnel (50 μ l) contient 25 μ l du “DreamTaq™Green PCR Master Mix 2X” (dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampon de réaction « DreamTaq™ polymerase », Fermentas), 2 μ l de chaque amorce (20 mM) et 5 μ l d'échantillon d'ADN obtenu à partir d'une suspension cellulaire issue d'une seule colonie de 24 h et de l'eau dépourvue d'ARNases et d'ADNases (16 μ l).

Programme de la PCR

- (i) Dénaturation à 95°C/5 min,
- (ii) 34 cycles de dénaturation à 94°C/1 min, hybridation à 55°C/1min et élongation à 72°C/1 min, suivi par,
- (iii) Une extension finale à 72°C/5 min.

Les amplicons générés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% (w/v) à 100 V/ 1 h et révélés grâce à leur fluorescence due au « gel red » inclus dans le gel à raison de 0,5 μ g/ml.

2. 3. Séquençage de l'ADNr 16S

Du fait que la PCR spécifique à l'ADNr 16S ne permet que l'identification au niveau du genre, la séquence de l'ADNr 16S de chaque souche est déterminée. Le gène d'ARNr 16S a été d'abord amplifié en utilisant le même mélange (Fermentas) et le programme PCR utilisé consistait en: une dénaturation à 95°C/3 min, 29 cycles de dénaturation à 94°C/40 s, une hybridation à 55°C/50 s et une élongation à 72°C/1 min, suivie d'une élongation finale à 72°C/10 min, en utilisant les amorces suivantes: S1(5'-AGAGTTTGATC(A,C)TGGCTCAG-3') et S2 (5'-GG(A,C)TACCTTGTTACGA(T,C)TTC-3'). Les produits PCR ont été soumis à une électrophorèse à 100V/ 1 h sur gel d'agarose (0,6 %, w/v) et révélés par coloration au « gel red » inclus dans le gel à raison de 0,5 μ g/ml. L'ADN amplifié a été cloné en utilisant le « pGEM®-T Easy Vector System » (Promega Corp., France) suivi d'une extraction de plasmides par le « Gene JET plasmid Mini prep » (Fermentas). Le plasmide a été par la suite séquencé (Eurofins MWG Operon, Belgique) et les séquences résultants assemblées en une seule séquence avec le logiciel « Bio Edit sequence alignment software » et analysées en utilisant le « NCBI - Standard Nucleotide BLAST » (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. Cinétique de formation de biofilms des souches (lactiques et pathogènes) criblées (Méthode des tubes)

Les souches lactiques et pathogènes, ayant montré la plus grande capacité d'adhésion en microplaques de polystyrène sont sélectionnées pour la suite du travail. La cinétique de formation de biofilms par ces dernières sur support en polypropylène est étudiée suivant le protocole décrit ci-dessous.

3. 1. Formation de biofilms sur la surface interne de tubes en polypropylène

10 ml de bouillon TSB-YE ou de bouillon TSB sont inoculés avec chaque souche testée à raison de 10^5 UFC/ml et la formation de biofilms est suivie pendant 6 jours dans des tubes en polypropylène.

Ce test est réalisé sous deux conditions :

- Sans renouvellement de milieu de culture pendant 6 jours.
- Avec renouvellement de milieu de culture, et ceci par changement du milieu de culture dans lequel les cellules étaient incubées par le même milieu de culture stérile. Cette étape est effectuée tous les deux jours d'incubation (c'est-à-dire après le deuxième et le quatrième jour).

3. 2. Dénombrement des cellules adhérees

Le dénombrement des cellules adhérees sous les deux conditions du test (avec et sans renouvellement de milieu) est effectué après 3, 18, 24 et 48 h, puis tous les jours jusqu'au 6^{ème} jour, et ceci comme suit:

- Aspiration de la culture bactérienne du tube;
- Lavage deux fois avec 10 ml de TS stérile pour éliminer le reste de la culture bactérienne qui persiste dans le tube;
- Détachement des biofilms formés dans 10 ml de TS stérile à l'aide de billes en verre stériles, les tubes étant "vortexés" vigoureusement pour s'assurer d'avoir détaché toutes les cellules adhérees.
- Dénombrement de la suspension bactérienne par la méthode de dénombrement classique sur gélose TSA-YE ou TSA.

4. Effet barrière des souches lactiques criblées sur l'installation de biofilms de bactéries pathogènes.

Afin de mettre en évidence l'effet barrière exercé par les souches lactiques en biofilms sur l'installation de souches de bactéries pathogènes sur les mêmes surfaces, des biofilms de bactéries lactiques sont formés dans des tubes en polypropylène comme décrit en paragraphe 3.1, en incubant pendant 24 h. Au terme de cette période d'incubation, les cultures bactériennes sont aspirées et les tubes sont lavés deux fois avec 10 ml de TS stérile. Par la suite, les tubes sont inoculés avec chaque souche pathogène préparée dans 10 ml de TSB-YE à raison de 10^5 UFC/ml, puis ré-incubés pendant 24 h supplémentaires. Ce test est réalisé à l'égard des souches pathogènes criblées dans la première partie de cette étude.

Plusieurs combinaisons sont testées afin de déterminer l'effet barrière de chaque souche lactique à l'égard de chaque souche pathogène.

Au terme des 24 h supplémentaires, les tubes sont lavés deux fois avec 10 ml de TS stérile et les souches pathogènes, ayant éventuellement pu adhérer, sont détachées dans 10 ml de TS stérile à l'aide de billes en verre stériles comme décrit précédemment (paragraphe 3.2). Les suspensions bactériennes sont récupérées dans des tubes stériles puis dénombrées sur un milieu de culture sélectif approprié à chaque souche pathogène (annexe 3).

5. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antiadhésive (anti-biofilm) des souches lactiques criblées

5. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Des cultures bactériennes de 18 h dans du bouillon TSB-YE ou MRS des souches lactiques (10^8 UFC/ml) sont centrifugées deux fois à 8000 g/20 min à 4°C (centrifugeuse ROTINA 380R Hettick Zentrifugen, Allemagne). Après centrifugation, le surnageant récupéré est stérilisé par filtration à travers un filtre à seringue de 0,45 µm de diamètre, testé tel quel ou après neutralisation du pH à une valeur de 6,5 avec du NaOH 1N stérile. L'activité antibactérienne des surnageants obtenus est testée à l'égard des souches pathogènes criblées selon la méthode des puits (**Ennahar *et al.*, 1998**) comme suit :

20 ml de gélose MRS coulés dans des boîtes de Pétri stériles sont recouverts avec 10 ml d'une gélose nutritive molle (7 g d'agar/l) inoculée avec la souche cible (10^6 UFC/ml), ensuite des puits de 6 mm de diamètre et de 3 mm de profondeur sont creusés à l'aide d'une

pipette Pasteur stérile. Ces puits sont remplis avec 100 µl du surnageant natif et neutralisé. Les boîtes sont d'abord pré-incubées à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives éventuellement présentes dans les surnageants, puis incubées pendant 18 h à 37°C.

5. 2. Mise en évidence de l'activité antiadhésive (anti-biofilm)

Afin de mettre en évidence l'effet antiadhésif du surnageant de culture des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes deux procédés sont testés : la pré-incubation et la co-incubation.

La pré-incubation consiste à introduire 10 ml de surnageant de culture natif, récupéré à partir du bouillon TSB-YE tel que décrit en paragraphe 5.1, dans des tubes en polypropylène et à les incubés pendant 24 h. Au terme de cette période d'incubation, le surnageant est aspiré et les tubes sont lavés deux fois avec 10 ml de TS stérile. Par la suite, les tubes sont inoculés avec chaque souche pathogène préparée dans 10 ml de TSB-YE à raison de 10^5 UFC/ml puis ré-incubés pendant 24 h supplémentaires. Ce test est réalisé avec le surnageant natif et répété trois fois.

Quant à la co-incubation, elle consiste à mélanger, dans des tubes de polypropylène, du surnageant de culture natif des souches lactiques préparé dans du bouillon TSB-YE comme décrit précédemment (paragraphe 5.1.) et du bouillon TSB-YE inoculé à raison de 10^5 UFC/ml d'une culture fraîche de 18 h de chacune des souches pathogènes (individuellement) dans un rapport 1/1 (50%/50%) puis à incubés les tubes pendant 24 h à 30°C.

Au terme de la période d'incubation, des dénombrements des cellules adhérentes sont effectués comme décrit en paragraphe 4.

6. Analyse statistique

Tout au long de cette étude, chaque test est répété trois fois afin de vérifier statistiquement la signification des résultats. La différence entre deux paramètres est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples et la différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée, suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Chapitre II
Résultats et Discussion

1. Premier criblage : Etude de la capacité d'adhésion (de formation de biofilms) de souches de bactéries lactiques et de bactéries pathogènes sur microplaques en polystyrène

1. 1. Capacité d'adhésion des souches lactiques

Les souches de bactéries lactiques testées appartiennent aux genres *Enterococcus* (*En.*), *Lactobacillus* (*Lb.*) et *Lactococcus* (*Lc.*). L'adhésion et la formation d'un biofilm est détectée visuellement au niveau des puits des microplaques tel que montré sur la **figure 5**. Toutefois l'importance de cette adhésion ne peut être estimée que par la mesure des absorbances après coloration au cristal violet; ce qui rend la méthode des microplaques semi-quantitative.

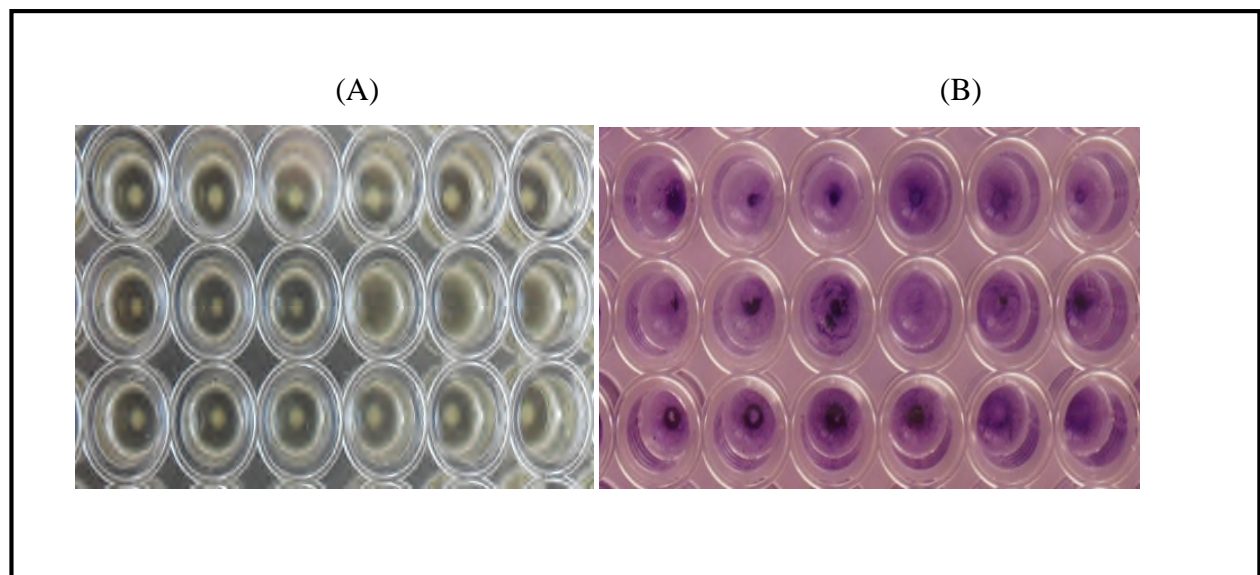


Figure 5 : Photographies de biofilms dans des puits de microplaques en polystyrène de 96 puits. (A): après 24 h d'incubation à 30°C, (B): après coloration au cristal violet (photos originales).

Les mesures d'absorbances (A) à 595 nm des suspensions bactériennes correspondant aux cellules adhérentes des soixante et une (61) souches de bactéries lactiques utilisées dans cette étude, obtenues après coloration au cristal violet, ont donné des valeurs comprises entre 0,102 et 0,569 (**Fig. 6**). Ces différences dans les valeurs d'absorbance indiquent une différence dans la capacité d'adhésion des souches lactiques. Le test *t* de *Student* (XLSTAT 2009) utilisé pour comparer entre les résultats des deux fermes d'exploitation laitière n'a pas révélé de différences significatives ($P > 0,05$) entre les deux.

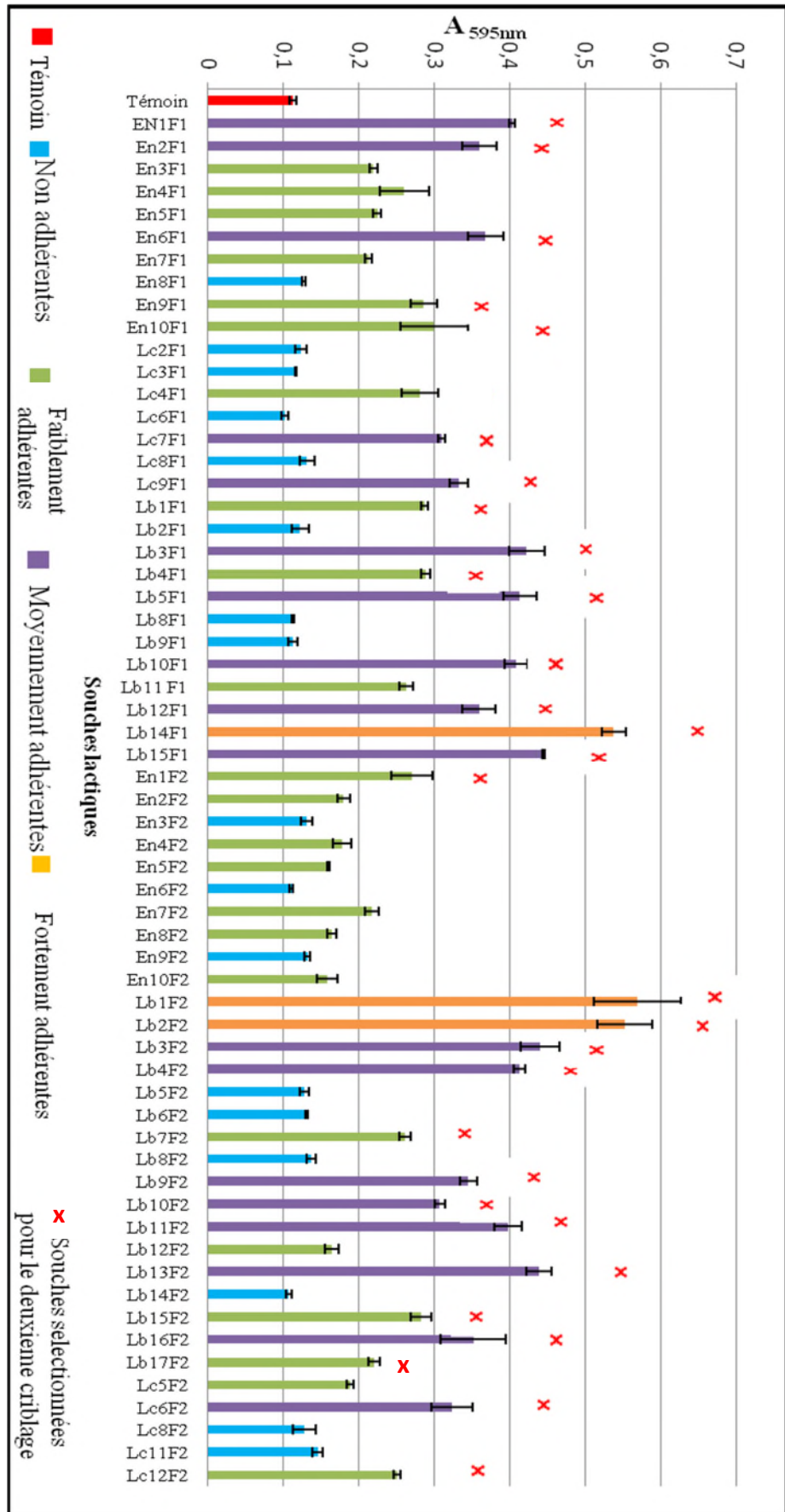


Figure 6 : Résultats du pré-criblage des souches lactiques quant à leur capacité d'adhésion sur microplaques en polystyrène (Lb.: Lactobacilles; Lc.: Lactocoques; En.: Enterocoques; F1 et F2: Première et deuxième ferme d'exploitation laitière). Du bouillon TSB-YE est inclus en tant que témoin négatif.

Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été enregistrée entre l'absorbance du témoin ($A = 0,112$) consistant en du bouillon TSB- YE stérile et celles des souches de lactobacilles (Lb2F1, Lb8F1, Lb9F1, Lb5F2, Lb6F2, Lb8F2 et Lb14F2), des lactocoques (Lc2F1, Lc3F1, Lc6F1, Lc8F2, Lc8F1 et Lc11F2) et des entérocoques (En3F2, En6F2, En8F1, En9F2) ayant des absorbances inférieures à 0,150, ce qui indique que ces souches n'adhèrent pas sur le polystyrène. Par contre, les souches ayant montré des $A \geq 0,150$ sont classées comme suit :

$0,150 \leq A < 0,261$: Souches faiblement adhérentes (En10F1, Lb4F1, Lb1F1, En9F1, Lb15F2, Lc4F1, En1F2, Lb11F1, Lb7F2, En4F1, Lc12F2, En5F1, Lc17F2, En3F1, En7F2, En7F1, Lc5F2, En2F2, En4F2, En5F2, En10F2, Lb12F2 et En8F2).

$0,261 \leq A < 0,500$: Souches moyennement adhérentes (Lb15F1, Lb3F2, Lb13F2, Lb3F1, Lb5F1, Lb4F2, Lb10F1, En1F1, Lb11F2, En6F1, En2F1, Lb12F1, Lb16F2, Lb9F2, Lc9F1, Lc6F2, Lc7F1 et Lb10F2).

$0,500 \leq A < 0,600$: Souches fortement adhérentes (Lb1F2, Lb2F2 et Lb14F1).

Plusieurs travaux ont rapporté la capacité des bactéries lactiques à adhérer et à former des biofilms sur des surfaces en polystyrène. Une étude menée par **Kubota *et al.* (2008)** sur la capacité d'adhésion de quarante-six souches, appartenant aux différents genres de bactéries lactiques, dont *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lc. lactis* et *En. faecium*, a révélé qu'elles étaient capables moyennement ou fortement de former des biofilms sur microplaques de polystyrène; et ceci après 24 à 48 h d'incubation à 35°C, sous des conditions aérobies et anaérobies.

Récemment, une étude effectuée sur deux souches d'*En. faecalis* a révélé qu'elles étaient capables de former des biofilms sur microplaque en polystyrène après 24h d'incubation à 37°C dans du bouillon TSB (**Seneviratne *et al.*, 2013**).

1. 2. Capacité d'adhésion des souches pathogènes

Les souches pathogènes testées appartiennent aux deux espèces *E. coli* et *S. aureus* et aux deux genres *Salmonella* et *Pseudomonas*.

Les mesures d'absorbance à 595 nm des suspensions bactériennes correspondant aux cellules adhérentes des souches pathogènes ont permis d'enregistrer des valeurs comprises entre 0,150 et 0,961 (**Fig. 7**), révélant une grande disparité dans la capacité d'adhésion des

différentes souches pathogènes. Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été notée entre les souches de la première et de la deuxième ferme d'exploitation laitière.

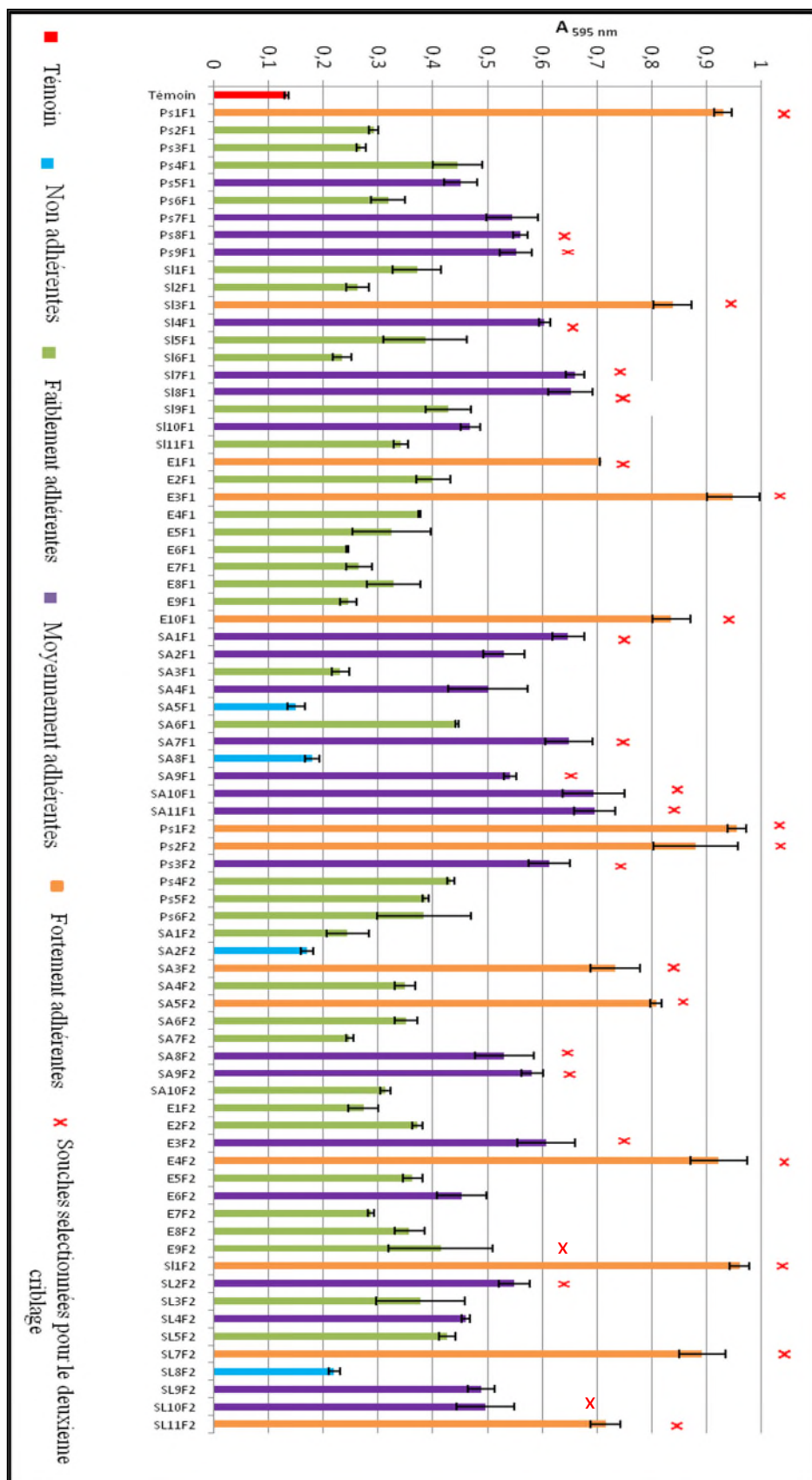
De même, aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été enregistrée entre l'absorbance du témoin ($A=0,133$) consistant en du bouillon TSB et celles des souches pathogènes SL8F2, SA8F1, SA2F2 et SA5F1 qui possèdent une $A < 0,230$, ce qui indique que ces souches n'adhèrent pas ou adhèrent très faiblement sur la microplaque en polystyrène. Par contre, les souches ayant des absorbances supérieures à $0,230$ sont classées comme suit :

$0,230 \leq A < 0,450$: Souches faiblement adhérentes (Ps4F1, SA6F1, Ps4F2, S19F1, SL5F2, E9F2, E2F1, Ps5F2, S15F1, Ps6F2, SL3F2, E4F1, E2F2, S11F1, E5F2, E8F2, SA6F2, SA4F2, S111F1, E8F1, E5F1, Ps6F1, SA10F2, Ps2F1, E7F2, E1F2, Ps3F1, E7F1, S12F1, SA7F2, E9F1, SA1F2, E6F1, S16F1 et SA3F1).

$0,450 \leq A < 0,700$: Souches moyennement adhérentes (SA11F1, SA10F1, S17F1, S18F1, SA7F1, SA1F1, Ps3F2, E3F2, S14F1, SA9F2, Ps8F1, Ps9F1, SL2F2, Ps7F1, SA9F,1 SA2F1, SA8F2, SA4F1, SL10F2, SL9F2, S110F1, SL4F2, E6F2 et Ps5F1).

$0,700 \leq A < 0,970$: Souches fortement adhérentes (S11F2, Ps1F2, E3F1, Ps1F1, E4F2, SL7F2, Ps2F2, S13F1, E10F1, SA5F2, SA3F2, E1F1 et SL11F2).

L'étude de **Rodriguez *et al.* (2010)** sur la capacité de production de biofilms de dix souches d'*E. coli* et douze souches de *S. aureus*, entre autres, a révélé que toutes ces dernières étaient moyennement adhérentes sur microplaques en polystyrène après 24 h d'incubation à 36°C dans le bouillon TSB. Dans une autre étude, deux souches de *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Typhimurium ont été trouvées capables de produire des biofilms sur des surfaces en polyéthylène, après 24 h d'incubation à 28°C dans du TSB (**Pui *et al.*, 2011**).



2. Deuxième criblage : Sélection des meilleures souches adhérentes

2. 1. Souches lactiques

Suite au premier criblage, trente (30) souches de bactéries lactiques (15 faisant partie de la première ferme et 15 de la deuxième ferme d'exploitation laitière) ayant montré la meilleure capacité d'adhésion sur microplaques ($0,261 < A \leq 0,569$) ont été sélectionnées pour effectuer un deuxième criblage en standardisant les *inocula* à 10^8 UFC/ml. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 8**.

Ce test a permis de confirmer que les trente souches sélectionnées étaient capables d'adhérer sur polystyrène avec des valeurs d'absorbance comprises entre 0,270 et 0,920. Ces valeurs sont plus crédibles que celles obtenues au premier criblage étant donné que les valeurs des DO ne permettent que l'estimation du nombre de cellules (viables et mortes), contrairement au dénombrement qui donne le compte exact des cellules viables.

Les valeurs des absorbances obtenues lors du deuxième criblage ($0,270 < A \leq 0,920$) sont plus élevées que celles obtenues à l'issue du premier criblage ($0,261 < A \leq 0,569$), lors duquel l'*inoculum* des souches lactiques était standardisé à une $DO_{600nm} = 0,1$ (correspondant à un taux $\leq 10^4$ UFC/ml). Certaines souches (Lb7F2, Lb4F2...) qui ont été classées comme étant faiblement ou moyennement adhérentes avec un *inoculum* initial faible ($\leq 10^4$ UFC/ml), se sont révélées fortement adhérentes en testant un *inoculum* plus élevé (10^8 UFC/ml). Par contre des souches (Lb1F2 et Lb14F1) ayant été classées fortement adhérentes au taux initial faible ($\leq 10^4$ UFC/ml) se sont révélées moyennement adhérentes à un taux initial plus élevé (10^8 UFC/ml). Donc le taux initial des cellules influence considérablement la formation de biofilms par les bactéries lactiques.

Les souches Lb2F2, Lb3F2, Lb4F2, Lb7F2 et Lb9F2 ayant montré la meilleure capacité d'adhésion suite au deuxième criblage ont été identifiées génotypiquement et sélectionnées pour la suite du travail.

Par comparaison des cinq souches sélectionnées, aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été enregistrée entre la capacité d'adhésion des trois souches Lb2F2, Lb3F2 et Lb4F2; Lb3F2, Lb4F2 et Lb7F2 et celle de Lb7F2 et Lb9F2.

Toutefois, il existe des différences significatives ($P < 0,05$) entre les souches Lb2F2 et Lb7F2; Lb2F2 et Lb9F2; Lb3F2 et Lb9F2; Lb4F2 et Lb9F2.

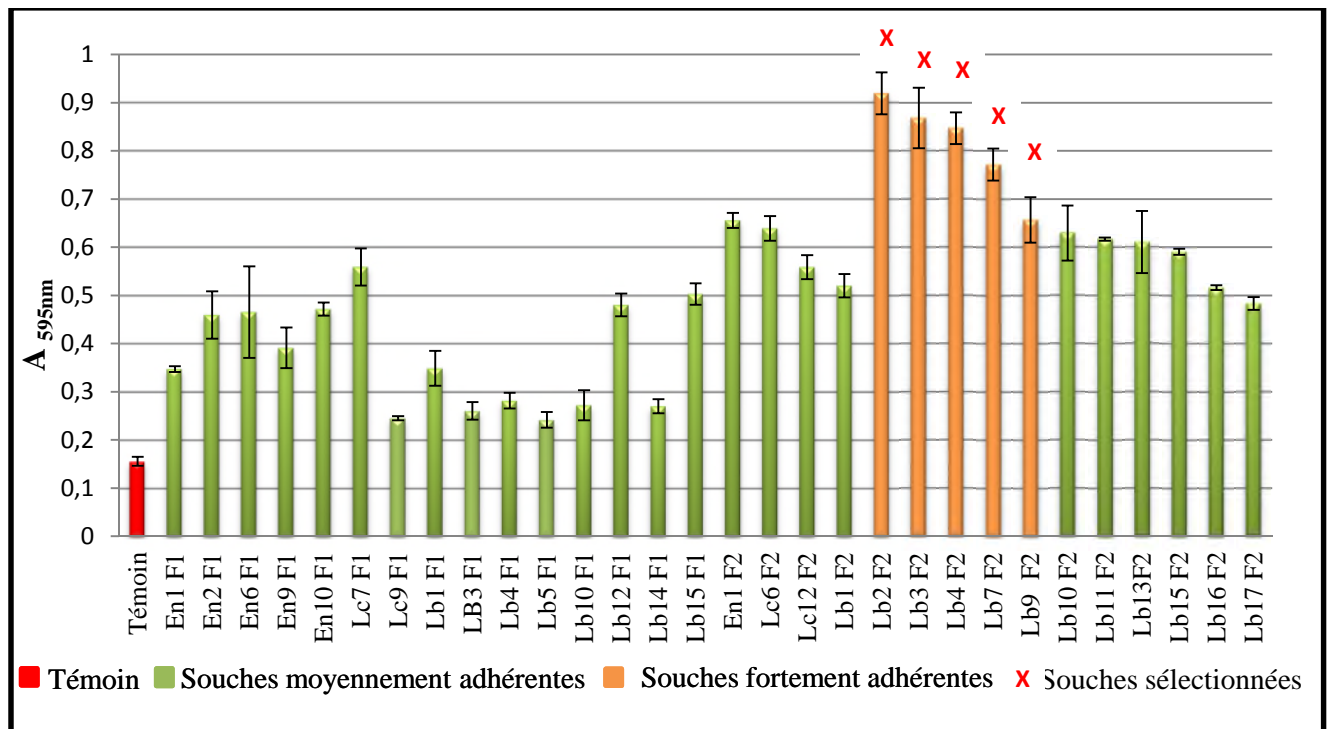


Figure 8 : Résultats du deuxième criblage des 30 souches lactiques pré-criblées. Du bouillon TSB-YE est inclus en tant que témoin négatif.

L'identification génotypique de ces dernières par séquençage du gène codant l'ARNr 16S nous a permis d'assigner les souches Lb2F2 et Lb3F2 à l'espèce *Lb. pentosus*, Lb7F2 à *Lb. casei*, Lb9F2 à *Lb. plantarum* et Lb4F2 à *Lb. brevis*. Les séquences de ces dernières sont déposées dans « Genbank » et leurs « accession numbers » sont respectivement : Lb2F2 KF 923750, Lb3F2 KF923751, Lb7F2 KJ416931, Lb9F2 KJ416932, Lb4F2 KJ416933.

Les quatre espèces identifiées appartiennent selon la classification d'Orla-Jensen (Guiraud et Rosec, 2004) au groupe II «*Streptobacterium*», lactobacilles mésophiles homofermentaires (*Lb. pentosus*, *Lb. casei* et *Lb. plantarum*) et au groupe III «*Betabacterium*», lactobacilles mésophiles hétérofermentaires (*Lb. brevis*).

Une étude menée sur sept souches de bactéries lactiques appartenant entre autre à *Lb. plantarum* et *Lb. casei* a montré que ces dernières étaient capables d'adhérer sur les microplaques en polystyrène sous différentes conditions de culture (Bharathi et al., 2011).

L'adhésion bactérienne aux surfaces est déterminée par un ensemble de propriétés physico-chimiques de surface des cellules, notamment l'hydrophobicité et la charge externe des cellules. Toutefois, la couche protéique de surface "surface layer protein" (SLP) pourrait

conférer une grande hydrophobicité aux lactobacilles (**van der Mei et al., 2003**) ce qui favoriserait leur adhésion aux surfaces en plastique, du polystyrène entre autres polymères.

Cependant l'hydrophobicité de surface n'est pas le seul facteur régissant l'adhésion des lactobacilles aux surfaces abiotiques, le milieu environnant ayant une grande influence. En effet, d'après l'étude de **Rodriguez et al. (2005)**, l'adhésion de deux souches de lactobacilles, *Lb. acidophilus* ATCC4356 et *Lb. casei* ATCC393, possédant ou non une « SLP », était meilleure sur une surface hydrophobe en présence d'une faible force ionique. Par contre, à une force ionique élevée aucune différence n'a été notée entre la capacité d'adhésion de ces deux souches aux surfaces hydrophile et hydrophobe.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la production de biofilms chez les bactéries lactiques ne sont pas encore élucidés. Récemment (**Bove et al., 2012**), on a montré que l'inactivation du gène *ftsH* responsable de la production de la protéine FtsH (métalloprotéase membranaire ATP-dépendante) chez la souche *Lb. plantarum* WCFS1 pouvait réduire de 20–30% la formation de biofilms sur du polystyrène par comparaison au type sauvage. Il a été stipulé que les gènes *ftsH* pourraient contrôler la stabilité des facteurs de transcription contrôlant le développement de biofilms.

2. 2. Souches pathogènes

Trente souches de bactéries pathogènes (15 appartenant à la première ferme et 15 à la deuxième ferme), ont été sélectionnées pour effectuer un deuxième criblage dont les *inocula* ont été standardisés à un nombre de 10^8 UFC/ml. Ces dernières dont six appartenant à *Pseudomonas* sp., six à *E. coli*, neuf à *Salmonella* sp. et les neuf restantes à *S. aureus* possédaient des absorbances comprises entre 0,460 et 0,961 tels que révélées par le premier criblage.

Le deuxième criblage a révélé que les souches de bactéries pathogènes sélectionnées étaient capables d'adhérer sur le polystyrène avec des absorbances comprises entre 0,420 et 0,961 (**Fig. 9**). A l'instar des souches lactiques, l'influence de l'*inoculum* est souche-dépendant. En effet, certaines souches (S14F1) adhèrent mieux lorsque l'*inoculum* initial est élevé tandis qu'un comportement inverse est constaté pour d'autres souches (SA5F2, SA10F2).

Contrairement aux souches lactiques, les absorbances des cellules adhérentes enregistrées lors du premier criblage (dont les *inocula* ont été standardisés à une DO de 0,1,

équivalent à 10^4 UFC/ml) sont très proches de celles obtenues au deuxième criblage (*inocula* standardisés à un nombre de 10^8 UFC/ml). Ces résultats indiquent que les biomasses adhérentes des souches pathogènes ne dépendent pas de la taille des *inocula* initiaux. Dans l'étude de **Khalilzadeh (2009)**, les quantités de biomasses adhérentes en testant un *inoculum* de 10^2 UFC/ml étaient supérieures par rapport à celles observées aux *inocula* de 10^3 et 10^4 UFC/ml chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, et ceci après 24h d'incubation à 37°C sur microplaque en polystyrène. Ceci pourrait être relié à la vitesse de division cellulaire des souches pathogènes qui atteint des populations très élevées après 24h.

Les cinq meilleures souches pathogènes sélectionnées pour la suite du travail sont des souches de *Salmonella* sp. (SL1F2 et SL4F1), de *Pseudomonas* sp. (PS1F2), d'*E. coli* (E10F1), et de *S. aureus* (SA9F2), ces dernières ont montré une meilleure capacité d'adhésion avec des valeurs d'absorbance comprises entre 0,659 et 0,961 (Fig. 9).

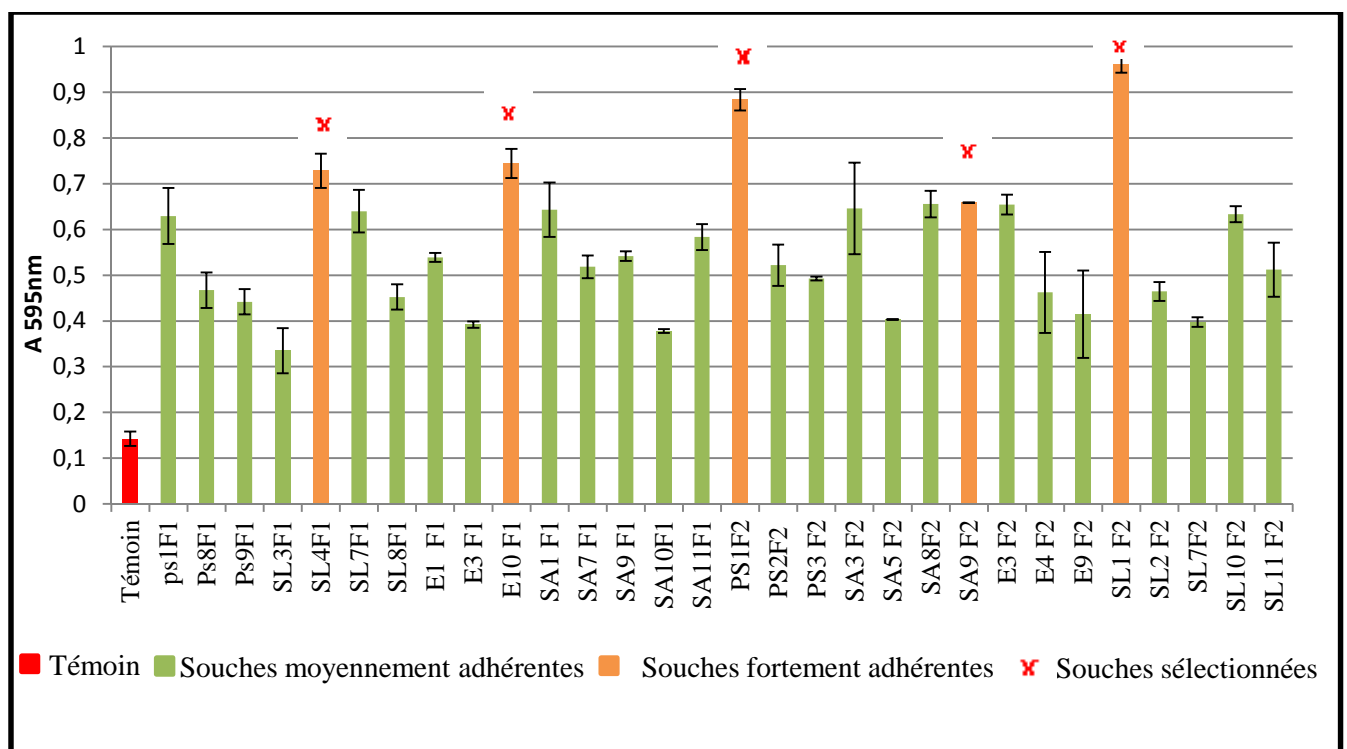


Figure 9 : Résultats du deuxième criblage des 30 souches pathogènes pré-criblées. Du bouillon TSB est inclus en tant que témoin négatif.

Par comparaison aux souches lactiques ($0,270 < A \leq 0,920$) nous constatons que les souches pathogènes ($0,659 < A \leq 0,961$) adhèrent mieux sur le polystyrène. Ceci serait la conséquence d'une différence dans la composition de l'enveloppe cellulaire. En effet, il a été bien établi que l'adhésion bactérienne aux surfaces biotiques et abiotiques fait intervenir

plusieurs molécules de la surface cellulaire dont les flagelles, pili et les curli, molécules dont au moins une est présente chez les cinq souches pathogènes (SL1F2, SL4F1, PS1F2, E10F1 et SA9F2) et absentes chez les lactobacilles.

Le rôle des flagelles a été démontré chez *P. aeruginosa* par l'étude des mutants *sad* (Surface-Attachement-Defective) de la souche PA14, déficiente dans la mobilité liée au flagelle et n'adhérant que très faiblement sur support inerte contrairement au type sauvage. De même des mutants déficients dans la synthèse des pili de type IV étaient capables de former une monocouche cellulaire sur des surfaces en chlorure de Polyvinyl, mais étaient incapables de former des microcolonies caractéristiques au phénotype sauvage (**O'Toole et Kolter, 1998**). Dans une autre étude, des mutants d'*E. coli* déficients dans la synthèse des flagelles avaient des difficultés à adhérer aux surfaces abiotiques (**Pratt et Kolter, 1998**).

Les pili de type I (*fimbriae*) et les curli possèdent aussi un rôle important dans l'adhésion d'*E. coli*, une altération du gène *fimH* (intervenant dans la synthèse des pili du type I) ne permet plus l'adhésion initiale de la bactérie aux surfaces abiotiques. Par contre, une augmentation de la production des curli favorise cette adhésion. De même, des mutations sur le gène *agfB* impliqué dans le fonctionnement des curli chez *Salmonella enterica* engendrait une diminution de l'adhésion de ces mutants aux supports inertes (**Barak et al., 2005**).

3. Cinétique de formation de biofilms des souches criblées (méthode des tubes)

Les cinq souches lactiques et pathogènes sélectionnés après le premier et le deuxième criblage ont fait l'objet d'une étude de leur cinétique d'adhésion sur des surfaces en polypropylène. L'*inoculum* de ces dernières a été standardisé à un nombre de 10^5 UFC/ml.

3. 1. Souches lactiques

Le dénombrement des cellules adhérees des cinq souches lactiques sélectionnées, à savoir *Lb. pentosus* Lb2F2 et Lb3F2, *Lb. brevis* Lb4F2, *Lb. casei* Lb7F2 et *Lb. plantarum* Lb9F2 après 3, 18 et 24 h, 2, 3, 4, 5 et 6 jours d'incubation, a révélé que toutes ces souches pouvaient adhérer sur la surface interne des tubes en polypropylène (**Figure 10a**).

3.1.1. Sans renouvellement de milieu de culture

Les deux souches *Lb. pentosus* Lb2F2 et *Lb. casei* Lb7F2 ont montré la meilleure capacité d'adhésion et aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre la

cinétique d'adhésion de ces deux souches lactiques.

Après 3 h d'incubation de chaque souche lactique (10^5 UFC/ml), le nombre de cellules adhérees allait de $3,11 \pm 0,18$ à $3,69 \pm 0,30$ log UFC/ml, ce qui nous mène à conclure que les étapes initiales d'adhésion ont lieu au bout des premières heures de contact bactéries/support. L'adhésion durant les premières heures d'incubation est un phénomène déjà rapporté dans la littérature pour de nombreuses souches bactériennes. En effet, **Brzowski et al. (2011)** ont observé que *Lb. fermenti* 126 et *Lb. rhamnosus* CCM 1825 adhéraient sur microplaque en polystyrène durant les trois premières heures d'incubation à 4°C. A partir d'un *inoculum* de 10^6 UFC/ml, le nombre de cellules adhérees estimées après comptage sous microscope à fluorescence après 3h d'incubation, étaient de $2,53 \pm 0,28 \times 10^3$ cellules/cm² et de $1,78 \pm 0,24 \times 10^3$ cellules/cm² pour *Lb. fermenti* 126 et pour *Lb. rhamnosus* CCM 1825 respectivement.

Toutefois, après 18 h d'incubation, le nombre de cellules adhérees augmentait jusqu'à $6,36 \pm 0,3$ à $7,52 \pm 0,52$ log UFC/ml, et continuait à augmenter jusqu'au sixième jour d'incubation pour atteindre $7,52 \pm 0,39$ à $8,9 \pm 0,65$ log UFC/ml. Ce qui suggère que les biofilms formés par les cinq souches lactiques (*Lb. pentosus* Lb2F2, Lb3F2; *Lb. brevis* Lb4F2; *Lb. casei* Lb7F2 et *Lb. plantarum* Lb9F2) n'ont probablement pas encore atteint leur maturité au bout de six jours d'incubation.

En effet, la production de biofilm se déroule dans une séquence d'étapes, tout d'abord les surfaces sont conditionnées avec des macromolécules présentes dans le milieu de culture, suivi d'une faible adsorption des cellules aux surfaces, puis d'une adsorption irréversible de ces cellules. Suite à cette étape, un contact est établi entre les cellules par l'intermédiaire de signaux permettant le transport de nutriments à travers le biofilm, la croissance cellulaire et la production d'EPS. Le biofilm ainsi mature fini par un détachement et libération de cellules planctoniques dans le milieu de culture (**Breyers et Ratner, 2004**). Le détachement pourrait résulter de la production de biosurfactants ou d'enzymes de lyse de la matrice extracellulaire.

Récemment, **Ibarreche et al. (2014)** ont étudié la capacité de souches de *Lb. curvatus* et *Lb. sakei* à former des biofilms sur microplaques en polystyrène à 30°C pendant 1, 2, et 3 jours d'incubation dans du bouillon MRS et sans renouvellement de milieu de culture. Il s'est avéré que la formation de biofilms était maximale au bout des 3 jours d'incubation.

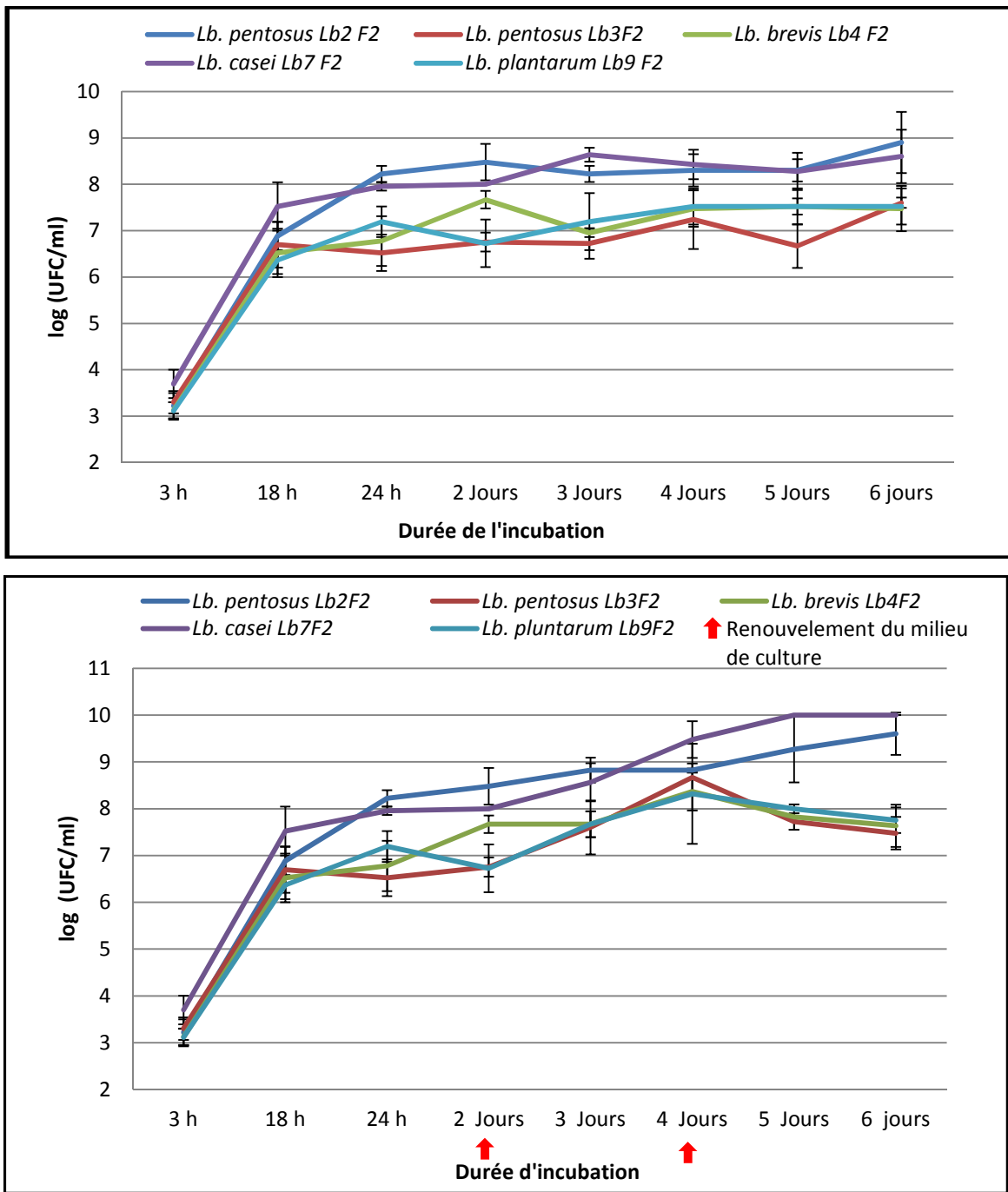


Figure 10 : Cinétique de formation de biofilms par les cinq souches lactiques sur la surface interne de tubes en polypropylène durant six jours d'incubation. a) sans renouvellement du milieu de culture, b) avec renouvellement du milieu de culture tout les deux jours d'incubation.

3.1.2. Après renouvellement de milieu de culture

Le renouvellement du milieu de culture tous les deux jours d'incubation pour chaque souche lactique a permis d'obtenir les résultats illustrés sur la **figure 10b**. Cette étape de renouvellement du milieu de culture influence positivement la formation de biofilms par quatre (*Lb. pentosus* Lb2F2, *Lb. pentosus* Lb3F2, *Lb. casei* Lb7F2 et *Lb. plantarum* Lb9F2) des cinq souches lactiques (tableau I). Cette influence a pu être déduite en comparant les résultats obtenus en incluant l'étape de renouvellement de milieu de culture à ceux obtenus sans que le milieu de culture ne soit renouvelé. Par contre, aucune différence significative ($P > 0,05$) (LDS, ANOVA, XLSTAT 2009) n'a été retrouvée entre le nombre de cellules adhérentes avant et après renouvellement du milieu de culture pour la souche *Lb. brevis* Lb4F2.

Tableau I : Taux d'augmentation (log UFC/ml) de l'adhésion des souches lactiques après renouvellement du milieu de culture (tous les deux jours d'incubation).

Durées d'incubation (jours)	<i>Lb. pentosus</i> Lb2F2	<i>Lb. pentosus</i> Lb3F2	<i>Lb. brevis</i> Lb4F2	<i>Lb. casei</i> Lb7F2	<i>Lb. plantarum</i> Lb9F2
3	NS	1	NS	NS	NS
4	NS	1	NS	1	1
5	1	1	NS	2	1
6	1	NS	NS	2	NS

NS : Non significatif

En effet, l'apport en nutriments favorise la formation de biofilms, ces nutriments pourraient diffuser à travers ces derniers favorisant ainsi la croissance cellulaire. L'effet du renouvellement du milieu de culture sur la maturité des biofilms a déjà été observé dans d'autres études. En **2009**, **Guerrieri et al.** ont rapporté que deux souches de *Lb. plantarum* (10^4 UFC/ml) étaient capables de former des biofilms matures après 7 jours d'incubation à 30°C sur du polystyrène en utilisant du bouillon MRS renouvelé à 50% toutes les 48 h d'incubation.

De même, **Bharathi et al. (2011)** ont observé que sept souches de bactéries lactiques, appartenant entre autres aux espèces *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. brevis*, étaient toutes capables de former d'importants biofilms sur du polystyrène après 24 h d'incubation à 37°C dans du bouillon MRS. Cependant en utilisant ce bouillon dilué à 1/10, ces souches ont été incapables de former un biofilm soient capables d'en produire très faiblement. Ceci

démontre clairement l'effet de l'épuisement du milieu sur la cinétique de développement d'un biofilm.

3. 2. Souches pathogènes

A l'instar des souches lactiques, les cinq souches pathogènes adhéraient sur la surface interne des tubes en polypropylène (**fig. 11**).

3.2.1. Sans renouvellement de milieu de culture

La souche *E. coli* E10F1 a montré la meilleure capacité d'adhésion suivie par *Salmonella* SL4F1 et SL1F2, *S. aureus* SA9F2 et *Pseudomonas* sp. PS1F2. Cependant, aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été notée entre les cinétiques d'adhésion des cinq souches pathogènes.

Au bout des trois premières heures d'incubation, les cinq souches pathogènes ont déjà réussi à adhérer avec des taux compris entre $3,36 \pm 0,4$ et $4,11 \pm 0,18$ log UFC/ml. Le nombre de cellules adhérees a augmenté jusqu'à des valeurs comprises entre $6,88 \pm 0,3$ et $7,6 \pm 0,05$ log UFC/ml en prolongeant la durée d'incubation jusqu'à 18 h. Ce taux a continué d'augmenter jusqu'au cinquième jour où les souches ont atteint leur taux maximum ($7,63 \pm 0,5$ - $8,8 \pm 0,17$ log UFC/ml) au sein du biofilm (**fig. 11a**). Ceci suggère que les biofilms formés par ces souches pathogènes ont atteint leur phase de maturité. Selon **Heydron et al. (2000)**, la maturation des biofilms se produit entre trois à six jours après les étapes initiales de l'adhésion.

Dans l'étude de **Jerônimo et al. (2012)**, le nombre maximal de cellules adhérees de la souche *S. aureus* S3 (8 log UFC/ml) a été observé après six jours d'incubation (6 log UFC/ml), dans du bouillon BHI à 37°C, sur des surfaces en polypropylène.

Au sixième jour d'incubation, le nombre de cellules adhérees a commencé à diminuer ($7,36 \pm 0,27$ - $8,36 \pm 0,3$ log UFC/ml), ces biofilms matures pourraient être en phase de détachement cellulaire. Toutefois l'épuisement du milieu de culture pourrait aussi provoquer la mort des cellules au sein du biofilm. **Allison et al. (1998)** ont montré que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. fluorescens*, la diminution de la quantité de nutriments entraîne la sécrétion d'une polysaccharide lyase qui dégrade la matrice du biofilm, facilitant ainsi la libération des bactéries. Chez *E. coli* K-12, la protéine régulatrice CsrA (Carbon storage regulator A) sert d'activateur de la dispersion des biofilms (**Jackson et al., 2002**).

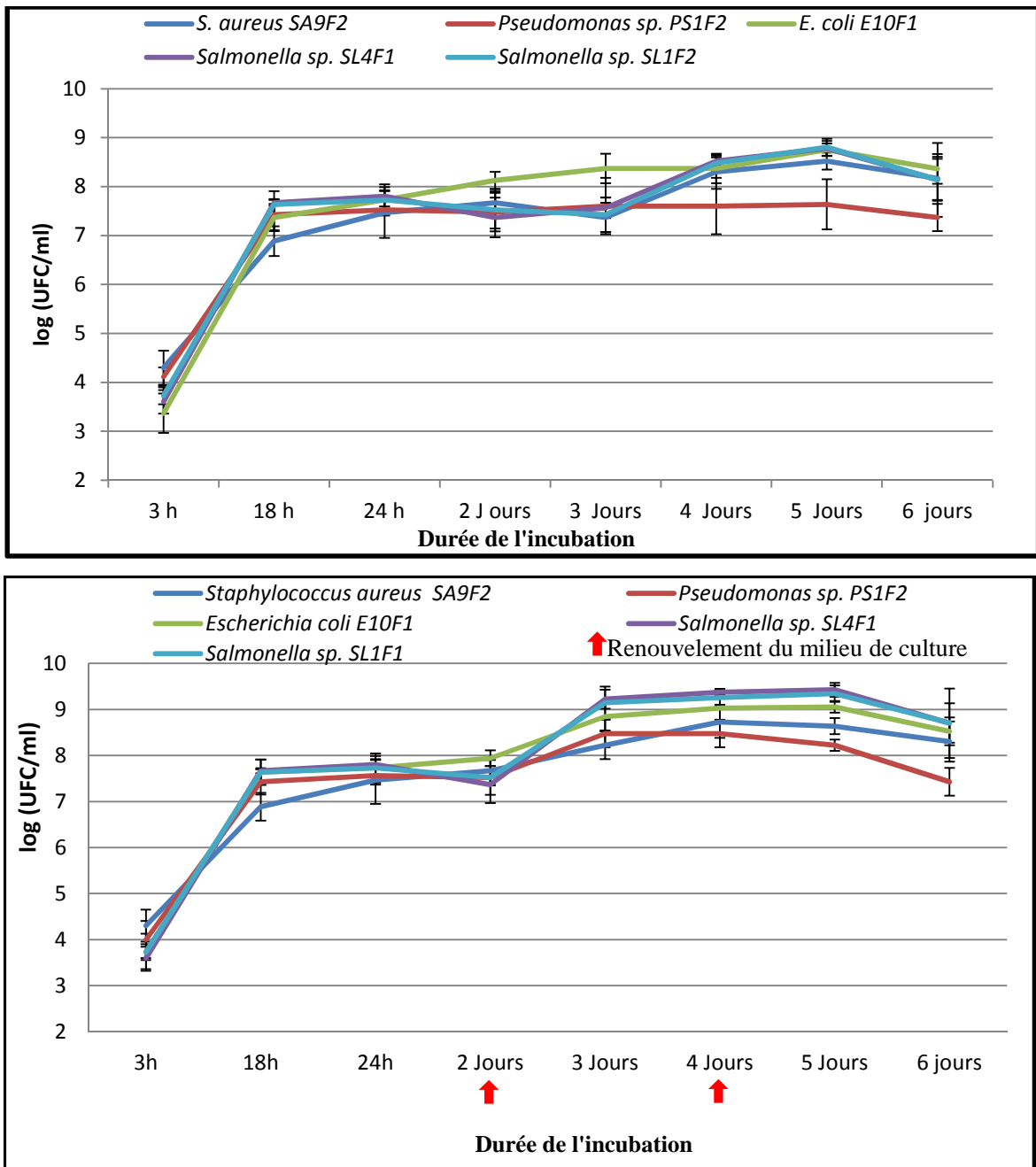


Figure 11 : Cinétique de formation de biofilms par les cinq souches pathogènes sur la surface interne de tubes en polypropylène durant six jours d'incubation. a) sans renouvellement de milieu de culture, b) avec renouvellement de milieu de culture tous les deux jours d'incubation.

3. 2. 2. Avec renouvellement de milieu de culture

Le renouvellement du milieu de culture tous les deux jours d'incubation pour chaque souche pathogène a permis d'obtenir les résultats illustrés sur la figure 11b.

Le renouvellement du milieu de culture influence positivement le nombre de cellules adhérentes, des cinq souches pathogènes, sur la surface interne des tubes en polypropylène, et ceci au vue des résultats obtenus lors du non renouvellement du milieu de culture (Tableau II).

Tableau II : Taux d'augmentation (log UFC/ml) de l'adhésion des souches pathogènes après renouvellement du milieu de culture (tous les deux jours d'incubation).

Durée d'incubation (jours)	<i>S. aureus</i> SA9F2	<i>Pseudomonas</i> sp. PS1F2	<i>E. coli</i> E10F2	<i>Salmonella</i> sp. (SL1F2 et SL4F1)
3	1	1	NS	2
4	NS	1	1	1
5	NS	1	1	1
6	NS	NS	NS	NS

NS : Non significatif

Ces résultats confirment que la richesse du milieu de culture influence positivement la formation de biofilms des souches de *Salmonella* sp. (SL1F2 et SL4F1), *Pseudomonas* sp. PS1F2, *E. coli* E10F2 et *S. aureus* SA9F2. Ceci explique la présence et la persistance de ces bactéries sur les surfaces en milieux agroalimentaires qui sont riches en matières organiques. Dans l'étude de **Buhler et al. (1998)**, une augmentation de la formation de biofilms par *E.coli* a été constatée en augmentant la concentration de glucose dans le milieu. De même, l'augmentation de la concentration en glucose dans un milieu minimum augmentait la formation de biofilms par *P. aeruginosa* cpcl, sur des surfaces en polypropylène, après 48 h d'incubation à 32,5°C (**Arutchelvi et al., 2011**). Donc comme stipulé pour les souches lactiques, les milieux riches en nutriments sont plus favorables à la formation de biofilms sur les surfaces abiotiques.

Dans une étude menée par **Zeraik et Nitschke (2012)**, des souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* pouvaient adhérer sur microplaques en polystyrène durant 4 h d'incubation à différentes températures (4, 25 et 35°C). L'adhésion de ces dernières était meilleure dans du TSB-YE (riche en nutriments) que dans de l'eau peptonée (10 g/l de peptone, 5 g/l de NaCl, 9 g/l de Na₂HPO₄ et 1,5 g/l de KH₂PO₄).

Cependant, **Stepanovic et al. (2004)** ont montré que 122 souches de salmonelles étaient capables de former des biofilms sur microplaques en polystyrène après 24 h d'incubation à 35°C dans différents milieux, avec une meilleure capacité dans le milieu le moins riche en nutriments. Donc cette conclusion doit être prise avec précaution.

L'augmentation du nombre de cellules adhérees de *S. aureus* SA9F2 a été observée au troisième jour d'incubation. Au-delà de cette période, aucune augmentation n'a été retrouvée tout au long du reste de la durée d'incubation malgré le renouvellement du milieu de culture. Ceci nous mène à suggérer que l'apport en nutriments pourrait favoriser la formation de biofilms de *S. aureus*. Cependant, une fois qu'ils atteignent leur maturité, ces nutriments n'avaient aucun effet sur ces biofilms.

Le nombre de cellules adhérees de ces souches pathogènes a commencé à diminuer au sixième jour d'incubation. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'apport en nutriments pouvait favoriser le détachement de biofilms vu la disponibilité de nutriments en suspension. Les mêmes résultats ont été rapportés par **Rochex et Lebeault (2007)**, qui ont trouvé que l'augmentation de la concentration en nutriments pouvait favoriser le détachement de biofilms de *Pseudomonas putida*.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les souches de bactéries lactiques ainsi que celles de bactéries pathogènes sont douées d'une capacité à former des biofilms sur des surfaces en plastique (polystyrène et polypropylène).

Le plastique est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour la fabrication des emballages, du matériel de stockage et de conditionnement des produits mais également des manchons des machines à traire et des moules de fromageries.

Vu que les conditions fournies par le milieu agroalimentaire sont favorables à la formation de biofilms, ces derniers formés par des bactéries pathogènes pourraient avoir des impacts considérables sur la qualité des produits et sur la santé du consommateur. L'utilisation de biofilms de bactéries lactiques comme barrière pourraient peut-être prévenir l'installation de ces biofilms qui une fois formés sont très difficiles à éradiquer. C'est dans cette perspective que la deuxième partie de ce travail a été entamée.

4. Effet barrière des souches lactiques sur l'installation de biofilms de bactéries pathogènes

Les cinq souches lactiques sélectionnées sur la base de leur fort pouvoir d'adhésion sur microplaques en polystyrène et sur tubes en polypropylène ont été testées sous forme de biofilms quant à leur pouvoir antiadhésif à l'égard des cinq souches pathogènes les plus adhérentes. Le dénombrement des souches pathogènes adhérentes, après 24 h d'incubation de chaque souche à la surface interne des tubes en polypropylène dans lesquels des biofilms de 24 h des souches lactiques ont été préalablement installés, ont permis d'obtenir les résultats illustrés sur la figure 12.

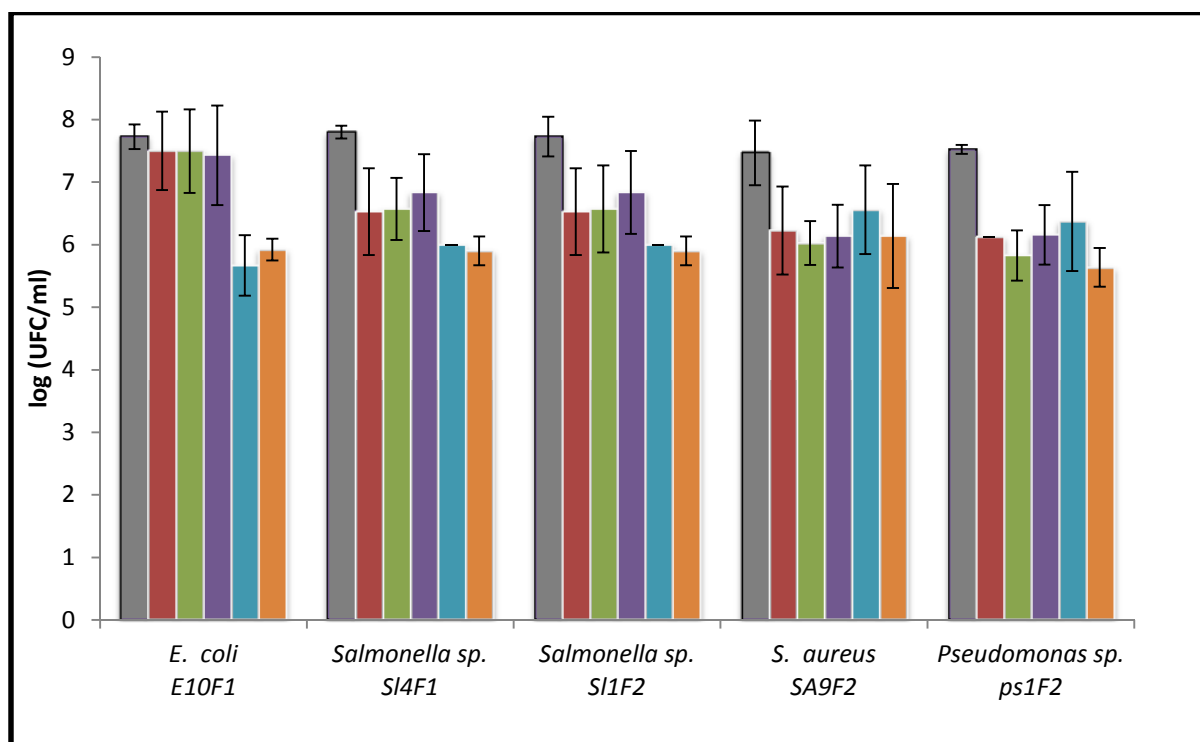


Figure 12 : Inhibition de l'adhésion des cinq souches pathogènes par les biofilms de 24 h des cinq souches lactiques. ■ Témoign négatif (nombre de cellules de bactéries pathogènes adhérentes en absence de bactéries lactiques); nombre de cellules de bactéries pathogènes adhérentes sur la surface interne de tubes en polypropylène en présence de biofilms de: *Lb. pentosus* Lb2F2 ■, *Lb. pentosus* Lb3F2 ■, *Lb. casei* Lb7F2 ■, *Lb. brevis* Lb4F2 ■ et *Lb. plantarum* Lb9F2 ■.

Le tableau III montre le taux de diminution de l'adhésion des souches pathogènes (*Salmonella* SL4F1 et SL1F2, *S. aureus* SA9F2, *Pseudomonas* PS1F2 et *E. coli* E10F1) en présence des souches lactiques (*Lb. pentosus* Lb2F2 et Lb3F2, *Lb. brevis* Lb4F2, *Lb. casei* Lb7F2 et *Lb. plantarum* Lb9F2).

Tableau III : Taux de diminution (log UFC/ml) de l'adhésion des souches pathogènes en présence des souches lactiques.

Souches	<i>Lb. pentosus</i> Lb2F2	<i>Lb. pentosus</i> Lb3F2	<i>Lb. brevis</i> Lb4F2	<i>Lb. casei</i> Lb7F2	<i>Lb. plantarum</i> Lb9F2
<i>E. coli</i> E10F1	0,20	2,10	0,30	0,30	1,80
<i>Salmonella</i> SL4F1	1,30	1,80	1,30	1,00	1,30
<i>Salmonella</i> SL1F2	1,20	1,70	1,20	1,00	1,90
<i>S. aureus</i> SA9F2	1,24	1,00	1,45	1,30	1,80
<i>Pseudomonas</i> sp. PS1F2	1,40	1,20	1,70	1,40	1,90

Les souches *Lb. pentosus* Lb2F2 et *Lb. casei* Lb7F2 pouvaient diminuer à des taux allant de 1,0 à 1,4 log UFC/ml l'adhésion de chacune des deux souches de *Salmonella* (SL4F1 et SL1F2), celle de *S. aureus* SA9F2 et celle de *Pseudomonas* sp. PS1F2. Toutefois, ces souches lactiques n'ont pas diminué le nombre de cellules adhérees d'*E. coli* E10F2 qui possédait le meilleur potentiel d'adhésion sur la surface interne des tubes en polypropylène (de 3,36 à 8,36 log UFC/ml de 3h à six jours d'incubation). Ces mêmes résultats ont été obtenus avec la souche *Lb. brevis* Lb4F2 à l'exception du fait que cette dernière pouvait diminuer l'adhésion de la souche PS1F2 de 1,7 log UFC/ml.

Quant à la souche *Lb. pentosus* Lb3F2, elle a diminué de 1 log UFC/ml le nombre de cellules adhérees de *S. aureus* SA9F2 et de *Pseudomonas* PS1F2, de 1,7 log UFC/ml celui des deux souches de *Salmonella* (SL4F1 et SL1F2) et de 2 log UFC/ml celui d'*E. coli* E10F2. Ceci montre clairement l'effet barrière exercé par cette souche lactique.

La souche *Lb. plantarum* Lb9F2 a montré le meilleur potentiel antiadhésif à l'égard des souches pathogènes avec une réduction du nombre de cellules adhérees de 2 log UFC/ml à l'exception de la souche *S. aureus* SA9F2 dont la réduction n'a été que de 1,4 log UFC/ml.

L'analyse statistique (LSD, ANOVA, XLSTAT 2009) comparant le nombre de cellules adhérees en absence et en présence des souches lactiques préinstallées sur la surface interne des tubes en polypropylène, a révélé une différence significative ($P < 0,05$) entre le

nombre de cellules adhérees des deux souches de *Salmonella* (SL4F1 et SL1F2), *S. aureus* SA9F2 et *Pseudomonas* PS1F2 incubées seules ou en présence des souches *Lb. pentosus* Lb2F2, *Lb. casei* Lb7F2 et *Lb. brevis* Lb4F2 .

Cependant aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été retrouvée entre le nombre de cellules d'*E. coli* E10F2 adhérees en absence et en présence des trois souches lactiques. La diminution dans le nombre de cellules pathogènes adhérees est aussi significative ($P < 0,05$) en présence de la souche *Lb. plantarum* Lb9F2 ainsi qu'en présence de la souche *Lb. pentosus* Lb3F2 à l'exception du fait que pour cette dernière la diminution du nombre des cellules adhérees de *S. aureus* SA9F2 n'a pas été significative ($P > 0,05$).

Cet effet barrière exercé par les souches de bactérie lactiques à l'égard de celles des bactéries pathogènes pourrait être dû à l'effet barrière physique fourni par les souches de bactéries lactiques ou par production de métabolites antiadhésifs et/ou antibactériens notamment des bactériocines, biosurfactants et des acides organiques, ou encore des polysaccharides ou des enzymes.

Dans l'étude de **Guerrieri et al. (2009)**, les biofilms de sept jours formés sur microplaques en polystyrène des deux souches *Lb. plantarum* 35d et *En. casseliflavus* IM416K1, productrices de bactériocines, pouvaient réduire l'adhésion de *L. monocytogenes* de 3,9 et 3,7 log UFC/ml respectivement après 10 jours d'incubation à une température de réfrigération. Quant aux deux souches *Lb. plantarum* 396/1 et *En. faecalis* JH2-2, qui ne produisaient pas de bactériocines, elles pouvaient réduire l'adhésion de cette dernière de 3,8 log UFC/ml et de 1 log UFC/ml après 10 jours d'incubation. Cette réduction était expliquée par l'effet de compétition entre les bactéries et au *quorum sensing* qui pouvait renforcer l'accès aux nutriments et la défense collective à l'égard de la flore conjointe.

Dans l'étude de **Winkelströter et al. (2011)**, le nombre de cellules adhérees de *L. monocytogenes* diminuait de 3 log en présence de la souche *Lb. sakei* ATCC 15521 qui ne produisait pas de bactériocines, et de 4,8 log en présence du surnageant de culture de *Lb. sakei* productrice de la sakacine 1, après 24h d'incubation sur acier inoxydable à 37°C.

Rodriguez et al. (2006) ont rapporté que les deux souches *Lb. casei* CECT-5275 et *Lb. pentosus* CECT-4023 pouvaient produire des biosurfactants au bout des quatre premières heures d'incubation, à 31°C dans le bouillon MRS. Ces derniers sont reconnus intervenant dans la désorption des cellules.

En effet, dans l'étude de **Gudin et al. (2010)**, une souche de *Lb. paracasei* pouvait produire un biosurfactant qui pouvait réduire l'adhésion de *Streptococcus sanguis* 12 (72,9%), *Streptococcus mutans* HG985 (31,4%), *S. aureus* (76,8%), *S. epidermidis* (72,9%), *P. aeruginosa* (21,2%) et *E. coli* (11,8%), après 4h d'incubation à 4°C dans du TSB, sur microplaques en polystyrène.

5. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antiadhésive (anti-biofilm) des souches lactiques

5. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches lactiques (correspondants à 10^9 UFC/ml) a été testée en utilisant la méthode des puits en testant le surnageant de culture natif et neutralisé issus des bouillons de culture MRS et TSB-YE.

La **figure 13** montre les résultats du test d'activité antibactérienne des surnageants de culture des souches *Lb. pentosus* Lb2F2 et Lb3F2, *Lb. brevis* Lb4F2, *Lb. casei* Lb7F2 et *Lb. plantarum* Lb9F2, obtenus dans les bouillons MRS et TSB-YE à l'égard des souches pathogènes : *Salmonella* (SL1F2 et SL4F1), *Pseudomonas* sp. (PS1F2), *E. coli* (E10F1) et *S. aureus* (SA9F2).

Aucune activité antibactérienne n'a été observée, en utilisant les surnageants natifs des souches lactiques cultivées dans le bouillon TSB-YE, à l'égard des cinq souches pathogènes. Le surnageant de culture de la souche *Lb. casei* Lb7F2 dans du TSB-YE, ayant montré un pH légèrement acide (5,8), n'a également révélé aucune activité antibactérienne. Ceci nous amène à stipuler que l'effet barrière exercé par les souches lactiques ne serait pas dû à l'activité antibactérienne de ces souches lactiques.

Quant aux surnageants de culture natifs des souches de *Lb. pentosus* (Lb2F2 et Lb3F2) et de *Lb. casei* Lb4F2, obtenus dans le bouillon MRS, ils ont révélé une activité antibactérienne à l'égard des cinq souches pathogènes. Les surnageants de culture des deux souches *Lb. plantarum* Lb9F2 et *Lb. brevis* Lb4F2, obtenus dans le même milieu, possédaient une activité antibactérienne à l'égard de toutes les souches pathogènes sauf à l'égard de SA9F2 et SL1F2 et de SA9F2 respectivement.

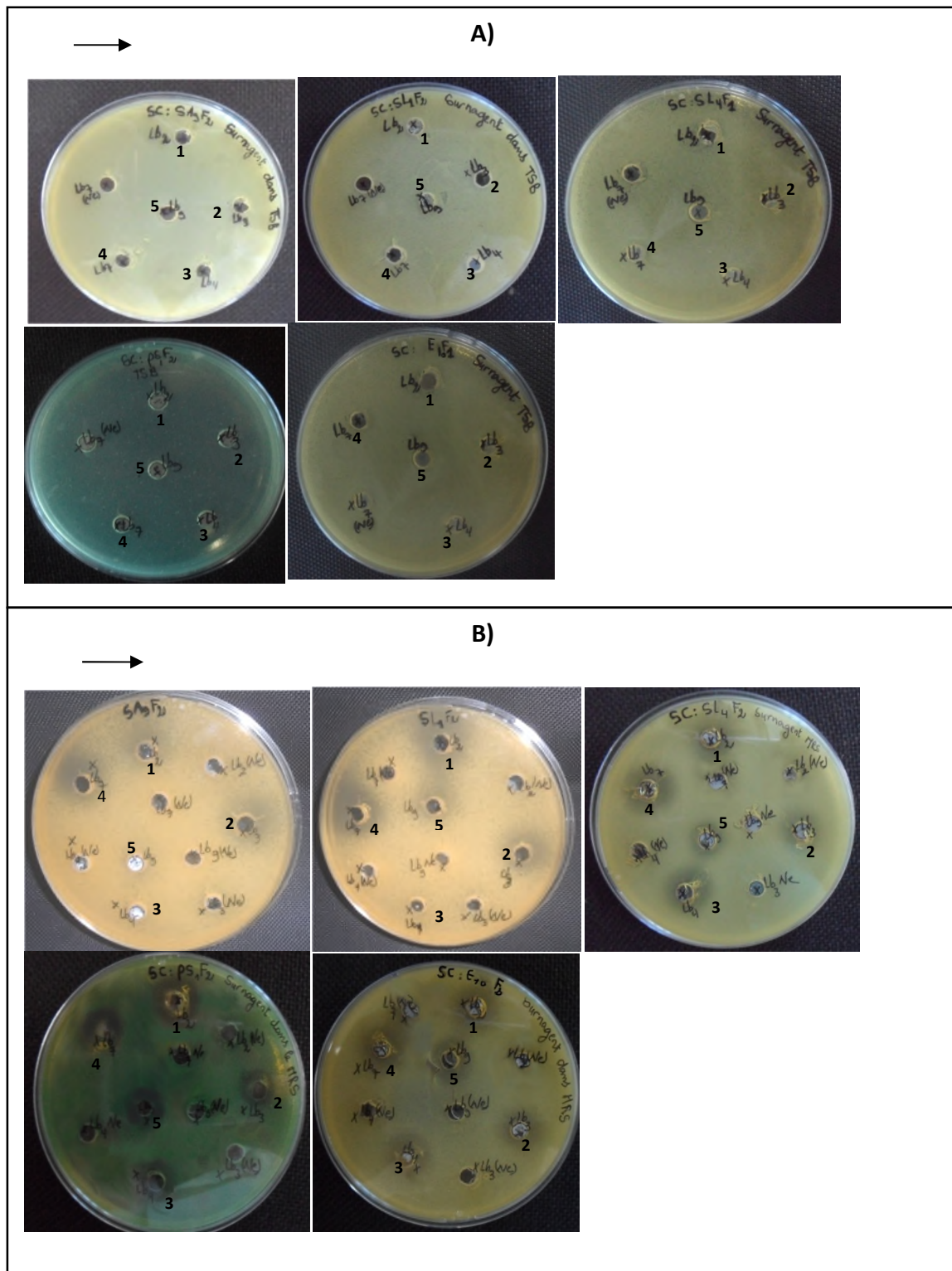


Figure 13 : Test de l'activité antibactérienne des cinq souches lactiques (1: Lb2F2; 2: Lb3F2; 3: Lb4F2; 4: Lb7F2; 5: Lb9F2) à l'égard des souches pathogènes (A partir de la flèche et suivant les aiguilles d'une montre on a: SA9F2; S11F2; S14F2; E10F2; Ps1F2). (A : surnageant brute issu du bouillon TSB-YE, B : surnageant brut et neutralisé issu du bouillon MRS).

Les surnageants de culture des cinq souches lactiques, issus du bouillon MRS, n'ont gardé aucune activité antibactérienne après neutralisation à un pH de 6,5.

Ces résultats suggèrent que l'effet antibactérien observé avec le surnageant de culture issu du bouillon MRS serait probablement dû à l'effet pH et aux acides organiques produits par ces souches lactiques. Cependant, cette activité pourrait également être le résultat de l'action de substances actives uniquement à pH acide (cas de certaines bactériocines) ou à une synergie substance active /pH acide. Dans l'étude de **Lade et al. (2005)**, *Lb. plantarum* pouvait produire une bactériocine qui était active uniquement à pH acide. De même, la pediocine produite par *Lb. plantarum* DDER 11007 était plus active à pH acide qu'à pH neutre (**Bernbom et al., 2006**).

Les mesures de pH des surnageants de culture ont montré des différences remarquables entre les valeurs de pH des surnageants obtenus à partir des bouillons MRS et TSB-YE (tableau IV), quoique les deux sont récupérés suite à une culture de 18 h de la même souche lactique correspondant à 10^9 UFC/ml.

Tableau IV : Valeurs du pH des surnageants de culture des souches lactiques, dans les bouillons MRS et TSB-YE, obtenus après 18 h d'incubation à 30°C.

	Bouillon stérile	<i>Lb. pentosus</i> Lb2F2	<i>Lb. pentosus</i> Lb3F2	<i>Lb. brevis</i> Lb4F2	<i>Lb. casei</i> Lb7F2	<i>Lb. pluntarum</i> Lb9F2
MRS	6,5	4,3	4,6	5,2	4,4	4,9
TSB-YE	6,8	6,01	6,6	6,6	5,8	6,5

Les résultats obtenus (tableau IV) révèlent que la culture de 18 h des souches lactiques (10^9 UFC/ml) ne permettait pas l'acidification du milieu TSB-YE (pH= 5,8-6,6), indiquant que l'effet barrière exercé par les souches lactiques (incubées en TSB-YE) n'était pas dû à l'effet pH et aux acides organiques. Par contre, ces souches lactiques cultivées dans le bouillon MRS (pH= 6,5) ont pu acidifier le milieu et diminuer le pH à des valeurs comprises entre 4,3-5,2. Cette différence serait probablement due à la faible teneur en glucose (2,5 g/l) du bouillon TSB-YE par rapport au bouillon MRS (20 g/l), ce qui réduirait le pouvoir acidifiant des souches lactiques.

Ces résultats suggèrent que l'effet antiadhésif observé chez les souches lactiques, cultivées dans le bouillon TSB-YE, n'était pas dû à l'activité antibactérienne de ces dernières à l'égard des souches pathogènes. Cependant, l'effet de dilution des substances actives dans les surnageants de culture ne peut être écarté. Une optimisation des conditions de culture serait nécessaire afin de mettre en évidence l'implication de telle ou telle substance produite par les souches lactiques, et qui serait responsable de la diminution des taux d'adhésion des souches pathogènes.

Récemment, **Vuotto et al. (2013)** ont démontré que le surnageant de culture de la souche *Lb. brevis* CD2 pouvait diminuer de 56% (de la valeur de la DO) le biofilm de *Prevotella melaninogenica* (PM1) (bactérie opportuniste anaérobie) après 96 h d'incubation, cette inhibition était aussi observée après dilution du surnageant à 1/10 et à 1/100 ainsi qu'en présence de la souche *Lb. brevis* CD2.

L'absence d'activité antibactérienne n'exclut pas un effet antiadhésif. Ceci a déjà été rapporté dans la littérature. Dans leur étude, **Maldonadol et al. (2007)** ont remarqué que les surnageants acides de souches de *Lb. fermentum* pouvaient inhiber la croissance et la formation de biofilms de *Klebsiella* sp. après 6 h d'incubation à 37°C sur microplaque en polystyrène ; cette inhibition était attribuée à la production d'acide lactique. Par contre, les surnageants neutralisés pouvaient inhiber la formation de biofilms mais n'avaient aucun effet sur la croissance de cette espèce. Ceci serait peut-être dû à la production de molécules inhibitrices n'ayant aucun effet sur la croissance comme les biosurfactants ou autres substances.

De ce fait, nous avons testé l'effet antiadhésif des surnageants de nos cultures lactiques produites en TSB-YE en dépit de l'absence de toute activité antibactérienne.

V. 2. Mise en évidence de l'activité antiadhésive (anti-biofilm)

Les résultats obtenus lors de l'incubation des souches pathogènes dans des tubes en polypropylène conditionnés pendant 24 h avec le surnageant de culture de chacune des souches lactiques testées sont présentés sur la figure 14.

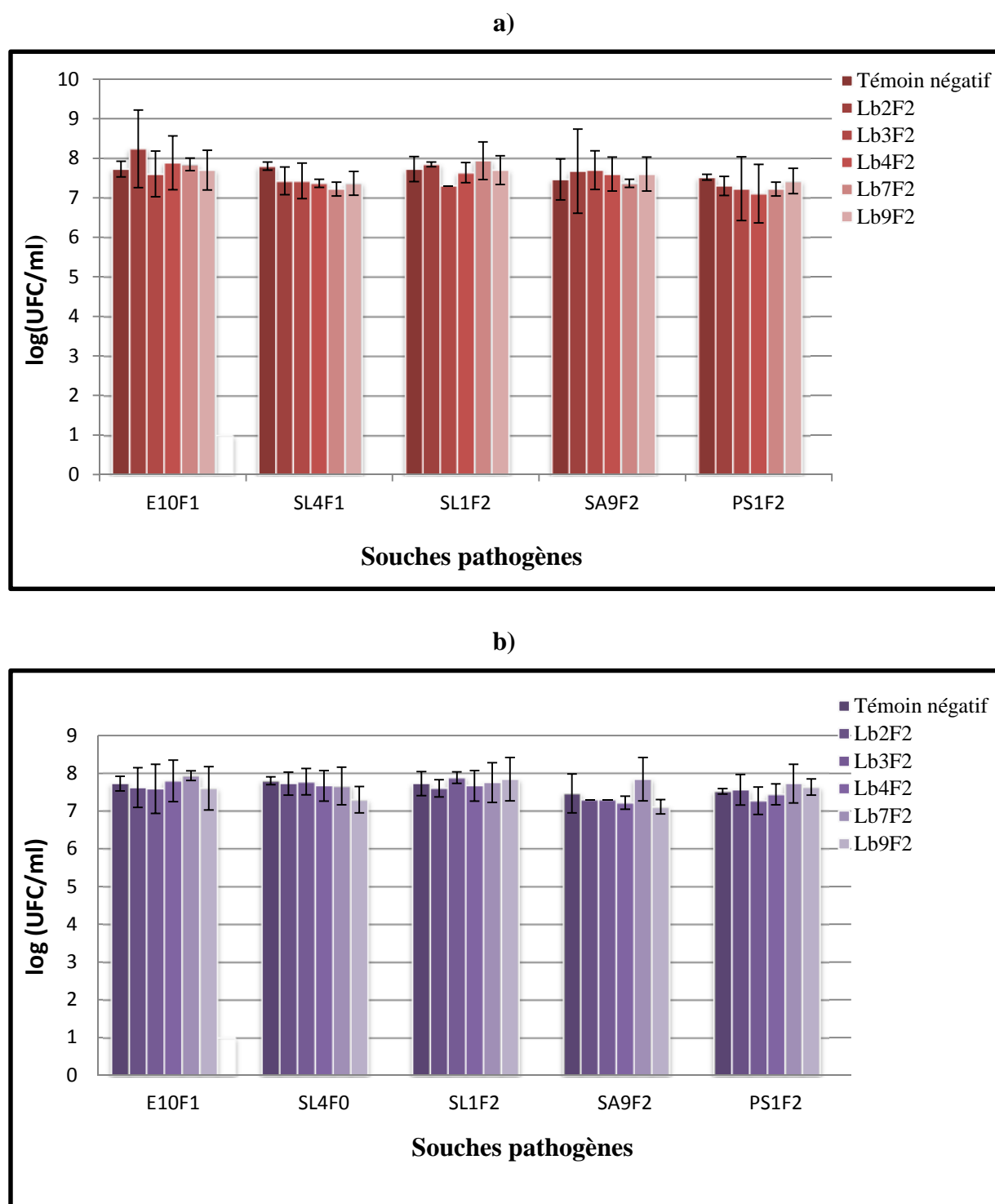
Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre la capacité d'adhésion des souches pathogènes sur la surface interne des tubes stériles ou préalablement conditionnés avec le surnageant de culture de chacune des cinq souches lactiques cultivées

dans du bouillon TSB-YE. Les mêmes résultats ont été obtenus en testant l'adhésion des souches pathogènes lors de leur incubation en présence d'un mélange formé de 50 % de bouillon TSB-YE et 50 % du surnageant de culture de chaque souche lactique.

Les cinq souches lactiques sélectionnées possèdent toutes une capacité à former des biofilms sur la surface interne des tubes en polypropylène et à diminuer l'adhésion des cinq souches pathogènes. Cependant, aucune inhibition de l'adhésion n'a été retrouvée lors de l'utilisation de leur surnageant de culture.

De ce fait, l'effet antiadhésif exercé par les souches lactiques semblerait être dû à un effet de barrière physique par encombrement stérique ou par le phénomène du *QS*. Toutefois, l'effet de métabolites antiadhésifs n'est pas à écarter même si aucun effet n'a été observé avec le surnageant de culture. Ceci pourrait être la résultante d'un effet de dilution des métabolites actifs dans le surnageant de culture par rapport à un état plus concentré lors de la présence de la bactérie.

Dans une étude menée par **Kumada *et al.* (2009)**, trois souches d'*En. Faecium* qui ne pouvaient pas former de biofilms, pouvaient réduire d'environ 1 à 2 log l'adhésion de souches de *Streptococcus*, sur microplaques en polystyrène. Cependant les surnageants de culture de ces souches ne possédaient ni une activité antibactérienne ni une capacité à diminuer l'adhésion des souches de *Streptococcus*. Ceci a été expliqué par le fait que les souches d'*En. faecium* produisaient peu d'exosubstances inhibitrices capables de réduire la formation de biofilms des streptocoques.



Conclusion

Conclusion

Dans cette étude les souches lactiques et pathogènes faisant partie de la collection des souches de laboratoire de microbiologie appliquée, ont été testées quant à leur pouvoir d'adhésion sur microplaques en polystyrène. Parmi les soixante et une souches lactiques testées (29 *Lactobacillus*, 12 *Lactococcus* et 20 *Enterococcus*), quarante quatre d'entre elles (22 *Lactobacillus*, 6 *Lactococcus* et 4 *Enterococcus*) ont été trouvées capables d'adhérer faiblement, moyennement ou fortement au polystyrène. Les cinq souches ayant montré la meilleure capacité d'adhésion ont été identifiées génotypiquement, par séquençage de leur ADNr 16S, comme étant des lactobacilles dont deux souches de *Lactobacillus pentosus* (Lb2F2, Lb3F2), une de *Lactobacillus brevis* (Lb4F2), une de *Lactobacillus casei* (Lb7F2) et une de *Lactobacillus plantarum* (Lb9F2). De même, parmi les soixante seize souches pathogènes testées dont 22 appartenant à *Salmonella* sp., 21 à *Staphylococcus aureus*, 19 à *Escherichia coli* et 15 à *Pseudomonas* sp., soixante treize ont été révélées faiblement, moyennement ou fortement adhérentes. Les cinq souches les plus adhérentes criblées ont été deux souches de *Salmonella* sp. (S11F2, S14F1), une de *S. aureus* (SA9F2), une d'*E. coli* (E10F1) et une de *Pseudomonas* sp. (Ps1F2).

L'étude des cinétiques de formation de biofilms sur la surface interne de tubes en polypropylène, par les cinq souches lactiques et pathogènes, criblées possédant le meilleur potentiel d'adhésion sur polystyrène, a montré que les premières étapes d'adhésion ont lieu après 3 h d'incubation dans les bouillons TSB-YE et TSB respectivement. Le prolongement de la durée d'incubation jusqu'à six jours a permis d'observer les deux étapes de formation d'un biofilm en l'occurrence l'adhésion et la maturation et ce pour les souches lactiques et pathogènes ainsi que l'étape finale de détachement cellulaire dans le cas des souches pathogènes.

L'effet positif du renouvellement du milieu de culture, tous les deux jours, durant les six jours d'incubation sur la formation du biofilm, pour chacune des cinq souches lactiques et pathogènes, a été démontré. En effet l'apport en nutriments permet la croissance des cellules au sein des biofilms indiquant que les surfaces des milieux agroalimentaires, riches en matière organique, sont favorables à la formation de ces derniers.

Les souches lactiques *Lb. pentosus* (Lb2F2, Lb3F2), *Lb. casei* Lb7F2, *Lb. brevis* Lb4F2 pouvaient diminuer de 1 à 1,7 log l'adhésion de chacune des deux souches de *Salmonella* (SL4F1 et SL1F2), de *S. aureus* SA9F2 et de *Pseudomonas* PS1F2. Cependant

ces souches lactiques n'ont pas diminué le nombre des cellules adhérees d'*E. coli* E10F1 qui possède le meilleur potentiel d'adhésion sur la surface interne des tubes en polypropylène, à l'exception de la souche *Lb. pentosus* Lb3F2 qui a montré un fort pouvoir d'inhibition (2 log) de cette dernière. Par ailleurs, la souche *Lb. plantarum* Lb9F2 a pu réduire le nombre de cellules adhérees de toutes les souches pathogènes (y compris *E. coli* E10F1) de 2 log à l'exception de la souche *S. aureus* SA9F2 dont la réduction n'était que de 1,4 log.

Cet effet antiadhésif exercé par les souches de bactéries lactiques serait probablement dû à l'effet de barrière physique de la souche et /ou à des substances antiadhésives qui n'ont pas pu être mises en évidence dans leurs surnageants de culture, vu que ces derniers n'ont révélé aucun effet sur l'adhésion de ces souches pathogènes probablement sous l'effet du phénomène de dilution.

Des études plus poussées sont nécessaires afin d'identifier les métabolites produits par les souches lactiques et qui sont responsables de la réduction de la formation de biofilms des souches pathogènes; et ceci pour une éventuelle utilisation de ces souches lactiques ou de leurs métabolites antiadhésifs pour prévenir ou inhiber l'installation et la formation de biofilms par des bactéries pathogènes.

En perspectives nous envisageons de:

- Tester l'effet antiadhésif du surnageant concentré et obtenu dans des conditions de cultures optimisées.
- Tester l'effet antiadhésif de ces souches lactiques à l'égard d'autres souches pathogènes et sur d'autres matériaux que le plastique.
- Mettre en évidence, purifier et caractériser les molécules responsables de l'effet antiadhésif.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Allion A., Baron I.P., Boulange-Petermann L.** (2006). Impact of Surface Energy and Roughness on Cell Distribution and Viability. *Biofouling*. **22**: 269-278.
- **Allison D.G., Ruiz B., San Jose C., Jaspé A., Gilbert P.** (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters*. **167**(2): 179-184.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I.** (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*. **17**: 454-468.
- **Anwar H. et Costerton J. W.** (1992). Effective use of antibiotics in the treatment of biofilm associated infections. *American Society of Microbiology News*. **58**: 665-668.
- **Archibald A.R., Hancock I.C., Harwood C.R.** (1993). Cell wall structure, synthesis and turnover in *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria. *American Society of Microbiology News*. **3**: 381-410.
- **Arutchelvi J., Joseph C., Doble M.** (2011). Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL. *Biochemical Engineering Journal*. **56**: 37- 45.
- **Barak J.D., Gorski L., Naraghi-Arani P., Charkowski A.O.** (2005). *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 5685-5691.
- **Barak J.D., Jahn C.E., Gibson D.L., Charkowski, A.O.** (2007). The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **20**: 1083-1091.
- **Bellon-Fontaine M.N. et Cerf O.** (1991). Mechanisms of microorganisms adhesion to surfaces: factors influencing the adhesion. *Journal des Industries Alimentaires et agricoles*. **108**: 13-17.
- **Beloin C., Roux A., Ghigo J.M.** (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **322**: 249-289.
- **Bernbom N., Licht R.L., Saadbye P., Vogensen F.K., Norrung B.** (2006). *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an *in vitro*

continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *International Journal of Food Microbiology*. **108**: 10-14.

- **Bharathi P., Bhowmick P.P., Shekar M., Karunasagar I.** (2011). Biofilm formation by pure and mixed culture of *Lactobacillus* isolates on polystyrene surface in varying nutrient conditions. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*. **1** (1): 93-98.
- **Blanca E.G.A., Issac K.O., Cann S.E.M., Isabel G.L., Carlos R.** (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. **19**: 670–680.
- **Bove P., Capozzib V., Garofalob C., Rieuc A., Spanob G., Fioccoa D.** (2012). Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiological Research*. **167**:187– 193.
- **Bower C.K., Daeschel M.A., Mc Guire J.** (1998). Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion. *Journal of Dairy Science*. **81**: 2771—2778.
- **Bower C.K., McGuire J., Daeschel M.A.** (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*. **7**: 152–157.
- **Breyers J.D. et Ratner J.P.** (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *American Society for Microbiology News*. **70**: 232–237.
- **Briandet R., Meylheuc T., Maher C., Bellon-Fontaine M.N.** (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 5328-5333.
- **Brul S. et Coote P.** (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. **50** (2): 1-17.
- **Brzozowski B., Wlodzimierz B., Piotr G.** (2011). The Adhesive Capability of Two *Lactobacillus* Strains and Physicochemical Properties of Their Synthesized Biosurfactants. *Food Technology and Biotechnology*. **49** (2): 177–186.
- **Buhler T., Ballestero S., Desai M., Brown M.R.W.** (1998). Generation of a reproducible nutrient-depleted biofilm of *Escherichia coli* and *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*. **85**: 457–462.
- **Byczkowski J. et Gessner T.** (1988). Biological role of superoxyde ion radical. *International Journal of Biochemistry*. **20**: 569-580.

- **Caro T., Tang H., Liang X., Wang A., Auner G.W., Salley S.O., Simon N. K.Y.** (2005). Nanoscale Investigation on Adhesion of *E. coli* to Surface Modified Silicone Using Atomic Force Microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. **94**: 167-176.
- **Carpentier B. et Cerf O.** (1993). Biofilms and their Consequences with Particular References to Hygiene in the Food Industry. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**: 499-511.
- **Castonguay M.H., Van der Schaaf S., Koester W.** (2006). Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence- proficient bacteria. *Research in Microbiology*. **157**: 471- 478.
- **Cerning J., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M.** (1992). Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. **75** (3): 692.
- **Chmielewski R.A.N. et Frank J.K.** (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**: 22-32.
- **Chorianopoulos N.G., Giaouris E.D., Kourkoutas Y., Nychas G.J.** (2010). Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. *Applied and Environmental Microbiology*. **76** (6): 2018-2022.
- **Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L.** (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. **121** (1-2): 1-17.
- **Costerton J.W.** (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **15**: 137-140.
- **Costerton J.W.** (1999). Introduction to biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **11** (4): 217-221.
- **Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J.** (1978). How bacteria Stick. *Scientific American*. **238**: 86-95.
- **Costerton J.W., Irvin R.T., Cheng K.G.** (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. **35**: 299-324.
- **Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.** (2005). Bacterial lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential. *Current Proteins and Peptides Science*. **6**: 61-75.
- **Cotter P.D., Hill C.** (2003). Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Review*. **67**(3): 429-453.

- **Coulibaly I.** (2010). Contribution à l'étude de la résistance au séchage des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Université de Liège (Gembloux, Belgique). 260 p.
- **Davey M. E.** (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. **185** (3): 1027-1036.
- **Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P.** (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **76** (1): 159.
- **Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D.** (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In: Bactéries lactiques*. Ed. *Lorica Uriage* (Paris). **1** : 25-116.
- **Dewanti R., et Wong A.C.** (1995). Influence of Culture Conditions on Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. **26**: 147-164.
- **Dobretsov S., Teplitski M., Paul V.** (2009). Mini-review: Quorum sensing in the marine environment and its relationship to *biofouling*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. **25**: 413-427.
- **Donlan R.M.** (2000). Biofilms: Microbial Life on Surface. *Emerging Infectious Diseases*. **8**: 881-890.
- **Donlan R.M.** (2002). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*. **7**(2): 277-281.
- **Dortu C.** (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux. 155 p.
- **Dreeszen P.H.** (2003). The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking water Systems. Ed. *Edstrom Industries Inc.*
« [http://www.edstrom.com/DocLib/4230-DS3100 CompleteBiofilm.pdf](http://www.edstrom.com/DocLib/4230-DS3100%20CompleteBiofilm.pdf) ». Consulté le 05/10/2013.
- **Duguid J.P., Anderson E.S., Campbell I.** (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *Journal of Pathology and Bacteriology*. **92** (1): 107-138.
- **Ennahar S., Aoude-Werner D., Assobhei O., Hasselmann C.** (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology*. **85**: 521–526.

- **Filloux A. et Vallet I.** (2003). Biofilm: mise en place et organization d'une communauté bactérienne. *Médecine /Science*. **19**: 77-83.
- **Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L., Ben Oma N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. **120** (1-2): 51-70.
- **Ganesh Kumar C. et Anand S.K.** (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. **42** : 9–27.
- **Genevaux P., Bauda P., DuBow M.S., Oudega B.** (1999). Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Archives in Microbiology*. **172**: 1–8.
- **Gudin E.J., Rocha V., Teixeira J.A. Rodrigues L.R.** (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*. **50** (4) : 419-424.
- **Guerrieri E., Simona N., Patrizia M., Carla S., Ramona I., Immacolata A., Moreno B.** (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*. **20**: 861–865.
- **Guiraud J.P. et Rosec J.P.** (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Ed. *AFNOR*. Pp. 237-251.
- **Heng N.C., Burtenshaw G.A., Jack R.W., Tagg J.R.** (2007). Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 7763-7766.
- **Herrera J.J.R., Cabo M.L., González A., Pazos I., Pastoriza L.** (2007). Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology*. **24** (6): 585-591.
- **Heydron A., Nielsen A. T., Hentzer M., Stenberg C., Givskov M., Ersboll, B. K.** (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*. **146**: 2395-2407.
- **Ho T.N.T., Tuan N.N., Deschamps A., Caubet R.** (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Proceeding of the International Workshop on Food Safety and Processing Technology*. **42**: 134- 142.
- **Hogg T.** (2005). Essential Microbiology. *John Wiley & Sons*. **14**: 188-190.
- **Humphrey T.J., Slater E., McAlpine K., Rowbury R.J., Gilbert R.J.** (1995). *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen

peroxide also survive longer on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (8): 3161-3164.

- **Ibarreche M.P., Castellano P., Vignolo G.** (2014). Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Science*. **96**: 295–303.
- **Irie Y. et Parsek M.R.** (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **322**: 67- 84.
- **Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E., Romeo T.** (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **184** (1): 290-301.
- **Jerônimo H.M.Â., Queiroga R.C.R., Costa C.V., Barbosa I.M., Conceição M.L., Evandro L.S.** (2012). Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food processing plants as affected by growth medium, surface type and incubation temperature. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **48**: (4): 738-745.
- **Joseph B., Otta S.K., Karunasagar I., Karunasagar I.** (2001). Biofilm formation by *Salmonella* sp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. **64** (3): 367-372.
- **Khalid N.M. et Marth E.H.** (1990). *Lactobacilli*, their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese. *Review of Dairy Science*. **73**: 158-167.
- **Khalilzadeh P.** (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation d'inhibiteurs potentiels du *Quorum Sensing*. Thèse de Doctorat en Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénierie. Université de Toulouse (France). 199 p.
- **Kim S.H. et Wei C.I.** (2009). Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*. **9** (72): 1841-1847.
- **Kim Y., Oh S., Kim S.H.** (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **379**: 324–329.
- **Kodjikian L. et Burillon C.** (2003). Biofilm formation on intraocular lenses by a clinical strain encoding the *ica* locus: a scanning electron microscopy study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **44**: (10): 4382-4387.

- **Kolodkin-Gal I., Cao S., Chai L., Böttcher T., Kolter R., Clardy J., Losick R.** (2012). A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell*. **149** (3): 684–692.
- **Kong S.R. et Davison A.** (1980). The role of interaction between O₂, H₂, OH, and O²⁻ in free radical damage to bacteriological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **204**: 18-29.
- **Kubota H., Shouko S., Nomura N., Tokuda H., Hiroo U.** (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **106** (4): 381–386.
- **Kumada M., Mizuho M., Ryoma N., Hideo Y., Hideki Y., Junji T., Hidenobu S.** (2009). Inhibiting effects of *Enterococcus faecium* non-biofilm strain on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **42**:188-191.
- **Lade H.S., Chitanand M.P., Gyananath G., Kadam T.A.** (2006). Studies On Some Properties of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus* Species Isolated From Agro Based Waste. *The Internet Journal of Microbiology*. **2** (1). «<http://ispub.com/IJMB/2/1/13427>». Consulté le 03/01/2014.
- **Lazar V.** (2011). Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power. *Anaerobe*. **17**: 280-285.
- **Leclerc H., Gaillard F. L., Simonet M.** (1994). Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. Ed. DOIN (Paris). 445 p.
- **Lepargneur J.P. et Rousseau V.** (2002). Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. **3**: 485-494.
- **Leriche V., Chassaing D., Carpentier B.** (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. **51**: 169-182.
- **Liu S. K.** (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. **83**(2): 115-131.
- **Mack D.** (1999). Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Hospital Infections (Supplied)*. **43** (25): 113-125.

- **Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Magny P.** (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Glass, Polypropylene and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *Journal of Food Protection*. **53**: 742-746.
- **Mafu A.A., Roy D., Lemay M-J., Montpetit D.** (2002). Evidence for *Escherichia coli* O157:H7 Attachment to Water Distribution Pipe Materials by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Food Protection*. **65**: 1970-1975.
- **Maldonadol N.C., Silva de Ruiz C., Cecilia M., Nader-Macias M.E.** (2007). A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. A. Méndez-Vilas. pp.52-59.
- **Martine M.C. Velraeds M., Van Der Mei H.C, Reid G., Busscher H.J.** (1996). Inhibition of Initial Adhesion of Uropathogenic *Enterococcus faecalis* by Biosurfactants from *Lactobacillus* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (6): 1958–1963.
- **McKenney D. et Hubner J.** (1998). The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infection and Immunity*. **66** (10): 4711-4720.
- **Mercier C., Durrieu C., Briandet R., Domakova E., Tremblay J., Buist G., Kulakauskas S.** (2002). Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Molecular Microbiology*. **46** (1): 235-243.
- **Messaoudi S., Kergourlay G., Rossero A., Ferchichi M., Prévost H., Drider D., Mohamed M., Dousset X.** (2011). Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. *International Journal of Microbiology*. **14** (2). 103 - 110.
- **Meylheuc T., Renault M., et Bellon-Fontaine M.N.** (2006). Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. **109**: 71–78.
- **Moretro T., Hermansen L., Holck A.L., Sidhu M.S., Rudi K., Langsrud S.** (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (9): 5648-5655.
- **Normanno G., Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Cirsetti E., Celano G.V.** (2007). Occurrence,

characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. **115** (3): 290-296.

- **O'Toole G. A. et Kolter R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. **30** (2) : 295–304.
- **O'Toole G.A, Pratt L.A., Warnick P.I., Neuman D.K., Weaver V.B., Koeter R.** (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology*. **310**: 91-109.
- **Palumbo E., Deghorain M., Cocconcelli P.S., Kleerebezem M., Geyer A., Hartung T.** (2006). D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin. *Journal of Bacteriology*. **188** (10): 3709-3715.
- **Parot S.** (2007). Biofilms électroactifs: Formation, caractérisation et mécanisme. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (France). 229 p.
- **Parry SM. et Palmer S.R.** (2000). The public Health Significance of VITEC O157. *Journal of Applied Microbiology*. **88**: 1-9.
- **Pilet M.F., Magras C., Federigh M.** (2005). Bactéries lactiques. In : Bactériologie Alimentaire. Ed. Economica (Paris). Pp. 219-240.
- **Planchon S., Gaillard-Martinie B., Dordet-Frisoni E., Bellon-Fontaine M.N., Leroy S., Labadie J., Hébraud M., Talon R.** (2006). Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology*. **109**: 88–96.
- **Pot B.** (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Tec & Doc (Paris). Pp. 1-106.
- **Pratt L.A. et Kolter R.** (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. **30**: 285-293.
- **Pui C.F., Wong W.C., Chai L.C., Lee H. Y., Tang, J.Y.H., Noorlis A., Farinazleen M., Cheah Y. K., Son R.** (2011). Biofilm formation by *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal*. **18**: 31-38.

- **Rendueles O., et Ghigo J.M.** (2012). Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews*. **36** (5): 972–989.
- **Rochex A. et Lebeault J.M.** (2007). Effects of nutrient son biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water Research*. **41**: 2885–2892.
- **Rodrigues D., Teixeira P., Oliveira R., Azeredo J.** (2011). *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan-impregnated bench cover materials. *Journal of Food Protection*. **74** (1): 32-37.
- **Rodrigues L., Moldes A., Teixeira J., Oliveira R.** (2006). Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*. **28**: 109–116.
- **Rodrigues L.B., Santos L.R., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., Oliveira A.P., Goetz F., Nascimento V.P.** (2010). Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**: 1082-1085.
- **Rodriguez V.V., Busscher H. J., Van der Mei H. C, Joop V., Willem N.** (2005). Role of *Lactobacillus* cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **41**: 33–41.
- **Roszak D.B. et Cowell R.R.** (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **51**: 365-379.
- **Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G., Salminen S.** (2006). Short communication: effect of exopolysaccharide isolated from “villi” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*. **89**: 2355–2358.
- **Ruimy R. et Andremont A.** (2004). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation*. **13**: 176-184.
- **Sauer F.G., Barnhart M., Salminen S.** (2000). Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Current Opinion in Structure Biology*. **10** (5): 548-556.
- **Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.** (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **71**: 394-406.

- **Scher K., Romling U., Yaron S.** (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(3). 1163- 1168.
- **Seneviratne C.J., Yip J.W.Y., Chang J.W.W., Zhang C.F., Samaranayake L.P.** (2013). Effect of culture media and nutrients on biofilms growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology* **58**: 1327-1334.
- **Sheng X., Thing Y.P., Pehkonen S.O.** (2007). Force Measurements of Bacterial Adhesion on Metals Using a Cell Probe Atomic Force Microscope. *Journal of Colloid Interface Science*. **310**: 661-669.
- **Simoës M., Lucia C., Simoës M.J.V.** (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT (Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie) - Food Science and Technology*. **43**: 573–583.
- **Sleytr U.B. et Beveridge T.J.** (1999). Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*. **7**: 253-260.
- **Speranza B., Milena S., Corbo M.R.** (2009). Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Food Control*. **20**: 1063–1067.
- **Stepanovic S., Irkovic I.C., Ranin S.V.M.** (2004). Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. **38**: 428–432.
- **Stiles M.E. et Holzapfel W.H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. **36** : 1-29.
- **Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W.** (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. **56**: 187-209.
- **Tamime A.Y.** (2002). Microbiology of starter cultures. *In: Dairy microbiology handbook*. Ed. John Wiley and Sons, Inc. (New York). Pp 261-366.
- **Tuttle J., Gomez T., Doyle M.P., Wells J.G., Zhao T., Tauxe R.V., Griggin P.M.** (1999). Lessons from a Large Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections: Insights Into the Infectious Dose and Method of Widespread Contamination of Hamburger Patties. *Epidemiology Infection*. **122**: 185-192.
- **Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski, Filloux A.** (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup)

and their involvement in biofilm formation. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **98**: 6911-6916.

- **Van der Mei H.C., van de Belt-Gritter B., Pouwels P.H., Martinez B., Busscher H.J.** (2003). Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins /a study in recombinant lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **28**: 127-134.
- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Keresters K., Swings J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiology Review*. **60**: 407-438.
- **Vatanyoopaisam S., Nazli A., Dodd C.E.R., Rees C.E.D., Waites W.M.** (2000). Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 860-863.
- **Velraeds M.M.C., Van der Mei H.C., Reid G., Busscher H.J.** (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **62** (6): 1958-1963.
- **Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune P.** (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces involvement of a new *omp R* allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology*. **180**: 2442-2449.
- **Vuotto C., Barbanti F., Mastrantonio P., Donelli G.** (2013). *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits *Prevotella melaninogenica* biofilm. *Oral Diseases*. doi: 10.1111/odi.12186.
- **Walencka E., Różalska S., Sadowska B., Różalska B.** (2008). The influence of *Lactobacillus acidophilus* derived surfactants on Staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiologica*. **53**: 61–66.
- **Waters C.M. et Bassler B.L.** (2005). *Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **21**: 319-346.
- **Whittaker C.J., Clemans D.L., Kolenbrander P.E.** (1996). Insertional inactivation of an intragenetic coaggregation-relevant adhesin locus from *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis). *Infection and Immunology*. **64** (10): 4137-4142.
- **Williams V. et Fletcher M.** (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 100-104.
- **Wingender J, Neu T.R., Flemming H.C.** (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances? *In*. Microbial extracellular polymeric substances: Microbial

extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Ed. Springer-Verlag (New York). pp. 1-19.

- **Winkelströter L.K., Gomes B.C., Thomaz M.R.S., Souza V. M., De Martinis E.C.P.** (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. **22**:1404-1407.
- **Zeraik A.E. et Nitschke M.** (2012). Influence of Growth Media and Temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **55**: 569-576.
- **Zhao T., Doyle M.P., Zhao P.** (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. **70** (7): 3996–4003.
- **Zoltai P.T., Zottola E.A., McKay L.L.** (1981). Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *Journal of Food protection*. **44**: 204–208.

Annexes

Annexe 1: Codes et caractéristiques des souches utilisées dans cette étude**Tableau I:** Souches de bactéries lactiques isolées de la première et de la deuxième ferme d'exploitation laitière

Souches	Codes	
	Ferme 1	Ferme 2
Entérocoques	En1F1 En2F1 En3F1 En4F1 En5F1 En6F1 En7F1 En8F1 En9F1 En10F1	En1F2 En2F2 En3F2 En4F2 En5F2 En6F2 En7F2 En8F2 En9F2 En10F2
Lactocoques	Lc2F1 Lc3F1 Lc4F1 Lc6F1 Lc7F1 Lc8F1 Lc9F1	Lc5F2 Lc6F2 Lc8F2 Lc11F2 Lc12F2
Lactobacilles	Lb1F1 Lb2F1 Lb3F1 Lb4F1 Lb5F1 Lb8F1 Lb9F1 Lb10F1 Lb11F1 Lb12F1 Lb14F1 Lb15F1	Lb1F2 Lb2F2 Lb3F2 Lb4F2 Lb5F2 Lb6F2 Lb7F2 Lb8F2 Lb9F2 Lb10F2 Lb11F2 Lb12F2 Lb13F2 Lb14F2 Lb15F2 Lb16F2 Lb17F2

Lb : lactobacilles, Lc : lactocoques, En : Entérocoques, F1 : Première ferme. F2 : deuxième ferme d'exploitation laitière.

Tableau II: Souches pathogènes isolées de la première et de la deuxième ferme d'exploitation laitière

Souches	Codes	
	Première ferme	Deuxième ferme
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA1F1 SA2F1 SA3F1 SA4F1 SA5F1 SA6F1 SA7F1 SA8F1 SA9F1 SA10F1 SA11F1	SA1F2 SA2F2 SA3F2 SA4F2 SA5F2 SA6F2 SA7F2 SA8F2 SA9F2 SA10F2
<i>Salmonella</i>	SL1F1 SL2F1 SL3F1 SL4F1 SL5F1 SL6F1 SL7F1 SL8F1 SL9F1 SL10F1 SL11F1	SL1F2 SL2F2 SL3F2 SL4F2 SL5F2 SL7F2 SL8F2 SL9F2 SL10F2 SL11F2
<i>Pseudomonas</i>	Ps1F1 Ps2F1 Ps3F1 Ps4F1 Ps5F1 Ps6F1 Ps7F1 Ps8F1 Ps9F1	Ps1F2 Ps2F2 Ps3F2 Ps4F2 Ps5F2 Ps6F2
<i>E. coli</i>	E1F1 E2F1 E3F1 E41F1 E5F1 E6F1 E7F1 E8F1 E9F1 E10F1	E1F2 E2F2 E3F2 E4F2 E5F2 E6F2 E7F2 E8F2 E9F2

SA: *Staphylococcus aureus*, SL: *Salmonella*, Ps: *Pseudomonas*, E: *E. coli*, F1: Première ferme, F2: deuxième ferme d'exploitation laitière.

Annexe 2 : Composition des milieux de culture (Selon fournisseurs)

Tableau I: Bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe, pH 6,5)

Composants	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate triammoniacale	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

Tableau II: Bouillon TSB-YE (Trypticase-Soy Broth- Yeast Extract, pH 7)

Composants	g/l
Peptone de caséine	17
Peptone de soja	3
Glucose	2,5
Phosphate dipotassique	2,5
Extrait de levure	6

Tableau III: Solution TS (Tryptone-Sel, préparée au laboratoire)

Composants	g/l
Chlorure de sodium	9 g
Tryptone	1 g

Tableau IV: Gélose Chapman (pH 7)

Composants	g/l
Peptone	10
Extrait de viande de bœuf	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	2,5
Rouge de phénol	0,025
Agar	15

Tableau V: Gélose nutritive (pH 7)

Composants	g/l
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2,5
peptone	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

Tableau VI: Milieu Hektoen (pH = 7,6)

Composants	g/l
Protéase-peptone	12
Extrait de levure	3
Lactose	12
Saccharose	12
Salicine	2
Citrate de fer III	1,5
Sels biliaires	9
Fuchsine acide	0,1
Bleu de bromothymol	0,065
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Agar	14

Tableau VII : Milieu VRBL (pH 7,4)

Composants	g/l
Peptone	7
Extrait de levure	3
Lactose	10
Chlorure de sodium	5
Mélange de sels biliaires	1,5
Cristal violet	0,002
Rouge neutre	0,03
Agar	15

Annexe 3 : Conditions de culture appropriées pour dénombrement sélectif des souches pathogènes

Tableau I: Milieu de culture, température et durée d'incubation utilisées pour chacune des cinq souches pathogènes

Souches	Milieu	Température (°C)	Durée d'incubation (h)
<i>Escherichia coli</i> E10F1	VRBL	44	24
<i>Pseudomonas</i> sp. Ps1F2	Gélose nutritive	30	24
<i>Staphylococcus aureus</i> SA9F2	Chapman	37	24
<i>Salmonella</i> sp. S11F2, S14F1	Hektoen	37	48

Résumé

61 souches lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*) et 76 souches pathogènes (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), faisant partie de la collection des souches du laboratoire de microbiologie appliquée, ont été criblées quant à leur pouvoir à former des biofilms sur microplaques en polystyrène. Les résultats obtenus ont montré que 44/61 des souches lactiques et 72/76 des souches pathogènes ont été adhérentes. Parmi les souches ayant montré le meilleur potentiel d'adhésion, cinq souches lactiques (*Lactobacillus pentosus* Lb2F2 et Lb3F2, *Lactobacillus plantarum* Lb9F2, *Lactobacillus casei* Lb7F2 et *Lactobacillus brevis* Lb4F2) et cinq souches pathogènes (*Salmonella* SL1F2 et SL4F1, *Pseudomonas* PS1F2, *E. coli* E10F1 et *S. aureus* SA9F2) ont été étudiées quant à leur cinétique de formation de biofilms dans des tubes en polypropylène. Ce test a permis de distinguer les deux principales étapes de formation d'un biofilm, en l'occurrence la maturation et le détachement. L'étude de l'effet barrière des souches lactiques sur l'adhésion des souches pathogènes dans le bouillon TSB-YE (24 h) a révélé une activité antiadhésive exercée par les cellules bactériennes mais pas leur surnageant de culture. L'absence d'activité antibactérienne dans le bouillon TSB-YE laisse supposer l'implication de molécules n'ayant pas forcément d'activités antibactériennes telles que les bio-surfactants. Cependant, ceci n'exclut pas l'intervention d'autres molécules dont la nature chimique reste à déterminer.

Mots clés : Bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, biofilms, effet antiadhésif, cinétique.

Abstract

61 lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Enterococcus*) and 76 pathogenic (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) strains, originally isolated from milking materials, were screened on their adhesion and biofilm potential on polystyrene microtiter plates. The results showed that 44/61 of the lactic acid bacteria (LAB) strains and 72/76 of the pathogens were adhering. Among the best adherent strains, five LAB strains (*Lactobacillus pentosus* Lb2F2 and Lb3F2, *Lactobacillus plantarum* Lb9F2, *Lactobacillus casei* Lb7F2 and *Lactobacillus brevis* Lb4F2) and five pathogenic strains (*Salmonella* SL1F2 and SL4F1, *Pseudomonas* PS1F2, *E. coli* E10F1 and *S. aureus* SA9F2) were investigated on their biofilm formation kinetic in polypropylene tubes. This test allowed us to distinguish the two main steps in biofilm formation, maturation and detachment. The study of the barrier effect of the LAB strains on the adhesion of the pathogens in TSB-YE (24 h), revealed an anti-adhesive activity exerted by the bacterial cells but not their culture supernatant. Absence of any antibacterial activity in TSB-YE conducted us to suppose the implication of anti-adhesive molecules without necessary an antibacterial activity such as bio-surfactants. However, this doesn't exclude the involvement of other substances whose chemical nature remains to determine.

Keywords: Lactic acid bacteria, pathogens, biofilm, anti-adhesive activity, kinetic.

ملخص

61 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك التي تنتمي إلى (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) و76 من سلالة البكتيريا المسببة للأمراض (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella*)، و التي عزلت من سطح معدّات الحلب و جمع الحليب ، قد فحصت على قدرتها على تشكيل البيوفيلم على صفائح من البوليسترين. أظهرت النتائج أنّ 61 /44 من سلالة بكتيريا حمض اللاكتيك ، و76/72 من سلالة البكتيريا المسببة للأمراض كانت قادرة على تشكيل البيوفيلم.

من بين السلالات الأحسن قدرة، خمسة من حمض اللاكتيك (*Lactobacillus pentosus* Lb2F2, Lb3F2, *Lactobacillus casei* Lb7F2, *Lactobacillus plantarum* Lb9F2, *Lactobacillus brevis* Lb4F2, و خمسة من البكتيريا المسببة للأمراض (*Salmonella* SL1F2, SL4F1, *E. coli* E10F1, *S. aureus* SA9F2, *Pseudomonas* PS1F2). تم التّحقّق من حركية تشكيلها البيوفيلم على أنابيب البوليبروبيلين. سمح لنا هذا الفحص على أن نميز مرحلتين أساسيتين هما: مرحلة تشكل البيوفيلم و نضوجه و مرحلة الانفصال و الإفراز. دراسة التأثير الحاجزي لسلالات بكتيريا الحليب على تشكل البيوفيلم من قبل السلالة المسببة للأمراض في TSB–YE خلال مدّة 24 ساعة ، قد أظهرت تأثير حاجري من قبل الخلايا و لكن ليس من قبل خلاصة البكتيريا. عدم وجود تأثير مضاد للجراثيم في TSB–YE، تركنا نفترض اشتراك الجزئيات التي ليست لها بالضرورة أنشطة مضادة للجراثيم ،مثل biosurfactants و لكن لا يستبعد تورط الجزئيات الأخرى التي لا يزال يتعين تحديدها كيميائية.

كلمات المفتاح: سلالة بكتيريا حمض اللاكتيك، سلالة البكتيريا المسببة للأمراض، بيوفيلم، تأثير حاجري، حركية التكوين