

République Algérienne Démocratique Et
Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la
Recherche Scientifique

Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen

Faculté de sciences de la vie et de la nature-science de la terre et de l'univers

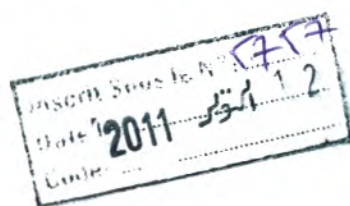
Département de biologie cellulaire et moléculaire
Laboratoire LAMAABE

Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du diplôme de Master en
BMC

Option : Microbiologie

Thème :

Evolution du nombre de bactéries du
biofilm à *Bacillus cereus* en fonction du
milieu de culture et du temps
d'incubation



Présenté par :

M^{lle} : Meryem MALKI

Membres du jury :

Examinatrice: M^{me} BENDIMRED.N

Examinateur : M^r REBIAHI S.A

Encadreur : M^{me} MALEK. F

Sous la direction de :

M^{me} : MALEK.F

Responsable de formation :

M^r : MOUSSA BOUDJAMAA.B

Années Universitaire : 2010 - 2011

République Algérienne Démocratique Et
Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la
Recherche Scientifique

Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen

Faculté de sciences de la vie et de la nature-science de la terre et de l'univers

Département de biologie cellulaire et moléculaire
Laboratoire LAMAABE

Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du diplôme de Master en
BMC

Option : Microbiologie

Thème :

**Evolution du nombre de bactéries du
biofilm à *Bacillus cereus* en fonction du
milieu de culture et du temps
d'incubation**

Présenté par :

M^{lle} : Meryem MALKI

Sous la direction de :

M^{me} : MALEK.F

Membres du jury :

Examinatrice: M^{me} BENDIMRED.N

Responsable de formation :

Examineur : M^r REBIAHI S.A

M^r : MOUSSA BOUDJAMAA.B

Encadreur : M^{me} MALEK. F

Années Universitaire : 2010 - 2011



Remerciements

Le présent travail a été élaboré grâce au concours de nombreuses personnes qui méritent nos vifs remerciements, du fait qu'elles ont contribué, d'une façon ou d'une autre, à sa réalisation.

L'expérimentation a été réalisée entièrement au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE), département de biologie, Faculté des SNV-STU, de l'université Aboubekr Belkaid (Tlemcen).

J'exprime ma sincère gratitude à **Mr Moussa Boudjemaa.B.**, maître de conférence au département de biologie, faculté des SNV-STU, université de Tlemcen et directeur du LAMAABE de n'avoir cessé de nous orienter et nous faire des suggestions, et des conseils judicieux dans le but de bien mener à terme ce travail au sein du laboratoire et veillé de près au bon déroulement des mémoires de fin de cycle. J'aimerais également le remercier de me faire l'honneur de présider ce jury.

J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à **Mme Malek F.**, maître assistante chargée de cours au département de biologie, faculté des SNV-STU, université de Tlemcen, pour m'avoir encadrée, dirigée et orientée et pour tous les précieux conseils qu'elle m'a prodigués.

Je remercie **Mme Bendimerad .N.**, maître assistante chargée de cours au département de biologie, Faculté des SNV-STU, université de Tlemcen, d'avoir bien voulu faire partie du jury de ce mémoire et d'examiner ce travail.

Mes sincères remerciements vont également à **Mr Rebiahi.S.**, maître assistant chargé de cours au département de Biologie, faculté des SNV-STU, université de Tlemcen, pour son aide au laboratoire ainsi que pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Et enfin je tiens à remercier profondément tous ceux qui m'ont apportés leur aide durant tout le cursus universitaire



Dédicace

Je dédie ce travail à :

ALLAH le tout Clément sans bornes, le Miséricordieux, Seigneur des cieux et de la terre, Créateur de toute chose.

C'est avec l'aide d'**ALLAH** et par sa grâce que ce mémoire fut réalisé et achevé.

Louange à **ALLAH** dont le rappel apaise les cœurs.

ALLAH daigne répandre tes bénédictions sur **MOHAMED** (P.S.L.) et sa famille et ses compagnons, celui qui nous a fait connaître ta parole et annoncer ton vrai culte.

A celle qui m'a comblé d'amour et de tendresse, et qui n'a cessé d'invoquer **ALLAH** dans ses prières de me guider vers le droit chemin, afin de voir le fruit de ses efforts devenir mûr... à ma chère et douce **MAMAN**.

A celui qui grâce à ses conseils et ses efforts j'ai pu progresser durant mon parcours scolaire, et qui m'a tant appris, instruit et éduqué depuis la première année primaire jusqu'au moment de ma graduation universitaire, afin de faire de moi une femme brave... à mon cher et tendre **PAPA**.

A celle qui m'a toujours accompagné, soutenu et encouragé mais aussi qui a partagé avec moi les moments de peine et de joie, depuis mon agréable enfance jusqu'à maintenant... à ma chère Sœur bien aimée **DJAMILA**, en lui souhaitant à mon tour la réussite pour la réalisation de son mémoire de master.

A ceux qui n'ont cessé de me soutenir, servir et encouragé avec amour et tendresse... à mes adorables petits frères : **WAFAA**, **MOHAMED FATEH**, **FARAH** et **FETEH ALLAH**.

A cette âme pure que nous avons perdue ces derniers temps,... à ma défunte **GRAND-MERE**, ainsi que **mes grands parents** : paternels et maternels qui grâce à leurs bénédictions et leurs invocations, ce travail fut réalisé.

Que toute personne qui a contribué d'une façon ou d'une autre pour la réalisation de ce travail, trouve ici l'expression de ma meilleure dédicace

Résumé

L'étude de l'impact du facteur âge et du milieu de culture sur le développement du biofilm a été réalisée sur cinq souches de *Bacillus cereus* (M116, M19, M56, M12, M79) isolées à partir des équipements laitiers (circuit fermé).

Les résultats obtenus montrent que pour les souches M56 et M12 les suspensions sporales adhèrent mieux que la culture cellulaire (les cellules végétatives) par contre pour les autres souches, les taux d'adhésion des spores et les cellules végétatives se rapprochent.

D'autre part, l'évaluation des biofilm en fonction des milieux de cultures et du temps d'incubation (l'âge du biofilm) montre que les biofilms formés dans des milieux riches en nutriments renferment des densités bactériennes importantes. C'est le cas des 3 milieux utilisés (Bouillon nutritive, lait recombinaé et le lait de vache) qui se sont ainsi avérés favorables au développement des biofilms. Le temps d'incubation influe également sur le nombre de bactéries au sein du biofilm. Il a été montré qu'un biofilm âgé est plus développé quantitativement qu'un biofilm jeune. A titre d'exemple la population d'un biofilm âgé de 5 jour dépasse en moyenne celle d'un biofilm de 24 heures de 2.68 unité logarithmique.

La mesure du nombre de bactéries adhérentes sur le verre (technique TM) a permis une évaluation rapide et facile du biofilm au cours de 5 jours, mais la technique du dénombrement sur boîtes a pu révéler les limites de cette technique en montrant une réduction importante du nombre de bactéries pour la souche M19 au niveau du 5ème jour.

Les mots clefs : *Bacillus cereus*, *Biofilm*, adhésion, Spore, âge du biofilm, milieu de culture, acier inoxydable.

Liste des Abréviations

AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

BN: Bouillon nutritif

CIP: Cleaning in place

DO : Densité optique

EDS : Eau distillé stérile

EPS : Extracellular polymeric substances

GN : Gélose nutritive

IAA: Industries agro-alimentaire

L.A :Luria agar

TM : Méthode des tubes

UFC : Unité formant colonie

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux caractères bactériologiques permettant de différencier les espèces du genre <i>Bacillus</i> (Euzéby., 2003).....	04
Tableau 2 : Les principaux denrées alimentaires contaminées par <i>Bacillus cereus</i> (AFSSA., 2008).....	05
Tableau 3 : Propriétés de <i>Bacillus cereus</i> en relation avec l'altération des aliments et l'intoxication alimentaire (Pirttijarvi et al ., 2000).....	06
Tableau 4 : les facteurs prédominants dans l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm (Donlan .,2002).....	10



Liste des figures

Figure 01 : Spore de <i>Bacillus cereus</i> (Lequette ., 2009).....	07
Figure 2 : Développement d'un biofilm polymicrobien sur une surface en acier inoxydable observé en microscopie à épifluorescence (Donlan ., 2002).....	08
Figure 3 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Stoodley et al ., 2002)	10
Figure 4 : des position difficiles à nettoyer dans un système.....	12
Figure 5 : Les enzymes éliminant le biofilm du groupe <i>Bacillus cereus</i> (Faille et Lequette ., 2011).....	13
Figure 06 : <i>B.cereus</i> en phase de sporulation , observée par examen microscopique.....	20
Figure 07 : formation du biofilm sur les parois des tubes	21
Figure 08 : Schéma simplifié de la technique TM.....	23
Figure 09 : Formation du biofilm par la méthode Porte germe.....	25
Figure 10 : Résultat du dénombrement des bactéries en biofilm.....	26
Figure 11 : Evolution du biofilm de <i>Bacillus cereus</i> en fonction du milieu de culture par la technique TM.....	28
Figure 12 : Evolution du biofilm en fonction d'âge chez la souche M116.....	31
Figure 13 : Evolution des biofilms des deux souches M19 et M79 en fonction d'âge par la technique TM.....	31
Figure 14 : Evolution Du biofilm de la souche M56 en fonction d'âge par la technique TM.....	32
Figure 15 : Evolution du biofilm de la souche M12 en fonction d'âge par la technique TM.....	32
Figure 16 : Evaluation du biofilm formé sur les lames d'acier inoxydable en fonction d'âge.....	34

Figure 17 : Comparaison des deux techniques d'évaluation du biofilm pour la souche M19.....36

Figure 18 : Comparaison des deux techniques d'évaluation du biofilm pour la souche M116.....37

Figure 19 : Comparaison des deux techniques d'évaluation du biofilm pour la souche M79.....37

Table de matière

- ❖ Résumé
- ❖ Abstract
- ❖ Introduction générale
- ❖ **Partie I : Partie bibliographique**

Chapitre I : Le groupe de <i>Bacillus cereus</i> en industrie alimentaire.....	02
1. Présentation de l'espèce <i>Bacillus cereus</i>	02
1.1 . Le groupe de <i>Bacillus cereus</i>	02
1.2 .Physiologie	02
1.3 .Biochimie.....	03
1.4 .Habitat et pouvoir pathogène	03
2. L'espèce <i>Bacillus cereus</i> pathogène alimentaire.....	05
2.1 .Pouvoir de contamination alimentaire.....	05
2.2 .Altération du lait par <i>Bacillus cereus</i>	06
3. Les caractères particuliers relatifs au potentiel de former le biofilm.....	07
Chapitre II : Le biofilm	
1. Description générale.....	08
1.1 .Définition du biofilm.....	08
1.2 .Processus de formation du biofilm.....	09
2. Les facteurs influençant la formation du biofilm.....	10
• La phase nutritive.....	10
2.1. le film de conditionnement (couche de nutriment qui recouvre la surface des matériaux).....	11
2.2 .Le milieu de suspension (phase nutritive circulante).....	11

3. L'impact du biofilm en IAA.....	11
3.1. La résistance du biofilm.....	12
3.2. Les moyens de lutte contre le biofilm.....	13
Chapitre III : La structure et l'architecture du biofilm	
1. La structure du biofilm	14
• La mobilité cellulaire en biofilm.....	14
2. L'architecture du biofilm.....	15
2.1. L'EPS.....	15
2.2.1. Définition	15
2.2.2. Propriétés générale.....	15
2.2. Quorum sensing	16
2.3. Le transfert des gènes.....	17
3. Physiologie et interaction des bactéries du biofilm.....	17

❖ **Partie II : Expérimentation et résultats**

• **Matériel et Méthode**

I. Évaluation du biofilm à <i>Bacillus cereus</i> en fonction des milieux de culture par la technique TM	19
I.1. les cultures bactériennes.....	19
I.1.1. Origine des souches.....	19
I.1.2. Revivification des souches.....	19
I.1.3. Préparation de la suspension sporale.....	19
I.1.4. Traitement thermique de la suspension sporale.....	20
I.1.5. Numération des spores.....	20
I.2. Préparation de biofilm expérimentaux sur différents milieux de cultures par la technique TM.....	20

I.2.1. L'étapes d'adhésion des spores sur les parois des tubes.....	21
I.2.2. L'étape d'inoculation du milieu de culture.....	21
II . Evaluation du biofilm de <i>Bacillus cereus</i> en fonction de l'âge par deux techniques.....	22
II.1. Technique TM.....	22
II.2. Technique de dénombrement sur boîte.....	22
II.2.1. Traitement des lames d'acier inoxydables.....	24
II.2.2 . Adhésion des spores à l'inox.....	24
II.2.3. L'étape de formation sur l'inox.....	24
• Résultats et discussion	
I. Evaluation du pouvoir d'adhésion des souches.....	26
II. Impact du facteur de milieux de culture sur le développement du biofilm chez <i>Bacillus cereus</i>.....	27
III. Impact du facteur âge sur le développement du biofilm	29
III.1. Evolution du biofilm formé par la technique TM en fonction du facteur âge	29
III.2. Résultats de L'évolution du biofilm formé sur des lames en acier inoxydable en fonction d'âge.....	34
III .3. Comparaison des deux techniques d'évaluation du biofilm.....	35

Introduction générale

Introduction

Plusieurs espèces bactériennes peuvent former le biofilm dans un large éventail d'environnements. Ces communautés bactériennes très organisées et structurées représentent le mode de vie normal d'une bactérie. En biofilm, les bactéries possèdent une physiologie particulière caractérisée par des propriétés physiques, chimique et biologiques différentes de l'état planctonique à savoir une communication intercellulaire et une résistance particulière aux agressions externes, et en particulier aux agents antimicrobiens comme les antibiotiques.

La résistance aux agents antimicrobiens est l'une des propriétés de l'état sessile, elle est influencées par de nombreux facteurs notamment l'âge du biofilm. De nombreux travaux ont montré qu'un biofilm mature est moins sensible aux antibiotiques qu'un biofilm jeune.

La contamination microbienne des surfaces des équipement utilisés en industrie alimentaire due principalement à l'adhésion et à la formation du biofilm par des micro-organismes tel que *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* aboutit à des conséquences plus ou moins grave, en effet ces bactéries peuvent causer des altérations des aliments et/ou des toxi-infections alimentaires.

En industrie laitière, *Bacillus cereus* est le germe d'altération le plus fréquemment isolé. Son aptitude à l'attachement sur les surfaces des équipements est due à des spores qui ont une capacité d'adhésion élevée aux surface et en particulier l'acier inoxydable et pouvant facilement germer et conduire ainsi à la formation du biofilm.

Les biofilms en particulier ceux de *Bacillus cereus* d'une part sont difficiles à éliminer par les systèmes de nettoyage/désinfection classiques. Leur structure compacte diminue l'efficacité des désinfectants. D'autre part l'âge du biofilm et les conditions dans lesquels ils se trouvent sont des facteurs important dans la résistance des biofilm.

L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet du milieu de culture et de l'âge du biofilm sur le nombre de bactéries adhérees, pour cela des biofilms sont formés dans différents milieux de culture : bouillon nutritif, lait entier, lait recombinaé, et soumis à des délais d'incubation qui varient de 6heures à 5 jours. Le nombre de bactéries de ces biofilms expérimentaux est évalué par deux techniques : mesure de la DO après action d'un colorant et dénombrement sur boites de pétrie.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Bacillus cereus en industrie alimentaire

Chapitre I : *Bacillus cereus* en industrie alimentaire

1. Présentation de l'espèce *Bacillus cereus*

1.1. Le groupe de *Bacillus cereus* :

Le groupe de *Bacillus cereus* comprend des espèces qui possèdent des caractères phénotypiques proches et elles sont génétiquement apparentés et regroupées sous la dénomination de *Bacillus* du groupe *cereus* (Euzéby ., 2003)

Ces espèces sont *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus weihenstephamensis* dont *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* sont considéré comme des pathogènes pour l'homme.

Le tableau 1 rassemble les principaux caractères bactériologiques permettant ainsi de différencier les espèces du groupe « *Bacillus cereus* ».

➤ Généralité sur *Bacillus cereus* sensu stricto

Les souches de *Bacillus* sont considérées comme des bacilles à gram positif, aux extrémités arrondies, mobiles dans la plus part des cas grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieur à 3µm et d'un diamètre moyen de 1.4 µm, groupés en chaînes, formant des spores non déformantes aéro-anaérobies. (Euzéby ., 2003)

Bacillus cereus est une bactérie sporulante peuvent être rencontrée dans de très nombreux environnements, en particulier à toutes les étapes de la chaîne alimentaire (Ramarao et Lereclus. ,2005).

Il est souvent impliqué dans des toxi-infection d'origine alimentaire car il constitue une source majeure de nombreux problèmes d'hygiène en IAA (N'Guyen the ., 2001).

1.2. Physiologie

Une croissance des espèces de *Bacillus cereus* est observée pour des températures comprise entre 10 et 43 °C (certaines souches peuvent cultiver à 7°C Voir même à 4°C et pour le Ph compris entre 6 et 9.5 (Priest et al ., 1988).

Des expériences ont indiqué que l'exposition des spores de *Bacillus cereus* (résistante à la chaleur et à la sécheresse) à une température de 80°C pendant 25 à 30 minutes peut éliminer les cellules viables au moment où les spores sont préservées (Euzéby., 2003).

1.3. Biochimie

La plus part des souches de *Bacillus cereus* sont dotés d'un équipement enzymatique important permettant ainsi la dégradation de la lécithine, l'exculine, l'arbutine, caséine, gélatine tyroline. Elles peuvent ainsi fermenter les glucides tels que l'amidon avec formation d'acide ainsi que le glucose et le fructose tandis qu'elles sont incapable de fermenter la mannitol ce qui permet de les mettre en évidence comme test principal de confirmation (Yamazaki et al ., 1996).

1.4. Habitat et pouvoir pathogènes

Bacillus cereus est très largement répandu dans la nature, il se comporte comme un pathogène opportuniste et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires (Ronner et Husmark., 1998).

Bacillus cereus provoque deux types distincts d'empoisonnement alimentaire, les syndromes diarrhéiques et émétiques, ainsi que d'une variété d'infection locales et systémiques telles que l'endophtalmie, l'endocardites, la méningite, la parodontite, une ostéomyélite, infections de plaies, et la septicémie (Wong., 2006).

Bacillus cereus est particulièrement responsable de deux types de toxi-infection alimentaire (Ramarao.,2005)

- Une intoxication diarrhéique causée par un ensemble de toxines protéiques produites dans l'intestin grêles par les bactéries ingérées.
- Une intoxication caractérisée par des vomissements, causée par un petit peptide toxique, extrêmement stable et qui serait produit dans l'aliment.

Les souches qui produisent les toxines émétiques (responsable du vomissement) sont peu fréquentes dans les aliments. Par contre les souches isolées à partir des aliments ou d'environnement divers ont la particularité de posséder les gènes codant pour une cytotoxines et des entérotoxines (Ramarao et Lereclus ., 2005).

Tableau 1 : Principaux caractères bactériologiques permettant de différencier les espèces du genre Bacillus (Euzéby., 2003)

	<i>B.anthraxis</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.mycoïdes</i>	<i>B.pseudomycoïdes</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>
Aspect des colonies sur gélose au sang non incubée en présence de CO ₂	Colonies en tête de méduse	Colonie circulaires ou de forme irrégulière ,d'aspect crémeux mat ou granuleux	Colonies rhizoïdes	Colonies rhizoïdes	Colonies blanches ou grisâtres	Colonies circulaires ou de forme irrégulière , d'aspect crémeux , mat ou granuleux
Hémolyse sur gélose au sang de mouton en 24 heures	-	+	+		+	+
Croissance à une température inférieur à 7°C en milieu agité	-	-	-		-	+
Mobilité	-	+/-	-	-	+/-	+/-
Présence d'un cristal parasporal	-	-	-	-	+	-
Sensibilité à la pénicilline	+	-	-		-	-
Lyse par le phage gamma	+	-	-		-	-
Acidification du glycérol	-	+	+		+	+

2. Bacillus cereus pathogènes alimentaire

Les souches de *Bacillus cereus* sont considérées comme des contaminants alimentaires .En effet elles présentent un risque très important pour toute une série de denrées alimentaires (produits d'origines végétales tels que le riz, céréales, jus de fruits mais aussi les pâtisseries et les plats préparés (Amgar., 2007).(Tableau 2)

Tableau 2 : Les principaux denrées alimentaires contaminées par *Bacillus cereus* (AFSSA., 2008)

Agent biologique	Principaux sources de contamination	Principaux aliments potentiellement contaminés	Normes de détection (P) ou de dénombrement (N)
<i>Bacillus cereus</i>	Sol ,végétation , lait cru	Riz , épices ,viande ,lait ,végétaux , noix	NF EN ISO 7932 :2004(N)

2.1 .Le pouvoir de contamination alimentaire

Les souches de *Bacillus cereus* peuvent se trouver dans les étapes de la chaînes alimentaire .*Bacillus cereus* est un problème récurrent dans les équipement utilisés en industries laitières .Cette bactérie est très présente dans tous les produits laitiers , c'est un contaminant fréquent des plats cuisinés pasteurisés .La survie de ces bactéries le long de la ligne de fabrication s'explique par leur aptitude a produire des spores résistantes aux températures élevées , mais aussi capables de s'adhérer fortement aux matériaux tels que les polymères ou l'acier inoxydables .Leur présence dans les aliments est également due à leur capacité à se multiplier à base température (4 ou 10°C selon les souches (Slamti et Lereclus ., 2002).

Tableau 3 : Propriétés de *Bacillus cereus* en relation avec l'altération des aliments et l'intoxication alimentaire (Pirttijarvi et al ., 2000) .

Propriétés	<i>Bacillus cereus</i>
Hydrolyse des composants alimentaires : Amidon	+/-
Caséine	+
Lipides (testés avec Tween 80)	+
Lécithine	+/-
Défection alimentaire : Caillé sucré	+
Amertume de la crème	+
Température de croissance et de survie	+/-
Croissance à moins de 6 °C	
Croissance à plus de 55°C	-

2.2. Altération du lait par *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est considéré comme l'un des organismes communs qui nuisent la qualité des produits laitiers (Wong. , 2006).

Le lait au cour de la traite, du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine peut être une source de contamination par *Bacillus cereus* .

Il a été montré la formation de toxines pour 85.4% des souches de *Bacillus cereus* dans le transport du lait cru (AFSSA., 2008).

D'autant plus que les souches de *Bacillus cereus* sont des psychrophiles capable de se développer à des températures entre 3 et 7 °C ce qui lui permettra d'altérer le lait de point de vu organoleptique et sanitaire .En effet à des températures bases les *Bacillus cereus* produisent le plus souvent des protéases et des lipases résistantes à la pasteurisation , les protéases responsables des défauts d'amertumes et les lipases responsables des phénomènes de rancissement .(Raulio ., 2010).

Pour éviter l'altération du lait, l'hygiène doit être respectée et la charge en spores doit être connue car la température du stockage du lait favorise le développement de ces germes .Si le lait doit être utilisé cru (absence de traitement thermique) celui -ci doit être exempt de pathogènes.



3. Caractère particulier relatif au potentiel de former le biofilm par *Bacillus cereus*

Les spores de *Bacillus cereus* causent de sérieux problèmes dans les industries agroalimentaires (notamment les industries laitières) grâce à leur thermorésistance et leur aptitude de s'adhérer fortement à de nombreuses surfaces des équipements y compris l'acier inoxydable.

Il a été montré que les spores du groupe de *Bacillus cereus* entourées d'un exosporium diffèrent par leurs caractères morphologiques, le nombre d'appendices. La composition saccharidique de l'exosporium diffère aussi d'une souche à l'autre. La capacité des spores à adhérer à l'acier varie selon les souches, celles appartenant au groupe de *Bacillus cereus* sont généralement les plus adhérentes. Par contre la présence d'un exosporium n'est pas seul responsable de leur capacité à adhérer à des surfaces inertes (Lequette.,2009).

L'hydrophobicité et le nombre d'appendices des souches de *Bacillus cereus* sont corrélés statistiquement à la capacité d'adhésion (Faille et Boukherroub.,2009).

3.1. Pouvoir d'adhésion et l'hydrophobicité de la spore

L'industrie laitière connaît un véritable problème assuré par la capacité des spores à s'adhérer aux surfaces spécialement aux surfaces hydrophobes. Cette adhésion est liée à l'hydrophobicité de la surface des spores et à la présence de filaments. (Ronner et Husmark.,1990).

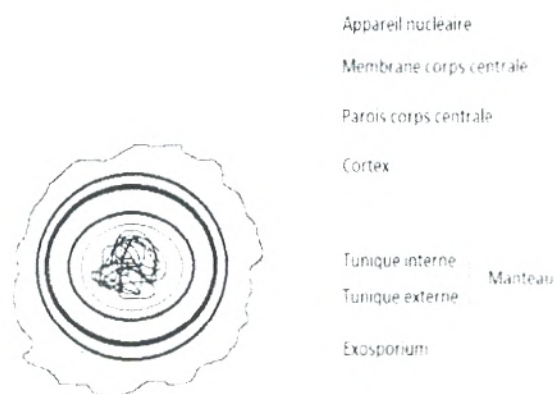


Figure 1 : Spore de *Bacillus cereus* (Lequette., 2009)

Chapitre II : Le biofilm

Chapitre II : le biofilm

1. Description générale

1.1. Définition générale

En générale, un biofilm est constitué d'une communauté de micro-organismes qui forment une mince couche visqueuse sur une surface naturelle ou artificielle

En effet, au niveau des équipements industriels dans l'agroalimentaire, le risque de formation du biofilm est importants ou des pellicules bactériennes visqueuses adhèrent aux surfaces des canalisations industrielles, et qui sont résistantes aux méthodes classiques de nettoyage, il sont responsable de 40% des toxi-infections alimentaires en France (**Ronse ., 2001**)

➤ Les constituants d'un biofilm

Trois constituants principaux

- Une ou plusieurs espèces de bactéries (15%)
- Un substrat solide
- Une matrice de polysaccharides (85%) produite par les bactéries

Autres constituants microbiens (levures, champignons, matériaux organiques (fibrines,...) ou chimiques (silice,...)

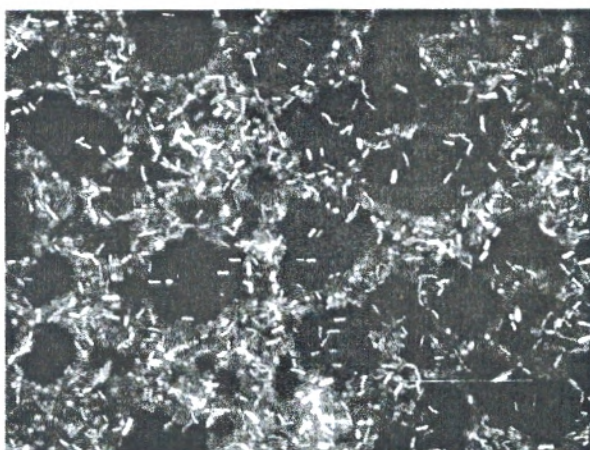


Figure 2 : Développement d'un biofilm polymicrobien sur une surface en acier inoxydable observé en microscopie à épifluorescence (**Donlan et al ., 2002**).

1.2. Processus de formation du biofilm :

Les Biofilm se trouvent sur toutes les interfaces et leur études se localisent dans différents domaines d'applications (Santé, écologie marine, agroalimentaire, industries du traitement des eaux , du papier). La formation des biofilms se schématise en plusieurs étapes (**Beloin et al.,2007**)

Etape 1 : attachement initiale

Etape 2 : attachement irréversible

Etape 3 : apparition et maturation primaire du biofilm

Etape 4 : maturation du biofilm

Etape 5 : dispersions

1. La première étape consiste à l'adhésion des micro-organismes mobiles à une surface .L'établissement des liaisons chimiques faibles non covalente conduit à une adhésion réversible .Ces liaisons sont de nature Van der Waals , ou des liaisons acide base ou électrostatiques .

2. La deuxième étape est l'adhésion permanente (adhésion irréversible) .La formation des ligands qui sont des molécules protéiques et des structures telles que les pilis permet l'ancrage et l'attachement d'autres espèces microbiennes

3. La troisième étape consiste à la colonisation du biofilm par des micro-colonies qui résultent de la division cellulaires des micro-organismes .Ces micro-colonies produit le biofilm proprement dit

4. La quatrième étape s'agit de maturation du biofilm en s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique.

5. La cinquième étape est dite : phase planctonique ou les microcolonies se dispersent aboutissant à un vieillissement du biofilm .Ces micro-organismes peuvent coloniser de nouvelles surfaces, complétant ainsi le cycle.

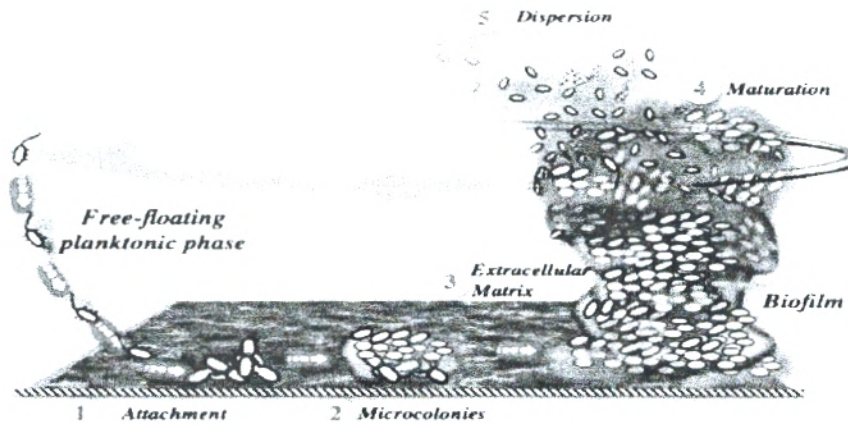


Figure 3 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d’un biofilm (Stoodley et al ., 2002)

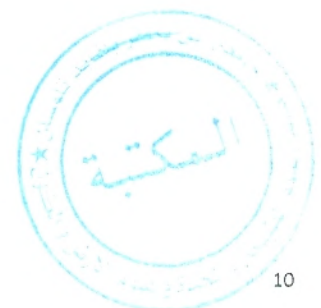
2. Les facteurs influençant la formation du biofilm :

La formation du biofilm peut être influencée par divers facteurs qui se résument dans ce tableau suivants :

Tableau 4 : les facteurs prédominants dans l’adhésion bactérienne et la formation de biofilm (Donlan .,2002)

Propriétés de la surface	Propriétés de la masse de fluide	Propriétés de la cellule
-Texture et rugosité	-Vitesse d’écoulement	-L’hydrophobicité de la surface de la cellule
-Hydrophobicité	-Ph	-Les fimbriae
-Film de conditionnement	-Température	-Les flagelles
	-Cations	-Les EPS
	-Présence d’agents antimicrobiens	

➤ La phase nutritive est considérée selon deux aspects :



2.1 .Le film de conditionnement (couche de nutriments qui recouvre la surface des matériaux)

Les matières inerte telles que l'acier inoxydable, caoutchouc, PVC des lactoduc favorisent la formation des biofilm lorsqu'elles sont exposées à des matières organiques riches en éléments nutritifs (eau ou lait).

Dans les industries laitières, la circulation du lait dans une canalisation en acier inoxydable propre, lorsque le débit est faible en traversant une zone très mince comprise entre la phase liquide et la surface de la canalisation (**Brandet et al ., 1999**).

Il s'est avéré que les surfaces conditionnées en présence d'ions conduisent à une meilleure adhésion bactérienne (**Barnes et al ., 1999**)

2.2. Le milieu de suspension (phase nutritive circulante)

Des facteurs impliquées dans la formation du biofilm jouant un rôle très importants dans l'adhérence des bactéries à la canalisation tell que le Ph, et le temps de contact entre les bactéries et la surface. (**Barnes et al ., 1999**)

L'adhésion bactérienne est également conditionnée par la composition et la concentration en nutriments .Par exemple *Listeria monocytogenes* se développant en présence de tryptone montre une capacité d'adhésion plus faible que dans des milieux contenant des acides aminés (**Kim et Contreseing.,1994**).Une augmentation de la concentration de plusieurs cations (Sodium , Calcium ,lanthane , Fer ferrique) affecte aussi l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre , en réduisant les forces répulsives entre les cellules bactériennes négativement chargées et les surfaces en verre (**Fletcher et al .,1988**).D'une manière générale une augmentation de la concentration en nutriments est corrélée directement à une augmentation du nombre de cellules bactériennes attachées. (**Cowan et al .,1991**) .

3. Impact du biofilm dans les industries agroalimentaire

Des travaux portant sur les biofilms à *Bacillus cereus* qui peuvent se développer en particulier dans les accumulateurs industriels et les systèmes de tuyauteries qui sont partiellement remplis pendant le fonctionnement ou lorsque du liquide résiduel est resté après le cycle de production ce qui indique que les biofilms de *Bacillus cereus* peut agir comme un

nid pour la formation de spores et par la suite peuvent libérer leurs spores dans des environnements de production alimentaire (Janneke et al .,2007).

Il s'est avéré que toutes les surfaces industrielles, les canalisations et les filtres à membranes sont colonisés par les biofilms (Faille et Lequette .,2011). Il est important de déstructurer la couche qui résulte de l'adhérence des bactéries formant le biofilm qui constitue un obstacle majeur au système de nettoyage/désinfectant, surtout lorsqu'ils se forment dans des endroits difficiles à nettoyer (Faille .,2011).

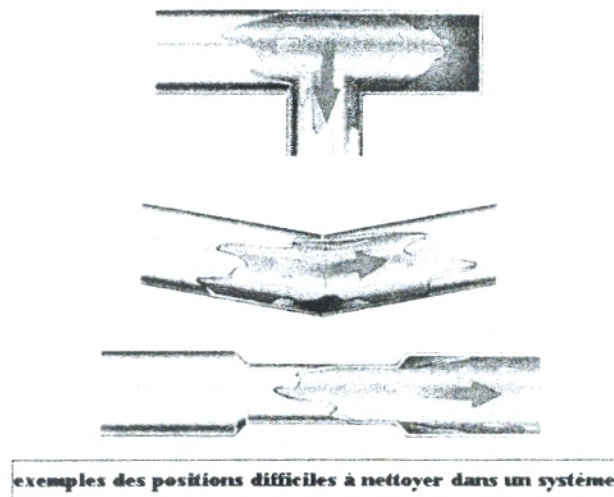


Figure 4 : des positions difficiles à nettoyer dans un système

3.1. Résistance du biofilm :

Les bactéries dans un biofilm mature sont beaucoup plus résistantes aux antimicrobiens (antibiotiques et aux biocides). Différents mécanismes ont été proposés pour cette résistance qui est le plus probablement multifactorielle (Czechowski et Stoodley .,2002 ;Donlan et Costerton .,2002)

Les EPS peuvent constituer des barrières de perméabilité ou de former des complexes avec les antimicrobiens interférant ainsi avec l'action antimicrobienne. L'activité enzymatique extracellulaire à l'intérieur du biofilm peut être suffisamment élevée pour détruire les agents antimicrobiens.

En plus différents microenvironnements existants dans les couches du biofilm les plus profondes avec un pH modifié, pCO_2 , pO_2 , concentrations en cations, et qui peuvent affecter l'activité des antimicrobiens. (Donlan et Costerton.,2002).

Les cellules bactériennes du biofilm peuvent avoir une sensibilité réduite en raison de la modification de la perméabilité, le métabolisme cellulaire ou le taux de croissance. (Whiteley et al 2001). Figure 5

3.2. Les moyens de lutte contre le biofilm

Les traitements conventionnels utilisés pour limiter la prolifération du biofilm sont à la base de biocides (Dérivés phénolique, détergents) cependant, leur concentration doit être augmentée régulièrement en raison de l'adaptation des microorganismes. De plus, ces biocides présentent un risque pour la santé des opérateurs (Bernet.,2008).

Des moyens de lutte contre le biofilm compatibles avec le contexte de production basés sur des actions physiques, chimiques et biologiques, il s'agit de :

1. Rendre le biofilm plus poreux, plus sensible aux substances ajoutées en agissant sur sa structure.
2. Limiter l'adhésion bactérienne par traitement des surfaces (polymère hydrophile).
3. Déstructurer le biofilm par des enzymes spécifiques ou par des contraintes hydrodynamiques (pulses).
4. Limiter la croissance et/ou inactiver les bactéries en biofilm par ajouts d'inhibiteurs naturels. (Bernet.,2008).

Des enzymes utilisées pour éliminer le biofilm dégradent la matière organique en résidus de petites tailles solubles dans l'eau, et qui se décrochent facilement. La protéase est définie comme une enzyme qui a un rôle majeur contre le biofilm à *Bacillus cereus* (Faille, Ronse.,2011).



Figure 5 : Les enzymes éliminant le biofilm du groupe *Bacillus cereus* (Faille et Lequette., 2011).

Chapitre III : Structure, physiologie et architecture du biofilm

Chaque communauté microbienne du biofilm est unique bien que certaines caractéristiques structurelles peuvent être considérées comme universels (Tolker-Nielsen et al ., 2000)

1. Structure du biofilm :

Généralement les biofilms ont une structure caractéristique qui consiste en des microcolonies enfermées dans une matrice hydratée, des protéines produites par voie microbienne (des acides nucléiques et les polysaccharides).(Donlan .,2002)

Dans ce type de réseau, les cellules agissent moins comme des entités individuelles mais plutôt comme un système vivant collective, souvent avec des canaux pour acheminer l'eau et des nutriments vers les cellules de la partie intérieure du biofilm (Stoodley et al ., 2002).

➤ La mobilité cellulaire

L'implication de la mobilité cellulaire dans l'établissement et la régulation de structure du biofilm n'est décrite précisément que dans les phases initiales d'adhésion aux surfaces des souches modèles (Grignon .,1978 ; Massy ., 1991).

Il a été montré que la mobilité cellulaire joue un rôle dans l'architecture du biofilm dans des cellules d'écoulement en examinant l'interaction de *P. aeruginosa* et *P. putida* par microscopie à balayage laser .Lorsque ces bactéries ont été ajoutées au système de cellule d'écoulement , chaque bactérie forme initialement des petites microcolonies , avec le temps les colonies se mélangent et les cellules migrent d'une colonies à l'autre , la structure des microcolonies change à partir d'une structure compacte vers une structure plus lâche au fil du temps .(Tolker-Nielsen et al ., 2000).

L'utilisation de l'imagerie confocale multimodale et l'utilisation de chambre à flux et des cellules autofluorescentes a permis d'analyser à l'échelle de la cellule individuelle les mouvements cellulaires au sein de biofilm de *Bacillus cereus* .Il a été décrit l'existence d'une sous population de cellules hypermobiles capables de se mouvoir à des vitesses étonnantes élevées (Jusqu'à 16µm) compte tenu de l'énergie cinétique nécessaire pour se frayer un chemin à travers la biomasse du biofilm .Ces mouvements ont été détectés jusque dans les couches les plus profondes du biofilm de *Bacillus cereus* .Un second type de mouvement a été détecté pour des populations de petites chainettes qui réalisent des mouvements circulaires à une fréquence de l'ordre de 0.2Hz .Ces mouvements de rotation confèrent à la structure du

biofilm un désagrément local par un effet « vis sans fin ». Les mouvements cellulaires diminuent avec l'âge du biofilm .(Tolker-Nielsen et al ., 2000)

La présence de sous population mobiles et immobiles au sein du biofilm aboutie aux phénomènes de compétition spatiale et de limitation des transferts de masse (Houry.,2009)

2.L'architecture du biofilm

L'architecture du biofilm est hétérogène à la fois dans l'espace et dans le temps en raison de l'évolution des processus internes et externes (Tolker-Nielsen et al ., 2000)

Il est impossible de généraliser l'architecture et l'activité physiologique en raison de la grande variété d'environnement dans les quels les espèces microbiennes se trouvent (Sutherland .,2001)

Le modèle de base de l'architecture de biofilm est parfois appelés « champignons » avec des canaux d'eaux et qui ont été découvert à partir d'espèces unique in vitro (Wood et al ., 2000).

2.1. L'EPS (Substance exopolymère)

Les biofilms sont composés principalement de cellules microbiennes et d'EPS.

❖ Définition

L'EPS est une substance bactérienne exopolymère libérés en réponse au stress physiologique rencontrés dans le milieu naturel (Lewandowski., 2004).

Il peut représenter 50 à 90% du carbone organique total des biofilm et il peut être considéré comme la matière première de la matrice du biofilm (Flemming ., 2000).

L'augmentation d'EPS au sein du biofilm est liée à la fois de la lente croissance bactérienne et à l'âge du biofilm (Leriche et al ., 2000 ;Sutherland ., 2001).

❖ Les propriétés d'EPS

L'EPS peut varier dans les propriétés chimiques et physiques mais il est principalement composé de polysaccharides dont certains sont neutre ou polyanionique , comme le cas des EPS des bactéries à gram négatives , la présence d'acide uronique tels que les acides D glycaronique , D galacturonique et mannuronique , ou pyruvates ,acétal qui confèrent la propriétés anionique (Sutherland.,2001). Cette propriété est importante car elle permet

l'association de cations divalents aboutissant à un biofilm développé (**Flemming et al ., 2000**).

Dans le cas de certaines bactéries à gram positives telles que les *Staphylocoques* ou les *Bacillus* , la composition chimique des EPS peuvent être différentes et peuvent être principalement cationique (**Hussain et al ., 1993**).

L'EPS est également fortement hydratée car il peut incorporer de grandes quantités d'eau dans sa structure par des liaisons d'hydrogènes .L'EPS peut être hydrophobe, bien que la plupart des types d'EPS soient à la fois hydrophiles et hydrophobes (**Sutherland., 2001**).Il peut aussi varier dans sa solubilité .Sutherland (2001) a noté deux propriétés importantes d'EPS qui peuvent avoir un effet marqué sur le biofilm

- ✓ Premièrement, la composition et la structure des polysaccharides détermine leur conformation primaire, par exemple :de nombreux bactéries possèdent des structures d'EPS épines dorsale qui contiennent du 1,3 ou des résidus hexose 1,4 B liés et qui ont tendance à être plus rigides , moins déformables et dans certains cas peu solubles
- ✓ Deuxièmement, l'EPS du biofilm n'est généralement pas uniforme, mais peut varier spatialement et temporellement

2.2 .Le quorum sensing

La formation de biofilm implique de multiples voies de signalisation convergente et d'un programme génétique pour la transition de l'état de croissance planctonique au mode de développement du biofilm (**O'toole, Kolter ., 1998**).

Un mode de régulation et de communication entre les bactéries en biofilm dit quorum sensing correspond à une signalisation et une régulation qui dépend de la densité bactérienne (**Parsek et Greenbery ., 2000**).

Chez les bactéries à gram négatives telles que *P. aeruginosa* dont le quorum sensing joue un rôle important dans la différenciation du biofilm (**Parsek et Greenbery .,2000**).

Pour *Bacillus cereus* , le quorum sensing est impliqué dans la formation du biofilm en montrant le rôle de PicR dans la formation de biofilm par la souche *Bacillus cereus* ATCC 14579. Le PicR est un régulateur pléiotrope , il est activé par un petit peptide diffusible



(PARR) qui agit comme un effecteur du quorum sensing , il contrôle l'expression d'une variété de gènes codant pour des facteurs de virulences potentiels .Il a été montré que le mutant *picR* produit des niveaux élevés de biofilm que le type sauvage , cela explique que la formation de biofilm a été renforcée dans le cadre de faibles conditions d'éléments nutritifs et que la formation du biofilm est tributaire de la production de biosurfactants qui ont été directement ou indirectement réprimé par *PicR* (**Wong.,20006**).

2.3. Le transfert des gènes

Les résultats obtenues par un certain nombre de chercheurs indiquent que le transfert de gènes se produit facilement dans les biofilms soit par conjugaison ou par transformation .En outre , les données soutiennent également que l'échange génétique se fait à une fréquence plus élevée dans les cellules de biofilm que dans les cellules planctoniques (**Blakesch et Schoolnik .,2007**)

En effet le transfert des gènes a été mis en évidence dans un modèle d'*E. coli* dont elles possèdent trois plasmides différents qui peuvent être transférés (Probablement par conjugaison) (**Lebaron et al ., 1997**).Le caractère de former le biofilm d'une souche d'*E.coli* donatrice a été transféré à une autre souche d'*E.coli* réceptrice qui devient autorisé à former le biofilm . Une souche d'*E.coli* donatrice portant le plasmide R1 drd19 qui confère la résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline au bout de 24 h , les souches réceptrice (les transconjuguants) sont devenues résistantes au chloramphénicol et à l'ampicilline (**Licht et al .,1999**)

3. Physiologie et interaction des bactéries du biofilm

La croissance des bactéries au sein du biofilm leur confèrent plusieurs bénéfices :

D'abord, les bactéries sont protégés contre les effets inhibiteurs des composés antimicrobiens, les biocides, les agressions chimique comme le Ph et l'oxygène et des contraintes physiques comme la pression, la chaleur

Deuxièmement, une augmentation de la matrice polymérique permettra l'acheminement des canaux d'eaux au sein du biofilm et favorisera ainsi une chance réduite de la déshydratation des cellules bactériennes tandis que les cellules planctoniques sont soumises à cette contrainte

Troisièmement, la proximité des microorganismes dans les biofilm permet aux nutriments, les métabolites et du matériel génétique à être facilement échangées (**Trachoo., 2003**)

La division cellulaire est rare dans un biofilm mature, et l'énergie qui est utilisée pour produire des exopolysaccharide dont les cellules de biofilm peuvent servir comme éléments nutritifs (**Watnick et Kolter ., 2000**)

➤ **Les interactions des microorganismes au sein du biofilm**

Les organismes composant le biofilm peut également avoir un effet marqué sur la structure du biofilm, en effet , il a été montré que l'épaisseur du biofilm pourrait être affectée par le nombre d'organismes qui le constituent (**James et al .,1995**)

Des cultures pure de biofilm de *K. pneumoniae* ou un biofilm de *P. aeruginosa* dans un réacteur de laboratoire était plus mince (15um et 30um respectivement) tandis qu'un biofilm contenant les deux espèces était plus épaisse (40um) et cela s'explique qu'une espèce renforce la stabilité de l'autre (**Jones et al ., 1995**)

Une autre interaction rencontré, chez *Bacillus cereus* et *Pseudomonas fluorescens* .Lorsque ces deux souches de trouvent ensemble sur l'acier inoxydable formant ainsi un biofilm binaire, les spores de *Bacillus cereus* étaient plus faibles dans un biofilm mixte par rapport à un biofilm mono espèce. En outre le traitement au dioxyde de chlore a été moins efficace contre *P. fluorescens* lorsque le biofilm contenait également *Bacillus cereus* .Tandis que *Bacillus cereus* était plus faible lorsqu'elles sont traités avec du dioxyde de chlore dans le biofilm mixte par rapport à un système mono espèce (**Lindsay .,2002**)

Matériel et méthode

I. Evaluation du biofilm de *Bacillus cereus* en fonction du milieu de culture par la technique TM

I.1. les cultures bactériennes :

L'étude du développement du biofilm a été réalisée sur des souches appartenant au groupe de *Bacillus cereus* isolées lors des travaux antérieurs.

I.1.1.Origine des souches

Ces souches ont été isolées à partir des équipements laitiers dans une entreprise de production laitière. Les prélèvements ont été effectués aux niveaux des canalisations (circuits fermés) avant et après l'application du système CIP au niveau de 2 sites différents :

- Segments linéaires
- Segments non linéaires (coudes)

Les souches ont été conservées par congélation dans du bouillon Luria à 30% de glycérol

I.1.2.Revivification des souches

Les souches conservées sur bouillon Luria à 30% de glycérol sont revivifiées dans des tubes contenant 7ml du bouillon nutritif et incubées à 30°C pendant 24h puis à partir des tubes de 7ml, 1 ml est prélevé et mis dans des tubes de 7ml de bouillon nutritif afin de permettre l'enrichissement des souches

I.1.2.Préparation de la suspension sporale

La suspension sporale est préparée selon la technique de Mazas et al (1995)

Après l'enrichissement des souches, un ensemencement est effectué sur Luria agar(L.A). Les boîtes sont incubées pendant 7jours, et un tapis se forme à la surface. Ces cultures sont utilisées pour plus de 90% de spores. Le taux de sporulation a été vérifié par examen microscopique après coloration à la fushine (**Figure 01**)

Matériels et
méthodes

Le protocole expérimental adapté dans cette partie est représenté schématiquement par la figure 08.

II. Évaluation du biofilm à *Bacillus cereus* en fonction de l'âge par deux techniques

II.1. la technique TM

Dans cette partie nous avons réalisé des biofilms sur bouillon nutritif par la technique TM. Les souches utilisés sont les souches M116 ,M19 ,M56 ,M12, M79, pour chaque une d'elle six biofilms sont formés et incubés pour des délais d'incubation de 6h ,24h,48h,72h ,4j ,5j .A l'issue des délais , les tubes sont vidés, rincés, et séchés, puis le cristal violet est ajouté, puis rincés à nouveau afin d'ajouter la solution dissolvante, ensuite mesurer la DO à 590nm .

II.2.Préparation des biofilm sur des lames en acier inoxydable

Dans cette partie, des biofilm de plusieurs âges (6h ,24h, 48h ,72h, 4j ,5j) sont préparés sur des lames d'acier inoxydable en utilisant 3 souches de *Bacillus cereus* (M116, M19, M79)

Les lames sont traitées et stérilisés avant leur utilisation.

Matériel et méthode

Les milieux de cultures utilisés pour l'obtention des biofilm expérimentaux par la technique TM sont les suivant :

- Le Bouillon nutritif
- Le lait recombinaé
- Le lait de vache

La formation de biofilm est effectuée par 5 souches de *Bacillus cereus*.

➤ Adhésion des spores sur les parois des tubes

2ml de la suspension sporale sont versé dans des tubes à hémolyses, et la durée d'adhésion est entre 3h à 4h à 30°C.

➤ Inoculation du milieu de culture

Une fois que les spores sont adhérents, les tubes sont vidés et rincés avec de l'EDS afin d'éliminer les cellules non adhérentes, puis 2 ml du milieu de culture sont ajoutés (bouillon nutritif, lait recombinaé, lait de vache), après les tubes sont incubés à 30°C pendant 24heures.

➤ La technique TM (Christensen ., 1992) :

Les tubes incubés pendant 24 heures sont retirés de l'étuve, sont vidés et rincés avec de l'EDS, puis séchés en position renversée. Du cristal violet (à 1%) est ajouté pour la coloration, puis les tubes sont vidés et rincés à nouveau par l'ajout de 2 ml de la solution dissolvante et enfin la DO est mesurée à 590nm (**Figure 07**).

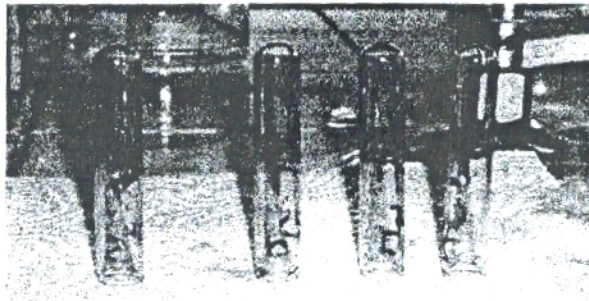


Figure 07 : formation du biofilm sur les parois des tubes



Figure 06 : *B.cereus* en phase de sporulation , observée par examen microscopique

De l'EDS est versée dans les boites permettant la récupération de la couche des spores formée dans un bécher stérile à l'aide d'une pipette Pasteur sous forme de râteau.

La solution du bécher est versée dans un tube à hémolyse pour subir une série de centrifugation :

La première centrifugation est à 500 g pendant 5minutes , son culot est jeté , puis la deuxième à 2000g pendant 20minutes , le surnageant de cette centrifugation est jeté et on le remplace par le même volume d'EDS .En fin une troisième centrifugation est effectuée à 2000g pendant 20minutes , son surnageant est aussi jeté et l'EDS est à nouveau ajoutée au culot au même volume.

I.1.3.Traitement thermique de la suspension sporale

Une fois les centrifugations effectuées, les suspensions subissent un traitement thermique à 75°C pendant 15 minutes afin d'éliminer les cellules végétatives résiduelles.

I.1.4. Détermination du nombre des spores :

Les suspensions sporales ainsi préparées subissent des dilutions puis leur densité optique (DO) est mesurée à 590 nm à l'aide d'un colorimètre et la dilution convenable est choisie (10^{-8} - 10^{-10}) pour le reste des expériences.

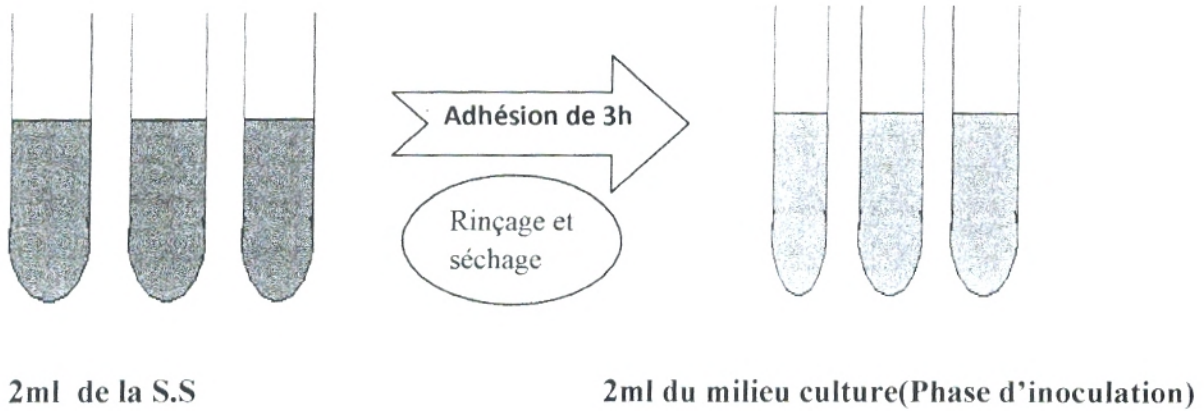
I.2. Préparation des biofilm expérimentaux sur différent milieux de culture par la technique TM

L'obtention des biofilm peut être effectuée par différentes techniques et sur des milieux de culture variés. Des milieux à base de l'aliment produit peuvent également être utilisés, c'est le cas du lait pour l'étude des biofilms du milieu laitier.

Partie 2

Expérimentation et résultats

Matériel et méthode



Incubation à 30°C pendant 24 h

Rinçage des tubes à hémolyses à l'EDS

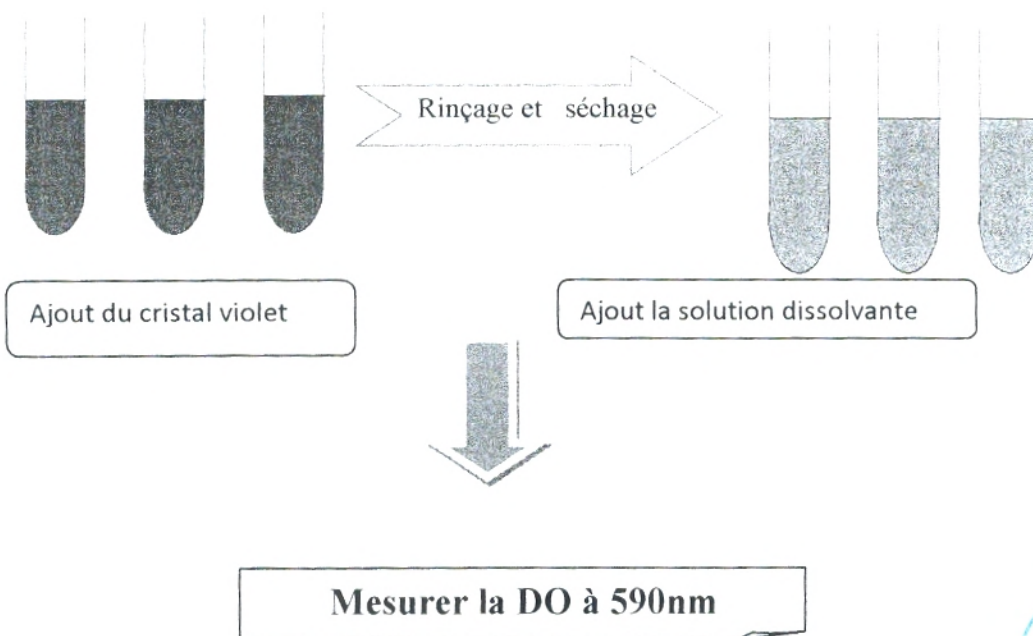


Figure 08 : Schéma simplifié de la technique TM



II.2.1. Traitement des lames d'acier inoxydable

Les lames sont préparées selon la technique de Peng et al (2001). Elles sont d'abord coupées dans des dimensions de 2cm sur 2cm, puis sont submergées dans un mélange d'éthanol et d'acétone (v/v) pendant une heure afin d'éliminer toutes trace de matière grasses. Ensuite elles sont rincées à l'EDS puis elles sont submergées dans une solution de NaOH à 2 % pendant 5 minutes. Après un deuxième rinçage à l'EDS. Les lames sont submergées dans la solution du HNO₃ à 1% pendant 5 minutes. Enfin les lames subissent un dernier rinçage à l'EDS puis elles sont recouverte avec du papier d'aluminium pour être stérilisées.

Pour la formation du biofilm à *Bacillus cereus*, la méthode « Porte germe » est utilisé (Maris., 1992). Celle-ci consiste à déposer un certain volume de la suspension sporale avec le même volume du milieu de culture au centre de la lame.

Le processus de la formation de biofilm se fait ainsi en deux étapes distinctes :

II.2.2. Etape d'adhésion des spores à l'inox

Sur les lames ainsi préparées, 0.1ml est déposé de la suspension sporale au centre de la lame. Les lames sont mises dans des boîtes en verre et incubées à 30 °C pendant 3 à 4 heures afin de permettre l'adhésion des spores (chaque lame dans une boîte correspond à un âge).

II.2.3. Etape de formation des biofilms sur l'inox

Après cette phase d'adhésion, les souches subissent un rinçage à l'EDS pour éliminer les cellules non adhérentes à la surface. Pour obtenir des biofilms de différents âge, il faut ajouter aux lames d'adhésion 0.1ml de Bouillon nutritif, les lames sont incubées à 30°C pendant une durée bien déterminée selon l'âge désiré en tenant compte du fait qu'il faut renouveler le milieu de culture toutes les 24 heures après le rinçage des lames à l'EDS.

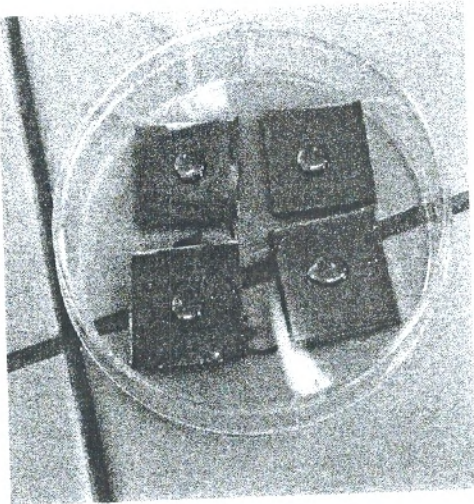
II.2.4. Détermination du nombre de cellules en biofilm

Après la durée d'incubation, les boîtes contenant les lames du biofilm sont retirés de l'étuve, puis elles sont rincées 3 fois par de l'EDS.

Avec un écouvillon humidifié par de l'EDS contenu dans un tube, la surface inoculée est grattée puis l'écouvillon est plongé dans un tube à hémolyse contenant de l'EDS et qui servira de la solution mère pour la préparation des dilutions.

Matériel et méthode

La solution mère est agitée dans un vortex pendant une minute. A partir de ce tube des dilutions sont préparées puisensemencés sur des boites de pétri contenant Luria agar .Après 24 -48 heure, un dénombrement est effectué.



0.1ml de la suspension sporale est ajouté



0.1ml du milieu de culture est ajouté

Figure 09 : Formation du biofilm par la méthode Porte germe

Résultats et discussions

Résultats et discussion :

1. Evaluation du pouvoir d'adhésion des souches

Les résultats du dénombrement des suspension sporales et des cultures cellulaires sur BN des cinq souches de *Bacillus cereus* adhérees (M116, M19, M56, M12, M79) selon la technique TM sont portés sur la figure 10.

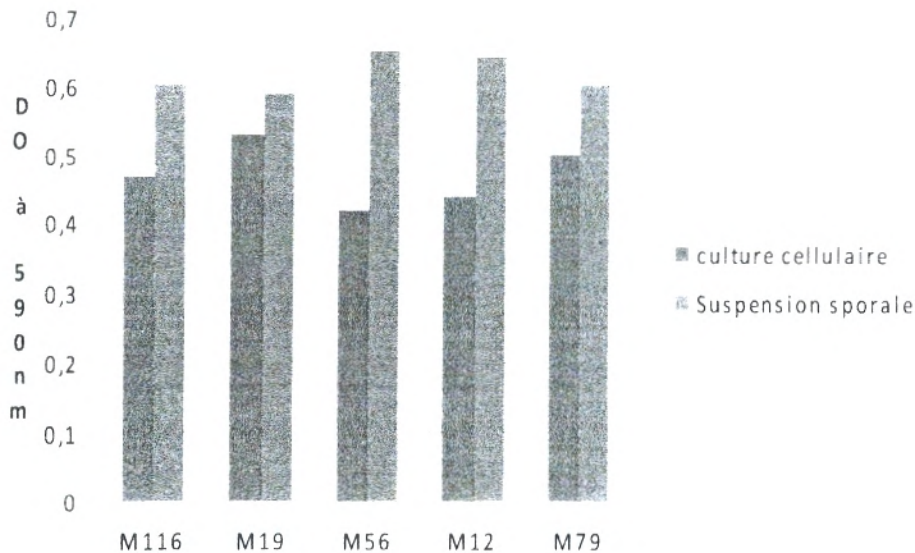


Figure 10 : Résultat du dénombrement des bactéries en biofilm

D'après les résultats obtenus de la figure 10, on arrive à constater concernant les deux souches M56 et M12 qu'il y'a une plus forte adhésion des spores comparée à celle des cellules végétatives. Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique. En effet ceci est prouvé par **Ronner et al (1990)** en montrant que les spores adhèrent mieux que les cellules végétatives.

Par contre, pour les autre 3 souches (M116, M19, M79) la différence entre les taux d'adhésion des spores et les cultures cellulaires est faible.

Le rapprochement du taux d'adhésion peut être expliqué par une proportion élevé de spores dans les cultures cellulaires. Les souches correspondantes M116, M19, M79 sporulent probablement rapidement de sorte que dans ces cultures la proportion des spores est supérieur à celles des cellules végétatives. Et dans ces conditions l'adhésion enregistrée est celle des spores et non des cellules végétatives.

L'adhésion forte des 5 souches testées est logique sachant que les spores du groupe *Bacillus cereus* sont entourées d'un exosporium impliqué dans le phénomène d'adhésion. Cependant l'exosporium diffère d'une souche à l'autre par des caractères morphologiques : le nombre d'appendices et la composition saccharidique de l'exosporium (Lequette., 2009). Ce qui explique que les différentes souches peuvent adhérer différemment.

La figure 10 décrit que la plus part des souches adhèrent fortement au bout de 3 heures.

Des recherches ont été effectuées dans le but de comprendre le rôle de la camélysine codé par le gène calY (BC1281) qui est transcrit au moment de la formation du biofilm. La camélysine est localisée chez *B. cereus* à la surface cellulaire, et est présente en quantité beaucoup plus importante dans les bactéries en biofilm comparativement aux bactéries planctoniques. La délétion du gène calY rend la capacité d'adhésion de *Bacillus cereus* fortement diminuée. Il a été suggéré que la camélysine est impliquée directement dans l'adhésion. La complémentation du mutant- calY restaure les capacités d'adhésion, confirmant le rôle de cette protéine de surface dans les interactions cellulaires. (Nielsen et Lereclus ., 2008).

Des expériences ont été effectuées afin d'étudier l'influence du temps d'incubation sur l'adhésion des populations de *Bacillus cereus* et celle de *Listeria monocytogenes*, vu qu'elles font parties des germes d'altération des équipement industriel, et dans le but de comparer la capacité d'adhésion des deux espèces. Il a été ainsi montré que les spores de *Bacillus cereus* sont dotés d'un pouvoir d'adhésion plus important que les cellules du *Listeria monocytogenes*. (Briandet et al ., 2008)

II. Impact du facteur milieux de culture sur l'évaluation du biofilm chez

Bacillus cereus

La figure 11 décrit l'évaluation du biofilm de *Bacillus cereus* au bout de 24 h en fonction du milieu de culture (Bouillon nutritif, lait recombinaé, lait de vache) par la technique TM.

Résultats et discussion

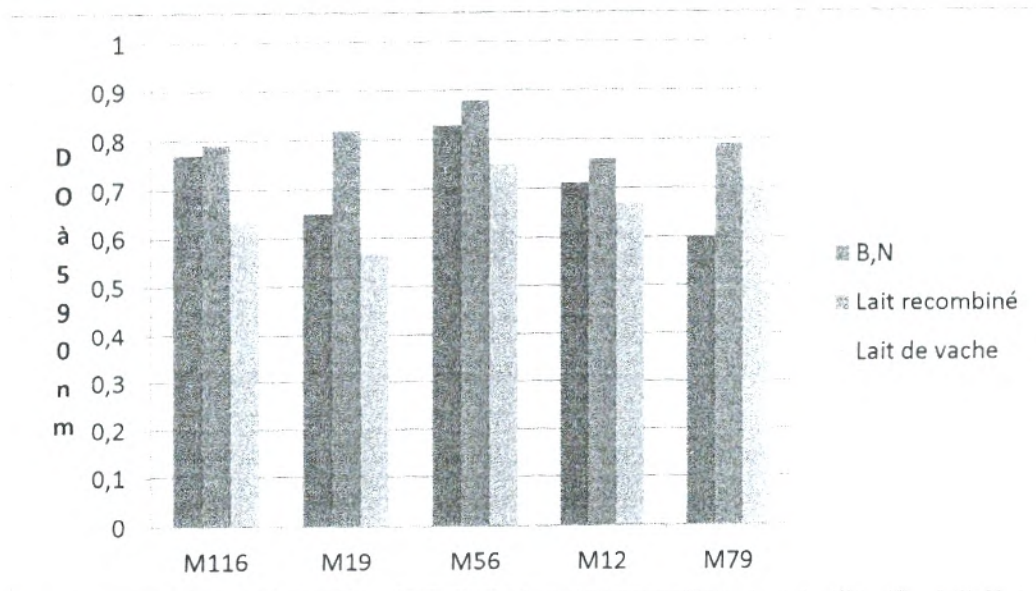


Figure 11 : Evolution du biofilm de *Bacillus cereus* en fonction du milieu de culture par la technique TM

Les résultats indiquent que toutes les souches testées développent un biofilm important au bout de 24 h dans les 3 milieux utilisés avec des taux relativement plus élevés dans le lait recombiné. Les DO varient de 0.76 à 0.88.

Le bouillon nutritif vient en 2^{ème} position pour les souches M116, M19, M56, M12 avec des DO respectives de l'ordre de : 0.77, 0.65, 0.83, 0.71. La souche M79 donne des DO plus élevés dans le lait de vache comparé au bouillon nutritif.

Ces résultats montrent clairement que les 3 milieux de cultures sont favorables pour la formation du biofilm avec des taux de croissances légèrement différents.

Des expériences ont été effectuées dans le but de comprendre l'influence des milieux de culture sur l'évaluation du biofilm de *Bacillus cereus*, en effet il a été montré qu'un biofilm réalisé à base du lait écrémé dilué est plus important qu'un biofilm à base de lait écrémé non dilué. Ce qui suggère que dans des milieux pauvres en nutriments, les bactéries du groupe *Bacillus cereus* forment des biofilms importants probablement en réponse à des conditions de stress.

Des recherches ont été réalisées dans le but de comprendre les mécanismes de formation de biofilm par *Bacillus cereus* en étudiant le rôle d'un régulateur pléiotrope PicR dans la formation du Biofilm activé par un petit peptide diffusible dans le milieu extracellulaire (PARR). L'interaction PARR et PicR déclenche le quorum sensing. Il a été constaté que le

Références bibliographiques

38. **Massimiliano Marvasi ,Pieter T . Visscher , Lilliam Casillas Martinez.**
Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis* :polymers and genes encoding their synthesis (2010)
39. **Mazas, M., Gonzalez, I., Lopez, M., Gonzalez, J., Martin, R., 1995.** Effect of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. Int.J.Food Sci. Technol.30 : 71-78.
40. **Nicolas . Bernet , 2008** ,Maitrise. Intègrée des Biofilms Papetiers par action combinée à faible impact environnemental
41. **Ouazzani, Abdennacer., Ouahcine Sid ahmed., 2006.** Etude de l'adhésion de *Bacillus cereus* à l'acier inoxydable et de l'effet du facteur age du biofilm sur le nombre de cellules adhéres.
42. **Peng, J-S., Tsai, W.C., Chou, C-C., 2001.** Surface characteristics of *Bacillus cereus* spores and its adhesion to stainless steel. International journal of Food Microbiology. 65: 105-111.
43. **Ronner, U., Husmark, U., Henriksson,A., 1990.**Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. Journal of applied Microbiology. 69 : 550-556.
44. **Sutherland, IW,** Microbiol expolysaccharides , their role in microbial adhesion in aqueous systems .Crit Rev Microbiol, 2001 ; 10: 173-201.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Matériels utilisés

➤ **Equipement :**

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

➤ **Verrerie :**

- Erlenmeyer de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml ;
- Becher de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml ;
- Fiole jaugée ;
- Flacons en verre de 250ml ;
- Boite de Petrie en plastique ;
- Pipetes Pasteur ;
- Pipetes graduées
- Anse de platine ;



- Tubes à essais ;
- Tubes à hémolyses ;
- Lames et Lamelles ;
- Pincés ;
- Cuvettes de spectromètre ;
- Ecouvillons ;

➤ **Produits chimiques :**

- Acétate d'éthyle ;
- Cristal violet ;
- Méthanol ;
- Acide acétique ;
- EDS

Annexe 2 : Solutions et diluants

↓ **Eau physiologique :**

Eau distillée	1000 ml
NaCl	8.5 g

↓ **Solution dissolvante :**

Méthanol	200 ml
Acide acétique glacial	50 ml
H ₂ O	250 ml

Annexe 3 : Les milieux de culture

↓ **Milieu Mossel de base ; PH= 7,2 +/- 0.2 :**

Extrait de viande	1 g
Peptone	10 g
D-mannitol	10 g
Chlorure de sodium	10 g
Rouge de phénol	0.025 g
Agar -agar	9-18 g
Eau distillée	900 ml

↓ **Gélose nutritive :**

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

↓ **Bouillon nutritif :**

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

↓ **Luria agar :**

Annexes

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