

❖ Nom et prénom de l'auteur : Tankiouine Safae  
Intitulé de la thèse : **Effet du conditionnement par le lait des supports utilisés en industrie laitière sur la biocontamination par *Staphylococcus aureus***

❖ Directeur de la thèse : Pr. Hassan Iatrache Professeur de l'Enseignement Supérieur.

❖ Co-encadrant : Pr. HAFIDA Zahir Professeur de l'Enseignement Supérieur.

❖ Intitulé et référence du CED Doctorat : Ressources naturelles, santé et Environnement.

❖ Directeur du CED : Pr. Saïd Melliani

❖ Responsable de formation : Pr. Abdelmajid Zyad

❖ Lieu de réalisation des travaux : Equipe bioprocédés et biointerfaces (EBPBI),  
Faculté des Sciences et Technique Beni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane

❖ Période de réalisation des travaux : 2014-2020

**Mots clés** : adhésion, MIR-FT, lait UHT écrémé, lait UHT entier, angle de contact, Propriétés physicochimiques, *Staphylococcus aureus*

**Laboratoire d'accueil** : Equipe de Bioprocédés et biointerface  
**Etablissement** : Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal



## DEDICACES

*A celle qui m'a donné sans rien en retour,  
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles,  
Et ceux à qui je dois tant*  
\*\*\*

*A ma chère maman  
Je te dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies.  
Et j'espère t'honorer par le titre du Docteur.*  
\*\*\*

*A mon cher papa pour son amour infini et son support continu,  
Je suis très heureuse et fière de ta présence à mes côtés.  
Et j'espère t'honorer par le titre du Docteur.*

\*\*\*

*A mes très chères sœurs Naoual et Imane  
Je suis très chanceuse de vous avoir à mes côtés  
Et je suis très reconnaissante pour votre support continu  
Merci pour votre soutien et vos encouragements*  
\*\*\*

*A tous mes enseignants  
A tous mes ami(e)s*  
\*\*\*

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour  
tout ce que vous avez fait pour moi  
Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur et tranquillité*

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction des Professeurs HASSAN LATRACHE et Hafida ZAHIR au sein du Laboratoire des Bioprocédés et Biointerfaces de la faculté des sciences et Techniques de Béni Mellal.

Par ces quelques lignes, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue pendant ce travail de thèse. Si je suis parvenue à son terme, c'est en grande partie grâce à leur soutien et leurs encouragements. Dès lors, à mes yeux, ce projet de recherche n'est pas que le mien mais également le leur. En premier lieu, je tiens à remercier Professeurs HASSAN LATRACHE et Hafida ZAHIR, sans qui cette thèse n'aurait jamais eu lieu. Merci de m'avoir offert cette opportunité et de m'avoir accordé votre confiance. Merci d'avoir passé de nombreuses heures à me former et à relire et corriger tous les manuscrits durant la thèse. Je vous remercie de vos précieux et valeureux conseils, vos critiques constructives et votre rigueur scientifique qui m'ont été très utiles. Vous avez été les promoteurs dont j'ai toujours rêvé. Vous savez à quel point je vous apprécie, que cela soit dans un cadre professionnel que plus personnel.

Je remercie sincèrement Professeur Mostafa ELLOUALI, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et son encadrement sans faille que pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail. Merci pour votre soutien, vos conseils pertinents et vos encouragements tout au long de ces années.

A mes collègues du laboratoire bioprocédés et bio-interfaces « Kawtar ELFAZZAZI, Soukaina SOUFIANI, Hajar KOUBALI, Chorouk ZANANE, Ayoub ELASSRI, Oubid AIT LHBIB, Mourad ELGOULLI, Abdelwahed ASSAIDI, Hakim TAOUFIK,... » témoignage de ma gratitude et ma reconnaissance pour votre soutien constant. J'adresse aussi mes profondes amitiés aux Doctorants et étudiants que j'ai eu le plaisir de côtoyer au laboratoire et en dehors. Qu'ils trouvent ici la manifestation de ma gratitude.

A mes amies ; Kamal ACHABI, Ghizlane DAHOU, Mohemmed SEKAK, Abdlmoula ABOU HILAL pour leurs amours infinis. Que Dieu vous protège et vous procure joie et bonheur et notre amitié reste à jamais.

Mes sincères remerciements à toutes les personnes, ami(e)s, collègues, qui ont contribués de près ou de loin à la réussite de notre travail.

## ☞ PRIX ET DISTINCTIONS

- ✚ Prix de **meilleure communication orale** au **Symposium sur les biofilms microbiens** : " Importance et applications ", Faculté des sciences et techniques de Fès ; 23 février 2019 avec la communication :
- ✚ K. Elfazazi, H. Zahir, **S. Tankiouine**, C. Zanane, B. Mayoussi, M. Ellouali, F. Hamadi, H. Latrache. Investigation on the efficiency of sodium hypochlorite sanitizer against adhesion ability of *Salmonella Kentucky* strains isolated from food processing industries.
- ✚ Prix de **meilleure communication affichée** au **Congrès International des Sciences Pharmaceutiques** », Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, 25-26 Février 2016, avec la communication :
- ✚ K. Elfazazi, **S. Tankiouine**, S. Lekchiri, C. Zanane, H. Rizki, H. Zahir, M. Mabrouki, M. Ellouali, H. Latrache. Etude de l'efficacité de certains protocoles de désinfection couramment utilisés en industries pharmaceutiques sur l'adhésion microbienne.

## ☞ PUBLICATIONS INTERNATIONNALES

- ✚ **SAFAE TANKIOUINE**, HAFIDA ZAHIR, MOURAD EL GOULLI, KAOUTAR ELFAZAZI, ABDELWAHID ASSAIDI, MOSTAFA EL LOUALI, HASSAN LATRACHE. Biocontamination risk of *Staphylococcus aureus* in dairy manufacturing presence of two types of UHT milk. Food and Nutrition Sciences. ID: 2702880.
- ✚ T. HAKIM, S. LKCHIRI, A. JAAFARI, **S. TANKIOUINE**, M. EL AMINE ALFILAL, M. ELOUALLI, H. ZAHIR, H. LATRACHE. Study of initial adhesion of a bacterium to different support materials before and after conditioning film of olive oil-mill wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology. DOI : <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2856>
- ✚ Mourad ELGOULLI, **Safae TANKIOUINE**, Oubid AITLAHBIB , Hafida ZAHIR , Mostafa EL LOUALI , Hassan LATRACHE. Effect of water temperature on surfaces physicochemical properties and bacterial adhesion to plumbing materials under dynamic conditions. Water science and engineering. Eurasia J Biosci 14, 7245-7251 (2020)
- ✚ Mourad Elgoulli, Oubid Aitlahbib, **Safae Tankiouine**, Abdelwahid Assaidi, Mostafa El Louali, Hafida Zahir & Hassan Latrache. The theoretical adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* on some plumbing materials in presence of distilled water or tap water. Doi : <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00868-y>
- ✚ Mourad ELGOULLI, **Safae TANKIOUINE**, Oubid AITLAHBIB , Hafida ZAHIR , Mostafa EL LOUALI , Hassan LATRACHE. Role of water in the contamination of drinking water systems by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Adhesion sciences and technology. (soumis)
- ✚ ELFAZAZI K., ZAHIR H., **TANKIOUINE S.**, ZANANE C, S. ELLOUALI M., LATRACHE H. (2018). Microbial Adhesion of *Salmonella Muenster*, *Salmonella Kentucky*, *Salmonella*

*Newport and Salmonella Kiel: Effect of Ionic Strength on Physicochemical Surface Properties, Annual Research & Review in Biology*, ISSN: 2347-565X, Vol.: 27, Issue.: 3, DOI : [10.9734/ARRB/2018/42502](https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/42502).

Abdelwahid Assaidia, Mostafa Ellouali, Hassan Latrache , Mustapha Mabrouki , Mohammed Timinouni, Hafida Zahir , **Safae Tankiouine** , Abouddihaj Barguiguad and El Mostafa Mliji. (2018). Adhesion of Legionella pneumophila on glass and plumbing materials commonly used in domestic water systems, *International Journal of Environmental Health Research*, ISSN: 0960-3123, Vol. 28. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1429580>.

Koffi OE, Bile BE , Bengourram J , Tankiouine S , Latrache H and Chtaini A. Electrochemical Study of Interaction of Bacteria and Clay. *Journ,al of J Microbial & Biochemical Technology*, ISSN: 1948-5948, Volume 8(2). DOI: 10.4172/1948-5948.1000263.

## ☞ COMMUNICATIONS DANS DES CONFERENCES NATIONALE ET INTERNATIONNALES

### Communications orales :

1. **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, K. ELFAZAZI, M. EL GOULLI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Comparaison of *staphylococcus aureus* adhesion on glass treated with two types of UHT milk. 16-20 Mars 2019 ; Second Mediterranean Congress on Biotechnology, Hammamet, Tunisie.
2. **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, K. ELFAZAZI, M. EL GOULLI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Caractérisation physicochimiques et spectral de l'inox 316L par lait UHT. Symposium sur les biofilms microbiens : " Importance et applications ", Faculté des sciences et techniques de Fès ; 23 février 2019
3. **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, K. ELFAZAZI, M. EL GOULLI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Comparison of *staphylococcus aureus* adhesion on glass treated with two types of UHT milk. 16-20 Mars 2019 ; Second Mediterranean Congress on Biotechnology, Hammamet, Tunisie.
4. **S. TANKIOUINE**, K. ELFAZAZI, A. ASSAIDI, H. ZAHIR, S. LEKCHIRI, M. MLIJI. Effet de la composition lipidique du lait sur l'adhésion de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 sur deux supports différents. 5ème Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces, 5-7 Mai 2015, FST Beni Mellal, Maroc.
5. M.ELGOULI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to sodium hypochlorite treatment under dynamic conditions. Biotech 2020, UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH, 29 /02/2020, Maroc.
6. S.HAMDAOUI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, M. EL LOUALI, H. LATRACHE. L'évaluation des différents protocoles de nettoyage et désinfection sur l'inox 316L. Bioresources,

biotechnologies et développement durable. 18,19 et 20 decembre 2019, oujda, Maroc

7. Z. ELHAFI, **S. TANKIOUINE**, M.EL LOUALI, H.ZAHIR, H.LATRACHE. Contribution de l'encrassement a la modification des propriétés physicochimiques des surfaces au secteur laitier. Bioresources, biotechnologies et developpement durable. 18,19 et 20 decembre 2019, oujda, Maroc.
8. M.ELGOULI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, M.ELLOUALI,H.LATRACHE .Effect of water type and surface properties of glass and PVC on the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 under dynamic conditions. Congrès Internaltional de Biotechnologies microbienne (BIOMIODS), Université Alakhawayn, 16-18 Octobre 2019, Ifrane.
9. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, M. MABROUKI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Comparison of physicochemical properties of stainless steels by the use of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in disinfection procedures of food industries and consequences on *Escherichia Coli* adhesion potential, 13-15 Octobre 2017 International Conference On Food Science & Technology, Rome, Italy.
10. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, M. MABROUKI, M. ELLOUALI, H. ZAHIR, M. MLIJI, H. LATRACHE. Etude de l'impact de certains protocoles de désinfection sur les propriétés des supports de l'acier inoxydable (304, 304L, 316L) couramment utilisés en agroalimentaires et leur effet sur l'adhésion microbienne. 13<sup>ème</sup> Forum Biodétérioration des Matériaux, 29-30 Mars 2016, Toulouse, France.
11. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, S. LEKCHIRI, M. MABROUKI, M. ELLOUALI, H. ZAHIR, M. MLIJI, H. LATRACHE. Etude de l'impact de certains protocoles de désinfection sur les propriétés des supports de l'acier inoxydable couramment utilisés en industries agroalimentaires. 5<sup>ème</sup> Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces, 5-7 Mai 2015, FST Beni Mellal, Maroc.
12. K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, **S. TANKIOUINE**, C. ZANANE, B. MAYOUSSI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE, Efficiency of commercial sanitizers against adhesion ability of *Salmonella Kentucky* and *Escherichia coli* strains isolated from food processing industries. Congrès Internaltional de Biotechnologies microbienne (BIOMIODS), Université Alakhawayn, 16-18 Octobre 2019, Ifrane
13. K. ELFAZAZI, L. CHAFKI, **S. TANKIOUINE**, M. JBILOU, M. BENBATI, M. ELHANSALI, A. HADDIOUI. Chemical and microbiological stability of Moroccan pomegranate juice depending on storage conditions. Second mediterranean congress on biotechnology. March 16,20 2019 Hammamet Tunisia.
14. K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, **S. TANKIOUINE**, C. ZANANE, B. MAYOUSSI, M. ELLOUALI, F. HAMADI, H. LATRACHE, Investigation on the efficiency of sodium hypochlorite sanitizer against adhesion ability of *Salmonella Kentucky* strains isolated from

food processing industries. Symposium sur les biofilms microbiens : " Importance et applications ", Faculté des sciences et techniques de Fès ; 23 février 2019

### **Communications Affichées :**

15. **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, K. ELFAZAZI, M. EL GOULLI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Etude des propriétés physicochimiques des support du verre traite par le lait UHT. Congrès International de Biotechnologies microbienne (BIOMIODS), Université Alakhawayn, 16-18 Octobre 2019, Ifrane.
16. **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, K. ELFAZAZI, M. EL GOULLI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Etude des propriétés physicochimiques des supports du verre traite par le lait UHT. 20-23 Mars 2019; 7eme congrès international de biotechnologie et valorisation des bioresources, tabrka, Tunisie.
17. **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, K. ELFAZAZI, M. EL GOULLI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Etude di lauryl sulfate de soduim sur la formation du biofilm de *staphylococcus aureus* et E.coli. 22-23 Février 2019, « 4ème Edition du Congrès International des Sciences Pharmaceutiques », Université Sultane Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Béni-Mellal
18. **S. TANKIOUINE**, M. ELLOUALI, K. ELFAZAZI, M. Goulli, H. ZAHIR, H. LATRACHE. Adhesion of *staphylococcus aureus* on glass treated with UHT milk. 3-4 May 2018, 6th Food Safty Congress, Istanbul, Turkey.
19. **S. TANKIOUINE**, K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, H. LATRACHE. 16-18 May 2017. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on polystyrene treated with milk, 16-18 May 2017 « 2nd international balkan agriculture congress », Tekirdag, Turkey.
20. **S. TANKIOUINE**, K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, S. LEKCHIRI, M. MLIJI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Evaluation du pouvoir adhésif de *staphylococcus aureus* sur le support de polystyrène traite par trois types du lait UHT. 13ème Forum Biodétérioration des Matériaux, 29-30 Mars 2016, Toulouse, France.
21. **S. TANKIOUINE**, K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Comparaison de l'adhésion expérimentale et théorique des souches de Salmonelles d'origine alimentaire. 5ème Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces, 5-7 Mai 2015, FST Beni Mellal, Maroc.
22. **S. TANKIOUINE**, K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, S. LEKCHIRI, M. ELLOUALI, M. MLIJI, H. LATRACHE. Adhesion of *Staphylococcus aureus* cultured in the UHT milk in polystyrene surface. 24-26 OCTOBER 2016, 3rd International congress on Microbial biotechnology for development « MICROBIOD 3 », Mohammedia, Maroc.
23. Z.Elhafa, **S.Tankiouin** , M.El Louali, H.Zahir, H.Latrache .Film conditioning for dairy industries and the risk of biocontamination. Congrès International de Biotechnologies microbienne (BIOMIODS), Université Alakhawayn, 16-18 Octobre 2019, Ifrane

24. S.hamdaoui , **S.Tankiouine**, H.Zahir , M.El Louali,H.Latrache. Caractérisation physico chimique des supports d'inox 316l utilisé dans l'industrie du fromagerie. 20-23 Mars 2019; 7eme congrès international de biotechnologie et valorisation des bioresources, tabrka, Tunisie.
25. M.ELGOULI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Effet de la température et des propriétés physicochimiques du verre et du PVC sur l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 en conditions dynamiques d'écoulement d'eau. 20-23 Mars 2019; 7eme congres international de biotechnologie et valorisation des bioresources, tabrka, Tunisie.
26. S.hamdaoui , **S.Tankiouine**, H.Zahir , M.El Louali,H.Latrache. Caractérisation physico chimique des supports d'inox 316l des différents âges utilisé dans l'industrie du fromage. Symposium sur les biofilms microbiens : " Importance et applications ", Faculté des sciences et techniques de Fès ; 23 février 2019.
27. M.ELGOULI, **S.TANKIOUINE**, H.ZAHIR, M.ELLOUALI,H.LATRACHE. Effet de la température et des propriétés physicochimiques du verre et du PVC sur l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 en conditions dynamiques d'écoulement d'eau. Symposium sur les biofilms microbiens : " Importance et applications ", Faculté des sciences et techniques de Fès ; 23 février 2019.
28. M.ELGOULI, **S.TANKIOUINE**, H.ZAHIR, M.ELLOUALI,H.LATRACHE. Adhésion prédictive de *Pseudomonas aeruginosa* ATTC sur des supports utilisés en canalisation d'eau de l'acier utilise dans l'industrie pharmaceutiques. 22-23 Février 2019, « 4ème Edition du Congrès International des Sciences Pharmaceutiques », Université Sultane Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Béni-Mellal.
29. M.ELGOULI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Adhésion prédictive de *Pseudomonas aeruginosa* ATTC sur des supports utilisés en canalisation d'eau. 1er congrès international sur l'innovation, la qualité et sécurité sanitaire des aliments. Faculté des sciences et techniques de Fès, 28 et 29 et 30 novembre 2018.
30. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, H. ZAHIR, B. MAYOUSSI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Microbiological stability of carob's drink (*ceratonia siliqua* L.) based on predictive modelling. 3-4 May 2018, 6th Food Safty Congress, Istanbul, Turkey.
31. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, C. ZANANE, H. ZAHIR, M. ELLOUALI, M. MLIJI, H. LATRACHE. Comparison of qualitative and quantitative hydrophobicity to explain the microbial adhesion behavior. 24-26 OCTOBER 2016, 3rd International congress on Microbial biotechnology for development « MICROBIOD 3 », Mohammedia, Maroc.
32. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, S. LEKCHIRI, C. ZANANE, H. RIZKI, H. ZAHIR, M. MABROUKI, M. ELLOUALI, H. LATRACHE. Etude de l'efficacité de certains protocoles de désinfection couramment utilisés en industries pharmaceutiques sur l'adhésion microbienne. 25-26 Février 2016, « 1ère Edition du Congrès International des Sciences Pharmaceutiques », Université Sultane Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Béni-Mellal.



33. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, S. LEKCHIRI, M. ELLOUALI, H. ZAHIR, M. MLIJI, H. LATRACHE. Etude du rôle de la force ionique et du temps de contact sur l'adhésion d'Escherichia coli isolée des aliments. 13ème Forum Biodétérioration des Matériaux, 29-30 Mars 2016, Toulouse, France.
34. K. ELFAZAZI, **S. TANKIOUINE**, B. MAYOUSSI, M. ELLOUALI, H. ZAHIR, M. MLIJI, H. LATRACHE. Etude de l'adhésion microbienne d'une dizaine de souche des Escherichia coli isolées des aliments. 5ème Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces, 5-7 Mai 2015, FST Beni Mellal, Maroc.
35. K. ELFAZAZI, H. ZAHIR, **S. TANKIOUINE**, H. LATRACHE. Physicochemical properties modification of stainless steels 304l by the use of sodium hypochlorite in disinfection procedures of food industries and consequences on Escherichia coli adhesion potential, 16-18 May 2017 « 2nd international balkan agriculture congress », Tekirdag, Turkey.
36. R. ELOTHMANI, H. ZAHIR, C. ZANANE, **S. TANKIOUINE**, K. ELFAZAZI, H. LATRACHE. Prevention of adhesion and biofilm formation by actinomycetes isolated from beni amir Moroccan saline soil. 17-18 Février 2017, « 2ème Edition du Congrès International des Sciences Pharmaceutiques », Université Sultane Moulay Slimane, Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, Béni-Mellal.
37. S.Er-rahmani, S.Hamdaoui, **S.Tankiouine**, H.Zahir, M.El Louali, S.Ibensouda, H.Latrache. Étude des propriétés physico-chimiques d'inox 316l traité par quatre produits de nettoyage et désinfection. Biotech 2020, université sidi Mohamed ben Abdellah, 29 /02/2020, Maroc.
38. A.ASSAIDI, E.MLIJI, H.LATRACHE, N.ELMDAGHRI, H.ENNAJI, **S. TANKIOUINE**, M. ELLOUALI. Legionella pneumophila et sa préoccupation au sein de la recherche à l'échelle du monde. 5ème Colloque Bioadhésion, Biocontamination des Surfaces, 5-7 Mai 2015, FST Beni Mellal, Maroc.

## Résumé

Les industries alimentaires se trouvent devant l'obligation de prendre toutes les mesures nécessaires visant à garantir la sécurité sanitaire de leurs produits. Les progrès importants réalisés en matière de sécurité microbiologique des aliments depuis 10 ans ont été accompagnés d'une multiplication des analyses effectuées par les usines sur les produits finis, les intrants et l'environnement industriel (chaîne de fabrication et locaux), pour identifier les sources de contamination et pour valider l'efficacité des mesures de maîtrise des dangers. Suite à la réduction des fréquences et des niveaux de contamination, le renforcement du niveau de maîtrise hygiénique des produits doit, maintenant, faire intervenir de nouveaux outils.

Les objectifs de cette étude sont d'une part, contribuer à la compréhension des phénomènes interraciales, régissant la biocontamination des matériaux utilisés en industrie laitière, et évaluer l'impact du prétraitement de différents supports par le lait UHT (entier, écrémé) sur les propriétés de surface des matériaux couramment utilisée en IAA et d'autre part analyser les conséquences éventuelles sur l'adhésion microbienne.

Le déroulement de ce travail consiste en premier lieu à isoler et identifier des bactéries à partir du lait cru, et à déterminer les propriétés physico-chimiques (l'hydrophobicité, le caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et le caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ )) des bactéries de *S.aureus* cultivées dans différents milieux de culture (LB, lait entier et lait écrémé). Nous avons constaté que le lait a un pouvoir remarquable de modifier l'hydrophobicité des surfaces bactériennes. Quel que soit le milieu de culture, les six souches étudiées présentent un caractère donneur d'électrons très remarquable, l'énergie libre d'adhésion  $\Delta G_{\text{wi}}$  présente des valeurs positives donc, quantitativement hydrophile, sauf pour la souche 3 cultivée dans le lait écrémé qui présente un caractère hydrophobe.

En deuxième lieu, nous avons étudié les caractères physicochimiques de 5 surfaces solides (verre, acier inoxydable 304, acier inoxydable 316l, polystyrène, et le polyéthylène), par l'angle de contact, les résultats montrent que le traitement par deux types du lait UHT (écrémé et entier) modifie considérablement les propriétés physico-chimiques des surfaces. Après le conditionnement de ces surfaces solides par le lait, l'analyse par spectroscopie infrarouge a montré la formation d'un film dont les molécules de nature très variable

En troisième lieu, nous avons étudié l'adhésion prédictive et expérimentale de ces six souches de *S.aureus* sur les supports étudiés. Les résultats, nous ont permis de constater que l'influence du traitement par le lait

UHT sur l'adhésion des *S.aureus* est fortement conditionnée par la nature du milieu de culture des bactéries. Ainsi il est très important de considérer ces différentes conditions dans la prédiction de la contamination en milieu laitier

En dernier lieu, nous avons étudié la cinétique d'adhésion de *S.aureus* sur le verre traité par le lait UHT. Les résultats indiquent que le taux de cellules adhérentes augmente avec le temps de contact et le temps de conditionnement. Ce qui pourrait constituer un outil de maîtrise pour prévoir un programme convenable de nettoyage et de désinfection, connaissant le temps nécessaire pour une contamination maximale dans les conditions industrielles.

**Mots clés** : support solides, *Staphylococcus aureus*, adhésion bactérienne, lait UHT, lait cru, propriétés physico-chimiques de surface, spectroscopie infrarouge,

## **Abstract**

Food industries are obliged to take all necessary measures to ensure the safety of their products. The significant progress made in the microbiological safety of food over the last 10 years has been accompanied by an increase in the number of analyses carried out by factories on finished products, inputs and the industrial environment (production line and premises), to identify sources of contamination and to validate the effectiveness of hazard control measures. Following the reduction of frequencies and levels of contamination, the reinforcement of the level of hygienic control of the products must now involve new tools.

The objectives of this study are, on the one hand, to contribute to the understanding of interracial phenomena, governing the biocontamination of materials used in the dairy industry, and to evaluate the impact of the pretreatment of various supports by UHT milk (whole, skimmed) on the surface properties of materials commonly used in the food industry and, on the other hand, to analyze the possible consequences on microbial adhesion.

The course of this work consists firstly in isolating and identifying bacteria from raw milk, and determining the physico-chemical properties (hydrophobicity, electron donor ( $\gamma^-$ ) and electron acceptor ( $\gamma^+$ ) character) of *S.aureus* bacteria grown in different culture media (LB, whole milk and skimmed milk). We found that milk has a remarkable power to modify the hydrophobicity of bacterial surfaces. Whatever the culture medium, the six strains studied show a very remarkable electron-donating character, the adhesion free energy  $\Delta G_{iwi}$  shows positive values thus, quantitatively hydrophilic, except for strain 3 grown in skim milk which shows a hydrophobic character.

Secondly, we studied the physicochemical characters of 5 solid surfaces (glass, stainless steel 304, stainless steel 316l, polystyrene, and polyethylene), by the contact angle, the results show that the treatment by two types of UHT milk (skimmed and whole milk) significantly changes the physicochemical properties of the surfaces. After the conditioning of these solid surfaces by the milk, the analysis by infrared spectroscopy showed the formation of a film whose molecules of very variable nature

Thirdly, we studied the predictive and experimental adhesion of these six strains of *S.aureus* on the studied supports. The results, allowed us to note that the influence of the treatment by the UHT milk on the adhesion of *S.aureus* is strongly conditioned by the nature of the medium of culture of the bacteria. Thus,

it is very important to consider these different conditions in the prediction of the contamination in dairy environment

Finally, we studied the adhesion kinetics of *S.aureus* on glass treated with UHT milk. The results indicate that the rate of adhered cells increases with the contact time and the conditioning time. This could be a control tool to plan a suitable cleaning and disinfection program, knowing the time needed for maximum contamination under industrial conditions.

**Keywords:** solid support, *Staphylococcus aureus*, bacterial adhesion, UHT milk, raw milk, physicochemical surface properties, IR spectroscopy

## SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS :

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE.....	- 1 -
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 1 -
CHAPITRE I : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> DANS LE LAIT DE VACHE.....	- 2 -
I. INTRODUCTION : .....	- 3 -
1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET ECOLOGIQUES :.....	- 3 -
2. CARACTERISTIQUES STRUCTURELLES :.....	- 4 -
3. FACTEURS DE VIRULENCE ET TOXI-INFECTION D'ORIGINE <i>S.AUREUS</i> :.....	- 6 -
3.1. LES FACTEURS DE VIRULENCE .....	- 7 -
3.2. INTOXICATIONS ALIMENTAIRES.....	- 9 -
4. LAIT : PROPRIETES, COMPOSITION ET MICROBIOLOGIE.....	- 10 -
4.1. INTRODUCTION : .....	- 10 -
4.2. DEFINITION DU LAIT : .....	- 11 -
4.3. PROPRIETES ORGANOLEPTIQUES : .....	- 11 -
4.4. PROPRIETES PHYSIQUES DU LAIT : .....	- 11 -
4.5. COMPOSITION DU LAIT : .....	- 13 -
4.6. MICROBIOLOGIE DU LAIT : .....	- 20 -
4.6.1.CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX MICROORGANISMES DU LAIT SELON LEUR IMPORTANCE : .....	- 20 -
CHAPITRE II : ADHESION BACTERIENNE ET PROPRIETES DE SURFACES : MECANISMES ET INTERACTIONS PHYSICO-CHIMIQUES SURFACE-BACTERIE .....	- 23 -
I. INTRODUCTION : .....	- 24 -
II. MECANISMES ET INTERACTIONS PHYSICO-CHIMIQUES : SURFACE-BACTERIE :.....	- 24 -
1. TRANSPORT DES MICROORGANISMES AUX SURFACES :.....	- 26 -
2. CONDITIONNEMENT DE LA SURFACE PAR LE MILIEU .....	- 26 -
3. ADHESION DES BACTERIES.....	- 27 -
4. CROISSANCE ET MATURATION DU BIOFILM BACTERIEN.....	- 27 -
5. FACTEURS CELLULAIRES INFLUENÇANT LE PHENOMENE D'ADHESION DES MICROORGANISMES :-	- 27 -
5.1. CARACTERISTIQUES DES CELLULES MICROBIENNES : .....	- 27 -
5.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SURFACE BACTERIENNE :.....	- 28 -
5.3. CARACTERISTIQUES DU SUPPORT INFLUENÇANT L'ADHESION .....	- 29 -
5.3.1.CARACTERISTIQUES ENERGETIQUES DES SURFACES SOLIDES .....	- 29 -
5.3.2.RUGOSITE DES SURFACES SOLIDES.....	- 29 -
5.3.3.FILM ORGANIQUE .....	- 30 -
5.3.4.NETTOYAGE DES SURFACES.....	- 30 -
5.4. CARACTERISTIQUES DU MILIEU ENVIRONNANT : .....	- 30 -
IV. INTERACTIONS PHYSICO-CHIMIQUES : .....	- 31 -
1. LES INTERACTIONS DE VAN DER WAALS.....	- 31 -
2. LES INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES : .....	- 33 -
3. LES INTERACTIONS ACIDO-BASIQUES :.....	- 33 -
V. LES APPROCHES THEORIQUES DE L'ADHESION BACTERIENNE AUX SURFACES SOLIDES :-	- 33 -
-	
1. APPROCHE THERMODYNAMIQUE :.....	- 33 -
2. APPROCHE DE L'ADHESION PAR LA THEORIE CLASSIQUE DLVO : .....	- 35 -
3. THEORIE DE DLVO MODIFIEE PAR VAN OSS (EXTENDED DLVO) : .....	- 37 -
CHAPITRE III : TECHNOLOGIES ET TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS MICROORGANISME/SUPPORT .....	40
I. INTRODUCTION : .....	41
II. TECHNIQUE DU MATS.....	41
III. LA CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE .....	42
IV. LE PARTAGE ENTRE DEUX PHASES (PEG/DEX) .....	42
1. DENOMBREMENT DES CELLULES VIABLES CULTIVABLES .....	43
2. LES MICROPLAQUES .....	43
3. METHODES MICROSCOPIQUES DE QUANTIFICATION DE L'ADHESION SUR UN SUPPORT SOLIDE : .....	43
VI. TECHNIQUES D'ETUDE DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES .....	45
1. LA METHODE DE L'ANGLE DE CONTACT.....	45
1.1. PRINCIPE : .....	46
1.2. CALCUL DE L'ENERGIE DE SURFACE : .....	46

1.2.1. MODELE DE NEUMANN :	47
1.2.2. MODELE D'OWENS ET WENDT :	47
1.2.3. MODELE DE GOOD VAN OSS :	47
2. LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE :	48
2.1. PRINCIPES DE BASE DE LA SPECTROSCOPIE INFRA ROUGE :	48
2.2. FONDEMENTS THEORIQUES :	49
2.3. ATTRIBUTION DES BANDES DANS LE MOYEN INFRA ROUGE :	51
2.4. LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FT-IR) :	52
2.4.1. SPECTROMETRE DISPERSIF :	52
2.5. ANALYSE DES DONNEES INFRAROUGE :	53
<b>DEUXIEME PARTIE : TECHNIQUES ET METHODES EXPERIMENTALES</b>	<b>54</b>
<b>I. SOUCHES BACTERIENNES :</b>	<b>55</b>
1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE <i>S.AUREUS</i> A PARTIR DE LAIT CRU	55
2. CONFIRMATION DES <i>S. AUREUS</i> PAR LE TEST CATALASE ET ADNASE :	55
2.1. TEST DE CATALASE :	55
2.2. TEST D'ADNASE :	55
2.3. CONDITIONS DE CULTURES :	56
2.3.1. MILIEUX DE CULTURE LAIT ENTIER	56
2.3.2. MILIEUX DE CULTURE LAIT ECREME :	56
<b>II. CARACTERISATION PHYSICO- CHIMIQUES DE LA SURFACE DES SOUCHES MICROBIENNES :</b>	<b>56</b>
1. PREPARATION DES FILTRES :	56
2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SOUCHES DE <i>S. AUREUS</i>	56
<b>III. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SUPPORTS SOLIDES</b>	<b>57</b>
1. TRAITEMENTS DES SUPPORTS PAR LE LAIT UHT (ENTIER ET ECREME) :	57
2. VERRE	57
3. ACIER INOXYDABLE	57
4. POLYSTYRENE	58
5. POLYETHYLENE :	58
6. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SURFACES DES SUPPORTS PAR L'ANGLE DE CONTACT	58
<b>IV. CARACTERISATION ENERGETIQUE DES SURFACES DES SUPPORTS SOLIDES ET DES SOUCHES BACTERIENNES ET ESTIMATION D'ADHESION PREDICTIVE :</b>	<b>58</b>
<b>V. ADHESION PREDICTIVE DE <i>S. AUREUS</i> SUR LES SUPPORTS SOLIDES : CALCUL DE L'ENERGIE LIBRE D'INTERACTION TOTALE</b>	<b>60</b>
<b>VI. ANALYSE DES SURFACES DES SUPPORTS PAR INFRAROUGE (MIR)</b>	<b>60</b>
<b>VII. L'ADHESION MICROBIENNE DE <i>S. AUREUS</i> SUR LES SURFACES SOLIDES</b>	<b>61</b>
1. PREPARATION DES SUSPENSIONS BACTERIENNES	61
2. TEST D'ADHESION SUR LE VERRE	61
2.1. ADHESION DES SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUR LE VERRE :	61
2.2. ADHESION DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> AU VERRE TRAITE PAR DEUX TYPES DU LAIT UHT :	61
2.3. REALISATION DE LA COLORATION DE GRAM DE <i>S. AUREUS</i> ADHERE AU VERRE TRAITE PAR LES DEUX TYPES DE LAIT :	61
2.4. QUANTIFICATION DE L'ADHESION DES BACTERIES PAR LE LOGICIEL MATLAB® :	61
3. TEST D'ADHESION DES SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> AU POLYSTYRENE :	62
<b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE I : ÉTUDES DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES SURFACES BACTERIENNES ET DES SUPPORTS SOLIDES PAR LA METHODE DE L'ANGLE DE CONTACT</b>	<b>64</b>
<b>I. INTRODUCTION :</b>	<b>65</b>
<b>II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE</b>	<b>66</b>
1. ISOLEMENT ET PURIFICATION	66
2. CONFIRMATION DES <i>S.AUREUS</i> PAR LE TEST CATALASE ET DNASE :	66
<b>III. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES SURFACES BACTERIENNES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES A PARTIR LAIT CRU</b>	<b>66</b>
A) HYDROPHOBICITE QUALITATIVE DE 6 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DU LAIT CRU ET CULTIVEES DANS LES 3 MILIEUX DE CULTURE (LB, LE LAIT ENTIER, ET LE LAIT ECREMEE)	68
B) CARACTERES DONNEUR/ACCEPTEUR D'ELECTRONS DES 6 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DU LAIT CRU ET CULTIVEES DANS LES 3 MILIEUX DE CULTURE (LB, LE LAIT ENTIER, ET LE LAIT ECREMEE)	68
C) L'ENERGIE LIBRE $\Delta GIWI$ (M.J.M-2) DES 6 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DU LAIT CRU ET CULTIVEES DANS LES 3 MILIEUX DE CULTURE (LB, LE LAIT ENTIER, ET LE LAIT ECREMEE)	70
<b>IV. DISCUSSIONS :</b>	<b>72</b>

V. CONCLUSIONS :	74
CHAPITRE II : PHYSICO-CHIMIE ET CHIMIE DES SURFACES DE 5 SUPPORTS SOLIDE CONDITIONNES PAR LE LAIT UHT.....	75
I. INTRODUCTION :	76
II. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SUPPORTS TRAITES ET NON TRAITES AVEC DEUX TYPES DE LAIT UHT :	77
1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES LES SUPPORTS SOLIDES NON TRAITES :	77
2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SUPPORTS SOLIDES TRAITES PAR DEUX TYPES DE LAIT UHT :	77
III. ETUDE DE FILM CONDITIONNANT DES SURFACES SOLIDES TRAITES PAR DEUX TYPES DU LAIT UHT PAR LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE :	85
1. SUPPORT DE VERRE :	85
2. SUPPORT D'ACIER INOXYDABLE (316L ET 304).....	87
3. LE SUPPORT DE POLYSTYRENE :	90
4. LE SUPPORT POLYETHYLENE :	91
IV. DISCUSSION.....	93
V. CONCLUSIONS :	95
CHAPITRE III : EFFET DU CONDITIONNEMENT PAR LE LAIT SUR L'ADHESION PREDICTIVE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUR LES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES SURFACES SOLIDES...	96
I. INTRODUCTION.....	96
II. EFFET DU MILIEU DE CULTURE SUR L'ADHESION PREDICTIVE DE 6 SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLEES DU LAIT CRU SUR LES SURFACES SOLIDES SELON L'APPROCHE DLVO ETENDUE :	97
III. EFFET DU CONDITIONNEMENT DES SUPPORTS PAR LE LAIT UHT ENTIER.....	99
IV. EFFET DU CONDITIONNEMENT DES SUPPORTS PAR LE LAIT UHT ECREME.....	100
V. DISCUSSION.....	102
VI. CONCLUSION :.....	103
CHAPITRE IV : INFLUENCE DE CONDITIONNEMENT PAR LE LAIT SUR L'ADHESION EXPERIMENTALE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUR DES SUPPORTS SOLIDES.....	104
I. INTRODUCTION :	105
II. EFFET DE LA NATURE DU MILIEU DE CULTURE SUR L'ADHESION DES SOUCHES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUR LE VERRE ET LE POLYSTYRENE :	106
III. DISCUSSION.....	111
IV. CONCLUSION :	113
CHAPITRE V : EFFET DU TEMPS DE CONDITIONNEMENT PAR DEUX TYPES DE LAIT UHT SUR LA CINETIQUE DE L'ADHESION DE <i>S. AUREUS</i> SUR LA SURFACE DU VERRE.....	114
I. INTRODUCTION :	115
II. EFFET DU TEMPS DE TRAITEMENT PAR DEUX TYPES DU LAIT UHT SUR LES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA SURFACE DU VERRE :	115
1. EFFET DU TEMPS DE TRAITEMENT PAR LE LAIT ENTIER :	116
A. L'HYDROPHOBICITE :	116
B. CARACTERE DONNEUR/ACCEPTEUR D'ELECTRON.....	117
5. EFFET DU TEMPS DE TRAITEMENT PAR LE LAIT ECREME :	118
A. HYDROPHOBICITE.....	118
B. CARACTERE DONNEUR/ACCEPTEUR D'ELECTRON.....	119
6. DISCUSSION :.....	120
III. EFFET DU TEMPS DE TRAITEMENT DE VERRES PAR DEUX TYPES DU LAIT UHT SUR L'ADHESION DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> CULTIVEE DANS LE LAIT UHT (ENTIER ET ECREME) :	120
1. DISCUSSIONS :.....	121
IV. CONCLUSION :.....	122
CONCLUSION GENERALE.....	123
REFERENCE :.....	126



**Liste des abréviations :**

<b>IR</b>	Infrarouge
<b>SMIR</b>	Spectroscopie moyen infrarouge
<b>SPIR</b>	Spectroscopie proche infrarouge
<b>IRMA</b>	Infrared Milk Analyser
<b>MIR-TF</b>	Spectroscopie moyen infrarouge a transformé de Fourier
<b>UFC</b>	unité formant colonie.
<b>PLS</b>	Régression des moindres carrés partiels (partial least square)
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>°D</b>	Degré Dornic
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>LB</b>	Luria Bertani
$\Delta G_{iwi}$	Energie libre d'interaction
$\Delta G_{Tot}$	Energie libre d'adhésion
<b><math>\theta_w</math></b>	Angle de contact de l'eau
$\gamma_i^{lw}$	Composantes de Lifshitz- Van der Waals de la surface;
$\gamma_i^-$	Composant e(s) donneurs d'électrons de la surface;

$\gamma_i^+$	Composante(s) accepteurs d'électrons de la surface ;
$\gamma_w^-$	Composant e(s) donneurs d'électrons de l'eau.
$\gamma_w^+$	Composante(s) accepteurs d'électrons de l'eau ;
$\gamma_w^{LW}$	Composantes de Lifshitz- Van der Waals de l'eau ;

## *Liste des figures*

Figure 1: Staphylocoques en amas après coloration de Gram (Fasquelle ; 1974).....	- 4 -
Figure 2: Structure de <i>S. aureus</i> (Lowy 1998). .....	- 5 -
Figure 3: Quelques-unes des activités composant la virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	- 8 -
Figure 4: Structure moléculaire du lactose. ....	- 19 -
Figure 5 : Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien. ....	- 25 -
Figure 6: Schéma de l'adhésion d'un microorganisme sur un support et les différentes interactions qui interviennent en fonction de leur distance de séparation (Fletcher, 1996). ....	- 31 -
Figure 7: Interaction de Keesom entre deux molécules polaires (Keesom en 1915). ....	- 32 -
Figure 8: Forces de Debye entre deux molécules séparées avec une distance (Debye en 1920). ....	- 32 -
<b>Figure 9: Forces de London entre deux molécules non polaires</b> .....	- 32 -
Figure 10: Présentation de l'adhésion d'un microorganisme à la surface solide selon l'approche thermodynamique (Bos et al. 1999). ....	- 33 -
Figure 11: L'épaisseur de la double couche en fonction de la force ionique de PBS à pH 7 (Bos et al. 2000).....	- 36 -
Figure 12: Energie d'interaction totale d'après DLVO entre deux entités qui sont chargées de même signe (a) : force ionique faible, (b) : force ionique intermédiaire, (c) : force ionique forte.....	- 36 -
Figure 13: Comparaison entre l'énergie d'interaction déduite de DLVO classique et DLVO développée (Bos et al., 1999).....	- 38 -
Figure 14: Principe général de l'AFM d'après (Dufrêne, 2002) .....	44
Figure 15: Angle de contact comme balance de force. Les énergies apolaires sont indiquées par des flèches pleines horizontales et verticales ; les énergies polaires (Acide-base de Lewis) sont désignées par des flèches à tirets horizontales et verticales. ....	46
Figure 16: Domaines spectraux du rayonnement électromagnétique.....	49
Figure 17: Schéma d'un spectromètre dispersif. ....	52
Figure 18: hydrophobicité qualitative de six souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et écrémée. ....	68
Figure 19: Caractères accepteur d'électrons de six souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et ecremee .....	69
Figure 20: Caractères donneur d'électrons de six souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et écrémée .....	70
Figure 21 : Energie libre de surface $\Delta G_{\text{Giwi}}$ (mJ.m <sup>-2</sup> ) de six souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et écrémée .....	71
Figure 22: l'hydrophobicité, les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{\text{Giwi}}$ ) du verre traites par deux types du lait UHT(entier et écrémée) .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 23: l'hydrophobicité, les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{\text{Giwi}}$ ) du polystyrène traites par deux types du lait UHT(entier et écrémée).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 24: l'hydrophobicité, les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{\text{Giwi}}$ ) du polyéthylène traites par deux types du lait UHT(entier et écrémée).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
: L'hydrophobicité, les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{\text{Giwi}}$ ) du l'inox 316l traites par deux types du lait UHT (entier et écrémée).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

Figure 26: l'hydrophobicité, les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{\text{wi}}$ ) du l'inox 304 traites par deux types du lait UHT (entier et écrémée).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 27: Spectre infrarouge du verre avant et après traitement par le lait UHT écrémé (a) et entier (b) .....	86
Figure 28: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface du verre.....	86
Figure 29: Spectres infrarouge moyen de l'acier 304 avant et après traitement par le lait UHT écrémé(a) et entier (b).....	88
Figure 30: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de l'Inox 304 .....	88
<b>Figure 31: e moyen de l'acier 316L avant et après le traitement avec lait UHT ecremee (a) et entier (</b> .....	<b>89</b>
Figure 32: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de l'Inox 316L.....	89
Figure 33: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de l'Inox 316L.. <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
<b>Figure 34: Spectre infrarouge du polystyrène avant et après le traitement par le lait UHT écrémée (a) et entier (b)</b> .....	<b>90</b>
Figure 35: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de polystyrène.....	91
Figure 36: Spectre infrarouge du polyéthylène avant et après traitement par le lait écrémée (a) et entier (b).....	92
Figure 37: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface du polyéthylène .....	92
Figure 38: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports. ....	98
Figure 39: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait entier sur les 5 supports.....	98
Figure 40: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait écrémé sur les 5 supports .....	99
Figure 41: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports traités par le lait entier .....	100
Figure 42: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait entier sur les 5 supports traités par le lait entier.....	100
Figure 43 : Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait écrémée sur les 5 supports traités par le lait entier .....	100
Figure 44: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports traités par le lait écrémé.....	101
Figure 45: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait écrémé sur les 5 supports traités par le lait ecremée .....	101
Figure 46: Adhésion prédictive de 6 souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait entier sur les 5 supports traités par le lait écrémé.....	102
<b>Figure 47: Observation microscopique des cellules de <i>staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait UHT entier et écrémé adhérees sur le verre non traité (Gx400)</b> .....	<b>107</b>
Figure 48: Observation microscopique des cellules de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans le lait UHT entier et écrémé et adhérees sur le verre traité par le même type du lait (Gx400) .....	109
Figure 49: Influence de conditionnement par le lait sur l'adhésion expérimentale de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le verre .....	109
Figure 50: Adhésion de six souches de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivées dans deux types de lait sur le polystyrène non traité et traité .....	111

Figure 51: Effet du temps de traitement sur hydrophobicité qualitative ( $\theta$ eau) de la surface du verre traitée par le lait UHT entier.....	116
Figure 52: effet du temps de traitement sur l'hydrophobicité quantitative du verre traité par le lait UHT entier. ....	117
Figure 53: Effet du temps de traitement sur le caractère donneur-accepteur d'électron du verre traité par le lait entier. ....	117
Figure 54: Effet du temps de traitement de l'hydrophobicité du verre traité par lait UHT écrémé selon l'approche qualitative. ....	118
Figure 55: Effet du temps de traitement sur l'hydrophobicité quantitative du verre traité par le lait UHT écrémé.....	119
Figure 56: Effet du temps de traitement sur le caractère donneur-accepteurs d'électron du verre traite par le lait écrémé.....	119
<b>Figure 57: Effet du temps de traitement du verre par deux types de lait UHT sur l'adhésion de <i>S. aureus</i> cultivée dans le lait UHT (entier et écrémé) Images traitées par MATLAB G*10. ....</b>	<b>121</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques physiques du lait. ....	- 12 -
Tableau 2: Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces en g/L. ....	- 13 -
Tableau 3: Composition du lait de soja comparée au lait (données au litre). ....	- 14 -
Tableau 4: Constituants lipidiques du lait et leurs localisations. ....	- 16 -
Tableau 5: Distribution des principaux acides gras du lait en %. ....	- 17 -
Tableau 6: Les caractéristiques énergétiques des trois liquides utilisés pour mesurer les angles de contact décrites par Van Oss (1996). ....	48
Tableau 7: Caractéristiques énergétiques de l'eau distillée, diiodométhane et formamide. ....	58
Tableau 8: Résultats des tests catalase et DNase de 6 souches purifiées du Lait cru. ....	66
Tableau 9: Mesures de l'angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) des 6 souches de <i>S.aureus</i> cultivé dans le milieu LB ; le lait entier (ET) et ecremee (EC) ....	67
Tableau 10: Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) des différents supports. ....	77
Tableau 11: Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) des différents supports traites par deux types du lait UHT(entier et écrémée) : ....	78
Tableau 12: Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ), d'accepteurs d'électron ( $\gamma^+$ ) et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ )s du verre traiter par lait entier en fonction du temps. ....	116
Tableau 13: L'Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) , d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ )s du verre traiter par lait écrémé en fonction du temps. ....	118

## Introduction générale

La contamination microbienne coûte aux industries alimentaires de nombreux millions de dollars, elle est la principale cause des maladies d'origine alimentaire, et semblent être les agents responsables de plus des deux tiers des toxi-infections alimentaires des foyers enregistrés (**Vázquez-Sánchez et al. 2013**). Dans l'industrie alimentaire les bactéries pourraient être en mesure de fixer et à former des biofilms sur la surface de la transformation des aliments (**Langoni et al., (2008)** ;(**Aung et al., 2011**) et qui sont particulièrement connus par leurs effets négatifs sur la santé. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les contaminations de produits alimentaires, la bio-détérioration des matériaux (en particulier la bio corrosion, ... etc.). (**Klinger et al., 2005**).

Dans le secteur alimentaire, la colonisation des surfaces de travail par des bactéries pathogènes, peut être une source majeure des contaminations croisées et par conséquent des toxi-infections alimentaires. En effet, l'adhésion bactérienne aux supports solides est un phénomène indésirable qui conduit à la formation des biofilms bactériens. Ces derniers peuvent engendrer de sérieux problèmes dans divers secteurs, avec des non-conformités au niveau de la qualité organoleptique, nutritionnel et microbiologique du produit. Ainsi qu'ils ont la capacité de résister aux différents stress environnementaux tels que les traitements de nettoyage et désinfection

Donc pour garantir l'hygiène des surfaces et la prise en compte de l'état des biofilms, il faut une meilleure compréhension de l'implication de ces structures dans les phénomènes de résistance aux traitements de la surface, aussi la connaissance de la base physico-chimique de la bio-contamination des surfaces en production qui pourrait présenter une opportunité de pouvoir et prédire la contamination microbiologique. Plusieurs auteurs (van der Mei and Busscher 1997)(Teixeira et al. 2007)(Silva et al. 2008)(Hamadi et al. 2008)(Hamadi et al. 2009a) ont étudié les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire pour expliquer ce phénomène. D'autres se sont intéressés aux propriétés physico-chimiques de la surface du substrat (Ong et al. 1999)(Teixeira et al. 2007)(Silva et al. 2008)(Hamadi et al. 2014). Dans les industries laitières, la bio-adhésion engendre de graves problèmes tels que l'entrave du flux de chaleur au travers des surfaces d'acier (zones de refroidissement par exemple), l'augmentation de la résistance par frottement du liquide à la surface (diminution de l'entrefer) ainsi que l'augmentation du taux de corrosion des surfaces conduisant à des pertes d'énergie, de production et requiert potentiellement de

nouveaux investissements. En outre, les biofilms constitués de flores d'altération ou de pathogènes à la surface des aliments et dans l'environnement industriel (ateliers, équipements, bâtiments) peut conduire à une contamination croisée. Diverses études indiquent que le mode de vie des biofilms, leur structure et leur composition conduisent à une augmentation de résistance aux produits antimicrobiens (Simões et al. 2005). De nombreuses études ont montré que l'encrassement est initié par le dépôt de constituants laitiers, principalement des protéines et des minéraux, à la surface de la membrane, en particulier lors de la filtration des fluides laitiers (James et al. 2003). Parce qu'une fois qu'une surface de matériau est exposée à un milieu aqueux contenant des nutriments, ses propriétés interfaciales sont souvent modifiées par le fluide environnant grâce à l'adsorption de composés organiques (Chmielewski and Frank 2003)(Fard 2010)(Sheng et al. 2008)(Eileen B. Somers and Amy C. Lee Wong 2004). Comme les propriétés interfaciales sont le résultat des propriétés physico-chimiques des surfaces, il est très important d'étudier la modification de cette propriété par la présence de composants du lait pour mieux comprendre les phénomènes de biocontamination, dans l'industrie laitière, En outre, la plupart des travaux de recherche ont consisté à cultiver les bactéries dans des milieux de culture de laboratoire, mais dans ces travaux, le lait a été utilisé comme milieu de culture pour la croissance de six souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire dans le but d'approcher plus à la réalité et ainsi, proposer des solutions pour éradiquer ou même en éviter l'apparition. C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail de recherche, dont l'objectif fondamental est d'étudier de la bio-contamination des différentes surfaces solides en industrie laitier à travers :

- La Détermination des propriétés physico-chimiques (l'hydrophobicité, le caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et le caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ )) de la surface des bactéries isolées, et celles des supports par la méthode de la mesure de l'angle de contact ;
- L'étude de l'effet de traitement des surfaces du verre, polystyrène, polyéthylène et des aciers inoxydables 304 et 316L par le lait UHT (entier, écrème), par spectroscopie infrarouge ;
- L'étude de l'adhésion bactérienne sur les supports traités et non traités par le lait UHT (entier, écrème) ainsi que la cinétique d'adhésion de *Staphylococcus aureus* et l'observation de comportement adhésif des cellules bactériennes.



*PREMIERE PARTIE :*  
**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE I :**  
*Staphylococcus aureus dans le lait de vache*

## I. Introduction :

Les entérotoxines produites par les espèces du genre *Staphylococcus* sont produites par des staphylocoques à coagulase positive et plus particulièrement *S.aureus*. Les entérotoxines staphylococciques peuvent être impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). En France, il s'agit de la première cause de TIAC dans les produits laitiers (Delmas et al. 2004). Des entérotoxines préformées dans le fromage au cours de la fabrication, provoquent les symptômes d'une gastro-entérite, quand le produit est ingéré par l'homme. A ce jour, 19 entérotoxines staphylococciques (SE) sont connues (SEA-SEE, SEG-SEN, SEQ, SEU). Cependant, la nature et le niveau d'entérotoxines produites sont souche- dépendantes et une souche peut en produire plusieurs *in vitro*. Dans la population des souches de *S. aureus* dans les fromages, la proportion de souches entérotoxigènes trouvées varie de 4 à 80% (Larsen et al. 2000) (Delmas et al. 2004).

## II. *S.aureus* : écologie et virulence

### 1. Caractères morphologiques et écologiques :

#### ✚ Historique :

Les premières descriptions des staphylocoques isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871 mais ce ne sont que quelques années plus tard que ces travaux ont permis de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France ont décrit des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (Fasquelle, 1974 ; Spicer, 2003). La même année, en Ecosse, Alexander Ogston a proposé le nom "*Staphylococcus*" (staphylê : grappe et kokkos : grain) car les bactéries se regroupent en amas irréguliers ressemblant à une grappe de raisin (Spicer, 2003). Ogston a différencié ainsi *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Koch, Pasteur et Ogston ont réussi à reproduire des abcès chez l'animal par inoculation des prélèvements de pus (Fasquelle, 1974).

Enfin, en 1884, en Allemagne, Anton Julius Friedrich Rosenbach a donné la première description du genre *Staphylococcus* en cultivant les bactéries sur milieu solide. Il a différencié ainsi *S.aureus* de *S.albus* par la coloration des pigments produits par les colonies (Avril et al., 2003).

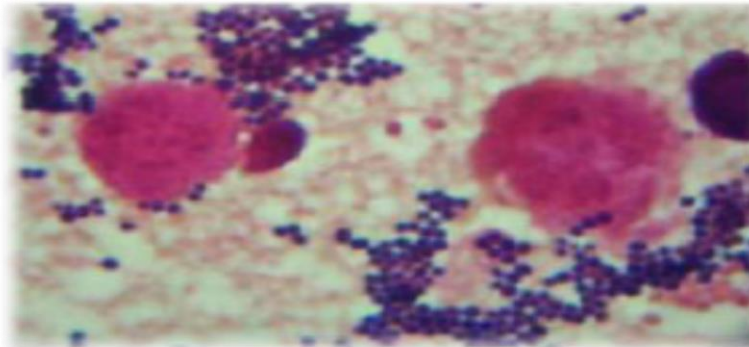
#### ✚ Habitat :

*Staphylococcus aureus* est un commensal, occasionnel ou permanent de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin) qui semble constituer le principal réservoir de ce germe, secondairement localisé dans la nature (Breche et al., 1988). La présence de *S. aureus* dans

l'environnement est essentiellement due à une contamination par l'Homme ou par les animaux (Bergdoll, 1979 ; Breche et *al.*, 1988).

### ✚ Morphologie :

Ce sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas, ayant la forme de grappe de raisin, immobiles, non sporulés mais parfois encapsulés. Ils mesurent 0,8 à 1 µm de diamètre (Couture ,1990 ; Fauchere et Avril, 2002) (Figure 1).



**Figure 1: Staphylocoques en amas après coloration de Gram (Fasquelle ; 1974).**

### ✚ Classification (Decoster)

Les staphylocoques appartiennent à la famille des micrococcaceae composée de quatre genres :

- ✚ Le genre *Micrococcus* qui comprend des microcoques qui sont des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Ils sont sans pouvoir pathogène et sont la plupart du temps des contaminants des prélèvements.
- ✚ Le genre *Stomatococcus* qui comprend des bactéries faisant partie de la flore buccale.
- ✚ Le genre *Planococcus* qui comprend des bactéries du milieu marin.
- ✚ Le genre *Staphylococcus* qui regroupe 36 espèces dont les trois principales sont : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus épidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*.

D'autres espèces existent mais avec une fréquence d'isolation moindre, cependant certaines de ces espèces présentent un pouvoir pathogène non négligeable comme par exemple *Staphylococcus hycius* chez le porc.

## 2. Caractéristiques structurelles :

C'est une coque gram positif qui s'organise en grappe et se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies. Elle possède un métabolisme aérobie facultatif, et est

caractérisée par sa capacité à produire une catalase et à fermenter le glucose ainsi que par l'absence de production d'oxydase. Elle est immobile et ne produit pas de spores.

✚ Structure :

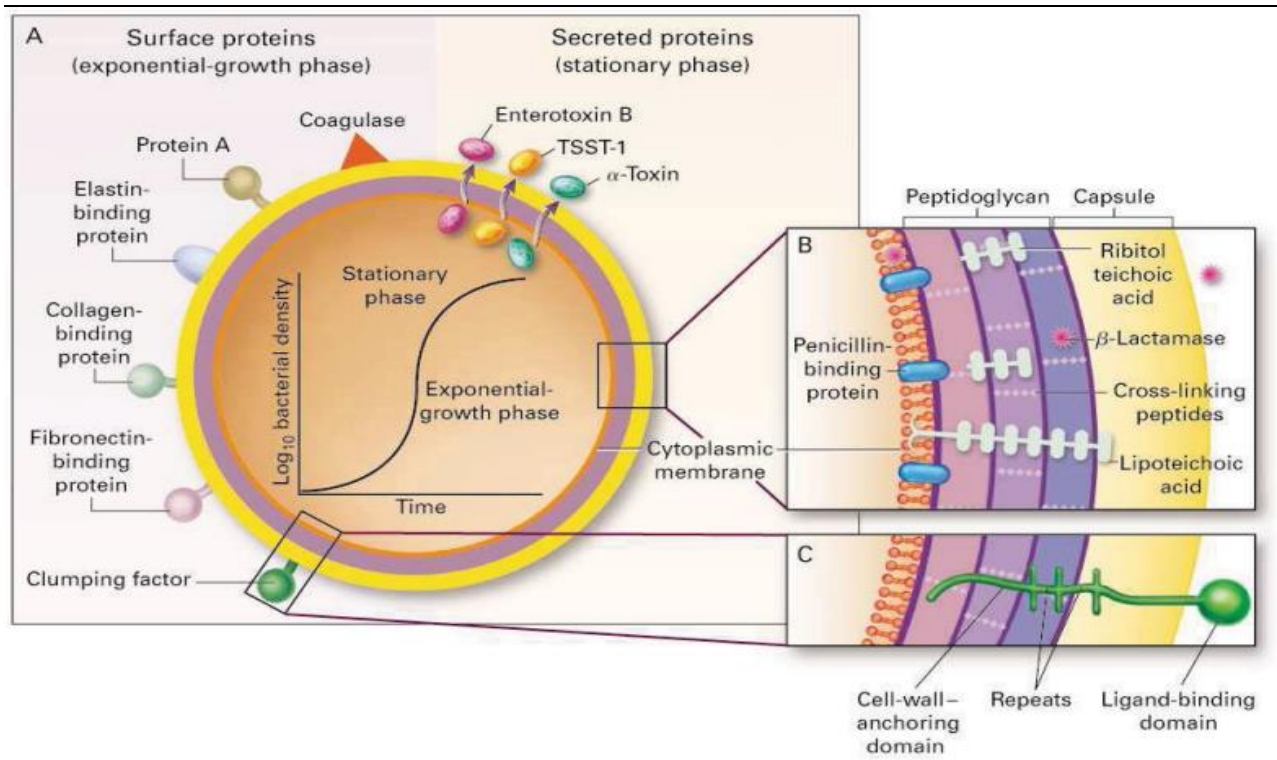


Figure 2: Structure de *S. aureus* (Lowy 1998).

A : Protéines de surface sécrétées en n de la phase de croissance.

B : Organisation de la paroi bactérienne et de la capsule.

C : Détail de l'organisation du « clumping factor ».

La majorité des protéines de surfaces ont une organisation similaire.

✚ La paroi cellulaire :

La paroi des staphylocoques est caractéristique des bactéries à gram positif. C'est une structure rigide et résistante qui entoure la membrane cytoplasmique. Cet exosquelette est responsable de la forme de la bactérie et composé principalement de peptidoglycanes. Ces derniers peuvent avoir une action similaire à celle des endotoxines et ainsi provoquer l'activation des macrophages et du complément, ainsi que l'agrégation plaquettaire. Les acides téichoïques sont quantitativement le deuxième

composant et sont associés au réseau de peptidoglycanes. Ils atteignent la surface externe et constituent des antigènes importants.

#### ✚ La capsule :

La majorité des staphylocoques produisent des micro-capsules polysaccharidiques. Certaines souches de *S. aureus* sont aussi capables de produire des exopolysaccharides responsables de la formation de biofilms, ce qui confère à la bactérie une forme de résistance.

#### ✚ Le génome :

Il est composé d'un chromosome circulaire (environ 2800 pb), de prophages, de plasmides et de transposons. Des facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés à la fois dans le chromosome et dans les éléments extra-chromosomiques.

### 3. Facteurs de virulence et toxi-infection d'origine *S.aureus* :

*Staphylococcus aureus* occupe encore aujourd'hui, de par sa virulence et sa résistance aux antibiotiques usuels, une grande importance en pathologie humaine. Cette bactérie à coloration de Gram positive, appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Les fosses nasales antérieures constituent, avec les zones humides de la peau (aisselles, poignets, périnée), le site réservoir essentiel de *S. aureus*. Dans la population générale, la prévalence du portage nasal permanent est comprise entre 20 et 25 % tandis que la colonisation transitoire par cette bactérie affecte au moins 60 % de la population restante (Peacock et al. 2001). Ubiquistes dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques, le choc toxique staphylococcique (TSS) et les intoxications alimentaires. Les endophtalmies occupent une place à part, car généralement acquises à la suite d'une effraction, mais elles se compliquent très rarement par une bactériémie.

Plusieurs facteurs expliquent la fréquence et la gravité des infections à *S. aureus*. Le caractère ubiquitaire de la bactérie, la multirésistance de certaines souches aux anti-biotiques, notamment en milieu hospitalier, ainsi qu'une diminution des défenses immunitaires des patients hospitalisés peuvent expliquer les caractéristiques de ces infections. Mais la pathogénicité de *S. aureus* est également et surtout à relier à l'expression de facteurs de virulence (figure 3). *S. aureus* a en effet la capacité de sécréter, après invasion, des facteurs d'adhésion, des toxines ou encore des enzymes. Les composés toxiques peuvent être classés en super antigènes, en toxines formant des pores ou « pore forming toxins », protéases et toxines ADP-ribosylantes (Schuster and Bertram 2016). Parmi ces toxines, certaines sont responsables de syndromes

spécifiques.

### 3.1. Les facteurs de virulence

#### ✚ Les toxines formant des pores ou « pore-forming toxines » (PFTs)

Ces toxines cytolytiques ont la capacité de détruire les cellules de la défense de l'hôte (Parker and Feil 2005) en formant des pores au niveau des membranes cellulaires. Les PFTs sont souvent sécrétées sous forme de monomères (Lesieur et al. 1997). Leur caractéristique commune est la sécrétion par la bactérie sous forme de protéines libres hydrosolubles.

#### ✚ Toxines à hélice alpha La delta-hémolysine

Cette toxine de 26 acides aminés est caractéristique des alpha-PFTs (Prévost et al. 2006). L'oligomérisation se réaliserait en octa-mères ou en trimères. Grâce à leur structure amphipathique, chaque monomère crée des interactions pendant la formation du pore avec les phospholipides membranaires, notamment la phosphatidylcholine. La majorité des souches de *S. aureus* (97 %) synthétise cette toxine. Elle est produite en n de phase exponentielle de croissance et le gène codant son expression fait partie du locus *agr* (*accessory gene regulator*). Elle est capable de lyser de nombreuses cellules sanguines, ainsi que des vésicules synthétiques.

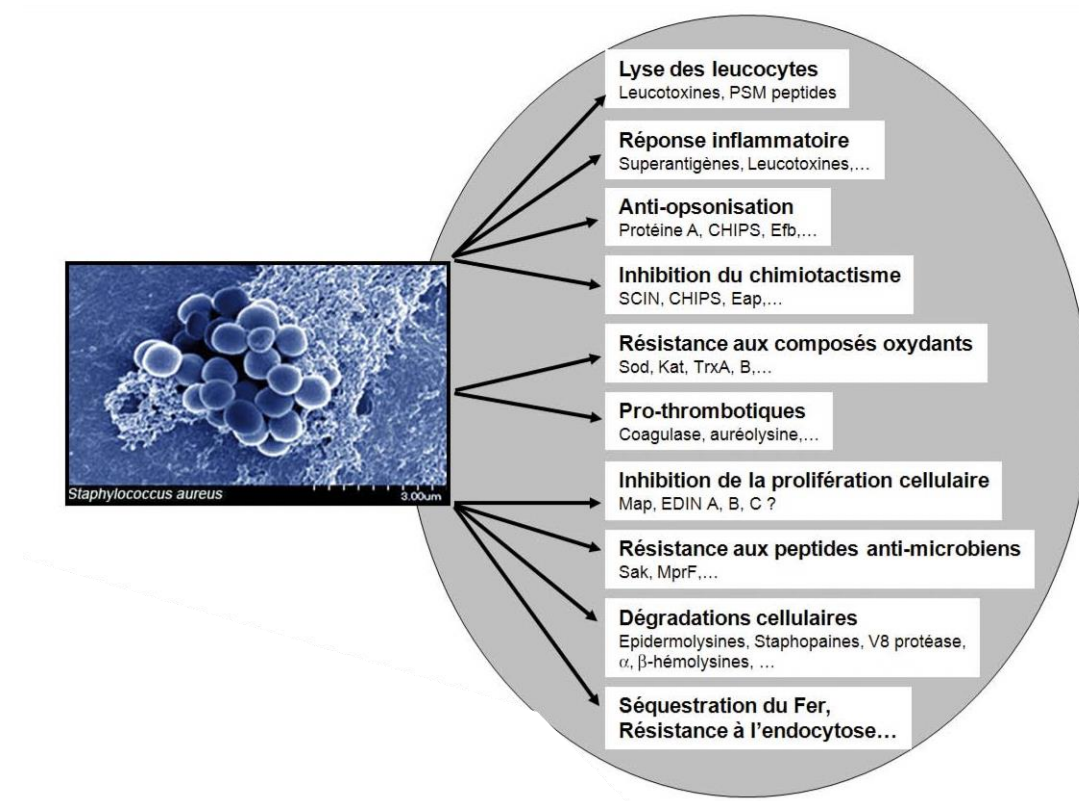


Figure 3: Quelques-unes des activités composant la virulence de *Staphylococcus aureus*.

#### ✚ Les PSM peptides ou «phenol-soluble peptides»

Ils représentent une famille de peptides initialement caractérisés chez *Staphylococcus epidermidis* et composée de deux sous-groupes : les peptides de type I, d'une vingtaine d'acides aminés, sont assez proches de la delta-hémolysine, alors que ceux de type II sont deux fois plus longs (Wang et al. 2007). Chacun de ces peptides est codé par un gène spécifique, et possède une structure amphipathique organisée sous la forme d'hélices alpha. Ces peptides sont produits en grandes quantités par les souches communautaires, et participeraient au succès de l'infection par leur capacité à lyser les polynucléaires neutrophiles.

#### ✚ Les toxines à brins bêta (bêta-PFTs ou leucotoxines)

Elles peuvent être différenciées, tout comme les alpha- PFTs, par l'étude de leur structure. Leurs cibles cellulaires majeures sont les leucocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes).



### ✚ L'alpha-toxine ou alpha-hémolysine

Cette toxine de 31 kDa est sécrétée en fin de phase exponentielle de croissance par 80 à 90 % des souches de *S. aureus* (Prévost et al. 2006)(Bhakdi et al. 1996)(Menestrina et al. 2003)(Montoya and Gouaux 2003)(WOODIN 1960)(Joubert et al. 2006). L'activité hémolytique de l'alpha-toxine a été mise en évidence chez de nombreux mammifères et notamment chez le lapin. En effet, les globules rouges de lapin sont beaucoup plus sensibles à l'action lytique de cette toxine que les globules rouges humains. De nombreuses autres cellules peuvent être lysées, notamment les lymphocytes T, les plaquettes, les kératinocytes. Les monomères de l'alpha-toxine s'oligomérisent à la surface membranaire des cellules cibles et forment alors un pore heptamérique. Celui-ci induit des perturbations au niveau de la perméabilité membranaire, notamment des échanges  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Les conséquences cellulaires sont une libération massive de molécules pro-inflammatoires. Ainsi, l'interleukine IL-1 est sécrétée par les monocytes mis en contact avec cette toxine. Après activation calcique, l'alpha-hémolysine peut également induire une augmentation du métabolisme de l'acide arachidonique, elle-même à l'origine de la synthèse de prostaglandines, de leucotriènes et d'oxyde d'azote par les cellules endothéliales. Cette toxine peut aussi induire la sécrétion de thromboxane A2 et d'IL-8, et permettre l'activation de la voie de transduction du signal NF- $\kappa$ B. Un mécanisme d'apoptose lymphocytaire a également été démontré.

### 3.2. Intoxications alimentaires

#### ✚ Les Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC)

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'incidence de deux cas, ou plus, d'une maladie similaire, la plus souvent une gastro-entérite, provoquée par l'ingestion d'un même produit (de Duyser et al., 2001). Les vecteurs dans les produits alimentaires les plus communs pour des intoxications par *S. aureus* comprennent la viande, la volaille, et les produits laitiers, tels que la crème, le fromage et la crème anglaise (Strachan et al., 1997 ; Anonyme, 2001).

#### ✚ Toxi-infection collective d'origine *S. aureus*

Selon les études réalisées, les intoxications alimentaires à *S. aureus* représenteraient de 15 à 30 % des toxi-infections alimentaires collectives. Elles sont provoquées par l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques qui sont toutes émétisantes, à l'exception notable de la TSST-1. En effet, en présence d'entérotoxine B, les mastocytes synthétiseraient des dérivés de l'acide arachidonique, qui agissent directement sur les récepteurs neuronaux du système gastro-intestinal, conduisant ainsi à une stimulation

des centres nerveux responsables du vomissement et de la diarrhée. Ces toxines produites par les souches de *S. aureus* sont thermostables, résistent à la cuisson et aux enzymes du tube digestif. Elles contaminent les aliments, le plus souvent les produits laitiers et la viande. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures après l'ingestion), des crampes abdominales douloureuses, des vomissements, des diarrhées et l'absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement, mais la survenue d'un choc toxique staphylococcique est possible en cas d'intoxication massive (Bukowski et al. 2010).

#### **4. Lait : Propriétés, composition et microbiologie**

##### **4.1. Introduction :**

Le lait est un aliment de base, il est apprécié comme un aliment de base dans de nombreux régimes alimentaires. En effet, il est indispensable pour le nouveau-né et reconnu très bienfaisant pour l'adulte. Dans notre culture, il fournit un milieu facilement accessible, riche en éléments nutritifs (minéraux, vitamines et protéines) qui sont facilement digérables. Ainsi, le lait est important à l'ensemble des fonctions du corps (Steijns 2008).

Les produits laitiers, les viandes, les céréales, les fruits et les légumes sont des aliments riches en éléments nutritifs, ils fournissent de nombreux nutriments à teneur relativement variable en énergie et indispensables à la santé humaine (Drewnowski 2005). La consommation des produits laitiers est associée, en plus des effets positifs sur la santé, à leurs valeurs nutritionnelles (Mitsui et al. 2007). Le lait et ses dérivées sont également considérés comme des apporteurs d'ingrédients alimentaires fonctionnels (phytostérols, acides gras et bactéries probiotiques) et de source riche pour l'innovation et la production d'une grande variété d'ingrédients novateurs de promotion de la santé qui sont présents sur le marché (comme des suppléments diététiques) (Steijns 2001). Les protéines laitières sont intégrées d'une manière préférentielle dans la composition d'une nutrition spéciale comme la construction des tissus et la masse musculaire chez les nourrissons, les malades, les sportifs, et les personnes âgées. Les recommandations d'équilibre alimentaire éprouvent la contribution des produits laitiers à une alimentation saine. Pourtant, il est souvent recommandé d'utiliser électivement la gamme des produits pauvres en matière grasse (produits écrémés et demi écrémés), grâce à la quantité d'acides gras saturés contenus dans le lait et leur impact direct sur le développement des maladies cardiovasculaires. Au Maroc, le statut de la production laitière est très particulier dans les plans de développement du secteur agricole. Elle contribue à la création de revenus et d'opportunités

de travail, comme elle contribue aussi à l'approvisionnement en éléments nutritifs des populations et dont les habitudes alimentaires évoluent vers d'avantage de produits de qualité (M.T. 2008). Ainsi la qualité du lait et son contrôle constituent le souci des industriels. Pour assurer la qualité et la salubrité du lait et produits laitiers, il est essentiel de contrôler leurs qualités le long de la chaîne de production.

### **4.2. Définition du lait :**

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909, par le Congrès International de la répression des fraudes comme suit : « le lait est le produit intégral de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ». Le colostrum c'est le lait produit par la vache après la mise bas du nouveau-né. Il est de couleur jaunâtre, très riche en protéines et anticorps indispensables à l'immunisation du nouveau-né et pauvre en sucres. Le décret du 25 mars 1924 précise : « la dénomination « lait », sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination « lait » suivie de l'indication de l'espèce mammifère dont il provient ». Par exemple : lait de chèvre, lait de brebis ou encore lait de femme.

### **4.3. Propriétés organoleptiques :**

Le lait est un liquide opaque, blanc, mat et plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en  $\beta$  carotènes. Il a une odeur plus marquée, mais caractéristique. Son goût varie selon les espèces animales, il est agréable et douceâtre.

### **4.4. Propriétés physiques du lait :**

Le lait est un système complexe. C'est une suspension colloïdale de particules dans une phase aqueuse dispersante. Les particules sont d'une part, des globules de matière grasse, et d'autre part des micelles protéiques formées par l'interaction de la caséine et d'autres protéines entre elles, et avec les sels minéraux présents dans la phase aqueuse. Le tableau 1 présente les caractéristiques physiques du lait (L'agriculture 1995).

Tableau 1: Caractéristiques physiques du lait.

<b>Densité</b>	<b>1.028 à 1.036</b>
<b>pH (à 20°)</b>	6.6 à 6.7
<b>Acidité titrable (°D)</b>	De 15 à 18
<b>Température de congélation (°C)</b>	De -0.51 à -0.55

#### **Densité :**

La densité du lait varie selon l'espèce (Alais 1985). Elle est corrélée à son teneur en matière sèche. La densité est faible pour le lait qui a moins de matière sèche, Elle est déterminée par la teneur en extrait sec dégraissé et en matière grasse. En comparaison avec d'autres espèces, la densité du lait de vache qui est de 1,030 à 1,035, est proche de celle du lait de chèvre (1.027 à 1.035), mais elle est inférieure à celle du lait de brebis (1,0377), et de dromadaire (1,0384).

#### **pH :**

Le pH donne une idée sur l'état de fraîcheur du lait. Il renseigne sur l'activité des bactéries lactiques qui transforment une partie du lactose en acide lactique. Ceci entraîne une diminution du pH suite à l'augmentation de la concentration des ions hydronium  $[H_3O^+]$  dans le lait. Le pH des laits des différentes espèces varie entre 6,5 et 6,8. Pour le lait des vache, Alais a rapporté des valeurs allant de 6,6 à 6,7 (Tableau 1). En effet, le pH est influencé par plusieurs facteurs. A titre d'exemple, le pH varie en fonction du stade de lactation : il diminue vers la fin du cycle suite à l'augmentation de la teneur en caséine et en phosphate.

#### **Acidité titrable (°D) :**

La détermination de l'acidité du lait, est basée sur le dosage acido-basique. Elle consiste à neutraliser des composants acides du lait par la soude, en présence de phénolphtaléine (L'agriculture 1995). Elle est exprimée en degrés Dornic (1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait). L'acidité étant relativement stable dans le lait, alors que son augmentation indique que le lait est suspecté. En effet, l'acidité Dornic mesure l'évolution de l'acide lactique du lait qui est sous l'action des microorganismes.

L'acidité Dornic d'un lait frais est comprise entre 15 et 18 °D (tableau1) (MAUBOIS et al. 1971). Une acidité plus élevée, indique que le lait a été conservé dans de mauvaises conditions.

### **Point de congélation :**

La mesure du point de congélation (ou bien la température de congélation) du lait est une approche d'évaluation d'authentification du lait suite à un ajout d'eau. Il est variable en fonction des conditions zootechniques, mais dans une plage limitée. Le point de congélation du lait selon Veisseyre (1979) est de  $-0,55\text{ °C}$  à  $-0,51\text{ °C}$  (Ti 1988) (tableau 1). Harding (1995) a signalé que le point de congélation d'un lait pur est de  $-0,540\text{ °C}$ , alors qu'il peut augmenter à  $-0,486\text{ °C}$ , après ajout de 10 % d'eau à ce lait (Afif A. 2008).

## 4.5. Composition du lait :

### **Composition du lait par rapport aux autres produits laitiers :**

Le lait est le produit le plus consommé et le plus étudié en nutrition humaine. En effet, La production mondiale du lait est assurée, en grande partie par les vaches (environ 90%) (L'agriculture 1995). Les laits provenant des différentes mammifères, ont des caractéristiques communes et sont constitués des mêmes types de composants : eau, protéines, lactose, lipides et matières minérales. Cependant, les pourcentages de ces composants varient considérablement d'une espèce à l'autre. Le tableau 2 représente la composition moyenne du lait des différentes espèces (Leymarios F. 2010).

Tableau 2: Composition chimique moyenne du lait de différentes espèces en g/L.

Espèce	Matière sèche	Protéines	Lipides	Lactose	Calcium (Ca)	Phosphore (P)
Vache	132	35	38	50	1,25	0,95
Chèvre	115	34	35	45	1,35	1
Brebis	185	60	70	45	1,9	1,5
Jument	105	25	16	61	1	0,6

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Femme	120	13	39	70	0,3	0,15
			-	-	-	-

La composition des laits des espèces citées, varie fortement d'une espèce à l'autre. Cette variation peut être affectée par la nutrition, le stade de lactation, l'âge et la période de l'année. Le lactose, la matière grasse et les protéines sont très répandus chez toutes les espèces. Le lait de femme, est pauvre en calcium et en phosphore, alors que le lait de vache est riche en ces éléments. Le lait de brebis est riche en lipides et en protéines, ce qui justifie son exploitation dans la production des fromages. En le comparant à celui de brebis, le lait de vache est composé de moins de lipides.

La composition du lait de Soja (ou bien jus de Soja) est très différente par rapport à celle du lait de vache. Le tableau 3 représente la composition du lait de Soja, comparée à celle du lait (Chouraqui P. et Darmaun D. 2005).

Tableau 3: Composition du lait de soja comparée au lait (données au litre).

Composants	Lait de soja	Lait de vache
Eau (mL)	920	900
Matières protéiques (g)	37	35
Lipides (g)	21	38
Glucides (g)	14	50
Dont Lactose (g)	0	50
Calcium (g)	0	1,25

D'après ce tableau, le lactose est absent dans le lait de Soja. Par conséquent, ce dernier peut être consommé par les gens intolérants à ce composant. La teneur en matière grasse est relativement faible dans le lait de Soja, ce qui lui donne un intérêt supérieur dans l'alimentation équilibrée. Il est caractérisé par sa richesse en protéines et par l'absence du calcium (Grappin R. et Lefier D. 2000).

### **Composition biochimique du lait :**

Le lait est un milieu très complexe constitué de la matière azotée, des lipides, des sels, des glucides et d'éléments à l'état de traces (majoritairement les vitamines et les enzymes). La variation de ces composants est en fonction de l'alimentation, de la race, de l'individu et du stade de lactation (Amiot J. et al., 2002). Le lait est une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse. Il est constitué de nombreux éléments qui sont soit à l'état dissous, soit à l'état colloïdal. Le lait est constitué essentiellement de l'eau (87%) (Grappin R. et Lefier D. 2000).

### **Les lipides et matière grasse :**

La matière grasse est la fraction désignée par le terme de taux butyreux (TB). Elle est implicitement l'ensemble des substances lipidiques qui donnent des acides gras, par hydrolyse des esters. Alors que la matière grasse comprend des produits non lipidiques (entre 0,5 à 1 %) qui sont entraînés lors de l'élaboration du lait, grâce à leurs liposolubilités. Donc le terme « matières grasses » n'est pas synonyme du terme « lipides ». La matière grasse obtenue par des procédés mécaniques (écrémage par centrifugation) constitue le contenu des globules gras. De ce fait, elle contient des composés liposolubles qui ne sont pas de vrais lipides (substance lipoïde). Ils sont soit des hydrocarbures (comme le carotène), soit des alcools (le cholestérol et la vitamine E) et soit des vitamines liposolubles (A, D, K) (L'agriculture 1995). La matière grasse est constituée de plus de 98% des lipides (partie saponifiable). Cette partie est constituée de deux entités : les phospholipides (lipides complexes) et les glycérides (lipides simples).

La méthode acido-butyrométrique de Gerber est la méthode classique pour déterminer la teneur en matière grasse (ISO 488:2008 2008). Cette teneur est considérablement variée en fonction de l'alimentation, du génotype de la femelle laitière et du stade de lactation. Le tableau 4 détaille à la fois la teneur (par 100 g de matière grasse) et la localisation principale des lipides du lait (L'agriculture 1995).

Tableau 4: Constituants lipidiques du lait et leurs localisations.

<b>Constituants lipidiques</b>	<b>Proportions (g/100 g de MG)</b>	<b>Localisation</b>
<b>Triglycérides</b>	96-98	Globule gras
<b>Di glycérides</b>	0,3-1,6	Globule gras
<b>Mono glycérides</b>	0-0,1	Globule gras
<b>Phospholipides</b>	0,2-1,0	Membrane du globule gras et lactosérum
<b>Cérébrosides</b>	0-0,08	Membrane du globule gras
<b>Stéroïdes</b>	0,2-0,4	Globule gras
<b>Acides gras libres</b>	0,1-0,4	Membrane du globule gras et lactosérum
<b>Esters du cholestérol</b>	Traces	Membrane du globule gras

La matière grasse est constituée de 96 à 98% des triglycérides. Les lipides sont dispersés dans le lait



sous forme de globules gras. Ces derniers sont limités par une membrane constituée de polypeptides, de triglycérides et de lipides complexes. La stabilité des globules gras est assurée par cette membrane lipoprotéique qui est fragile et sa rupture peut avoir lieu, soit par agitation, soit par réfrigérations répétées et acidification. Comme elle peut subir une lipolyse sous l'action des lipases. Par conséquent, la matière grasse est libérée suite à une déstabilisation de l'émulsion.

### **Les glycérides :**

Les glycérides constituent la majorité des matières grasses du lait et sont des esters d'acides de glycérol qui est un triol à triple fonction, capable d'estérifier trois acides gras. Il est préférable d'avoir une idée sur la structure et les caractéristiques relatives à leur comportement au cours des traitements et aussi pour l'évaluation des propriétés nutritionnelles du lait et des produits laitiers. Les triglycérides peuvent être simples (acides gras sont identiques) ou mixtes (un acide gras, deux ou les trois sont différents). La quantité et la nature de chaque acide gras dans les glycérides sont les facteurs qui affectent leurs propriétés.

### **Les acides gras :**

Les acides gras sont généralement des chaînes d'hydrocarbures qui se terminent par une fonction carboxylique. La composition du lait en acides gras est donnée par le tableau 5 (Lemens P.1985).

Tableau 5: Distribution des principaux acides gras du lait en %.

Acide gras	Nomenclature	Moyenne
Butyrique	C <sub>4:0</sub>	3,6
Caproïque	C <sub>6:0</sub>	2,3
Caprylique	C <sub>8:0</sub>	1,3
Caprique	C <sub>10:0</sub>	2,7
Laurique	C <sub>12:0</sub>	3,3

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Myristique	C <sub>14:0</sub>	10,7
Pentadecanoïque	C <sub>15:0</sub>	1,2
Palmitique	C <sub>16:0</sub>	27,6
Stéarique	C <sub>18:0</sub>	10,1
Arachidique	C <sub>20:0</sub>	0,2
Mono insaturés		
Myristoléique	C <sub>14:1</sub>	1,4
Palmitoléique	C <sub>16:1</sub>	2,6
Oléique	C <sub>18:1</sub>	26
Polyinsaturés		
Non conjugués		
Linoléique	C <sub>18:2</sub>	2,5
Linoléique	C <sub>18:3</sub>	1,4
Arachidonique	C <sub>20:4</sub>	0,3
Conjugués		
Diène	C <sub>18:2</sub>	0,8
Polyènes	C <sub>18, 20, 22:3 et 4</sub>	traces

**Les phospholipides :**

Les phospholipides sont des lipides complexes qui ont une double fonction hydrophile et lipophile qui leur confère le caractère des agents émulsionnants efficaces, très sollicités dans l'industrie alimentaire. Ces composés contiennent, en plus d'un alcool et des acides gras, un acide phosphorique et une base azotée. Dans le lait, on distingue les lécithines, les céphalines et les sphingomyélines (Lemens P.1985).

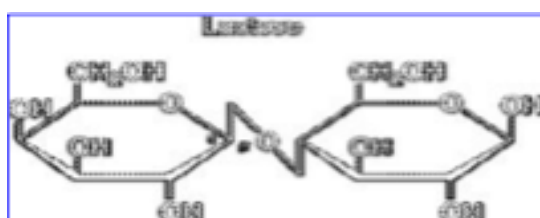
### Variation de la teneur en matière grasse (variation du TB) :

Le taux butyreux (TB) varie considérablement (Afif A. 2008) :

- ✚ En fonction de la race et de la génétique de la vache.
- ✚ En fonction du stade de lactation. Au cours d'une lactation, le TB varie en sens inverse de la quantité journalière de lait produit, et c'est au pic de lactation que le TB est le plus faible. Au cours de la traite, c'est pourquoi la définition légale du lait précise que le lait est le produit de la traite intégrale, en fonction de la photopériode, le TB est plus faible en été lors des jours les plus longs et vice versa. Et enfin en fonction de l'alimentation ; tous les facteurs alimentaires qui peuvent conduire à une acidose ruminale (excès d'amidon, déficit en cellulose brute, défaut de fibrosité, défaut de transition alimentaire) peuvent provoquer une chute du taux butyreux. Les aliments riches en sucres simples (betteraves, mélasse, lactosérum, et dans une moindre mesure l'ensilage de maïs) augmentent la production ruminale de butyrate, ce qui est très favorable à de bons TB, sauf s'ils sont distribués en excès (ce qui conduit une acidose).

### Les glucides :

Le lactose est un sucre caractéristique du lait. Il constitue essentiellement les glucides dans le lait, dont il est le plus abondant dans la matière sèche. Le lactose est un di-oside formé de galactose et du glucose (figure 4). On peut le trouver sous l'une ou l'autre des formes isomériques  $\alpha$  ou  $\beta$ . Ces deux isomères possèdent des propriétés différentes en termes de rotation de la lumière polarisée, de cristallisation et de solubilité. Le glucose et le galactose peuvent être présents dans le lait en quantité négligeable (0,1 g/L). Ces deux oligosaccharides proviennent de la dégradation du lactose.



**Figure 4: Structure moléculaire du lactose.**

La teneur en lactose présente de faibles variations à la différence de la teneur en matière grasse. La glande mammaire est responsable de sa synthèse à partir du glucose prélevé du sang. L'apport énergétique du lactose est faible (30%), alors que les recommandations théoriques préconisent un apport de 50 à 60% de calories glucidiques. Le lactose est un nutriment particulier, qui intervient également dans la fermentescibilité. Son pouvoir sucré est faible par rapport à celle du saccharose. Il est arbitrairement de 100% pour le saccharose, alors que celle du lactose atteint environ de 27 à 39%.

Le tube digestif du jeune animal, utilise seulement le lactose, car il ne possède que la lactase et pas de saccharase, ni maltase et pas d'amylase. Le lactose peut être difficilement digéré par certaines personnes suite à un problème d'activité de la lactase. Récemment, Certains industriels ont lancé un lait allégé en lactose dans le marché. Ce lait contient 90% de lactose en moins qu'un lait normal, ce qui permet aux consommateurs de continuer à boire du lait sans avoir des complexités liées à cette intolérance.

### **Matières azotées totales (MAT) :**

Le taux protéique (TP) est un indicateur de la qualité du lait. Sa teneur et celle du taux butyreux déterminent la valeur marchande du lait. Ce dernier sera payé en fonction de sa teneur en TP. Le prix du lait sera important, si le TP est élevé. De même un TP élevé, améliore le rendement de transformation fromagère (Barbano and Sherbon 1984). L'azote total est constitué des protéines (taux protéique) et la matière azotée non protéique. L'azote protéique et non protéique sont incomparables, ni quantitativement ni qualitativement, ainsi que ces deux groupes d'azotes sont déterminés par la méthode de Kjeldahl (ISO 8968-3:2004)(De Lourdes Mendes Finete et al. 2013). La composition moyenne et la distribution de la matière azotée du lait cru est donnée par le tableau 3.

### **4.6. Microbiologie du lait :**

L'étude de la microbiologie permet de caractériser et ainsi de mieux contrôler les quatre principaux groupes de microorganismes ou microbes présents dans l'environnement alimentaire et laitier : virus, bactéries, levures et moisissures. Il y a des microorganismes partout dans l'environnement, dans l'air, dans l'eau, dans le sol, sur les animaux et les plantes et chez l'humain (Leclerc et al. 1969).

#### **4.6.1. Classification des principaux microorganismes du lait selon leur importance :**

On répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes :

- ☒ La flore indigène ou originelle et la flore contaminant.
- ☒ La flore contaminant est subdivisée en deux sous-classes : la flore d'altération et la flore pathogène (Plommet et al. 1987).

### 4.6.2. Flore indigène ou originelle :

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptiques, il devrait contenir moins de 5000 UFC/ml. La flore indigène des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs. Le lait qui sort du pis de la vache est pratiquement stérile. Les genres dominants de la flore indigène sont principalement des microorganismes mésophiles (Plommet et al. 1987).

### 4.6.3. Flore contaminant :

La flore contaminant est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits laitiers. On considère comme flore contaminant d'altération et pathogène du lait l'ensemble des microorganismes qui s'ajoutent au lait extrait du pis de la vache. Il semble que la contamination à l'étable soit la plus importante.

### 4.6.4. Flore d'altération :

Incluse dans la flore contaminant, la flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira la vie de tablette du produit laitier. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un n'exclut pas l'autre. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, les coliformes, soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telles que *Bacillus sp* et *Clostridium sp* et certaines levures et moisissures.

### 4.6.5. Flore pathogène :

Comme la flore d'altération, la flore pathogène est incluse dans la flore contaminante du lait. La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'Homme. Les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella sp*, *Bacterium tuberculosis*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria*

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

*monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* et certaines moisissures qui sont pour la plupart toxigènes, c'est-à-dire qu'elles produisent une toxine dans le produit alimentaire. C'est pour cette raison qu'il faut jeter tout aliment moisi, car la toxine diffusée dans l'aliment sera source de danger pour la santé. Ces derniers sont des micro-organismes ayant absolument besoin d'oxygène pour se développer. C'est pourquoi on les retrouve principalement à la surface des produits laitiers ou dans les canaux des fromages bleus. Même si les levures ne sont pas pathogènes, la dégradation d'aliment causé par ces microorganismes peut être un indice de mauvaises pratiques de fabrication mal contrôlées.

*Chapitre II :*  
**Adhésion bactérienne et propriétés de surfaces :  
mécanismes et interactions physico-chimiques  
surface-bactérie**

## I. Introduction :

Les microorganismes sont bien connus comme des cellules planctoniques, libres dans une suspension ainsi ils sont décrits sur la base de leurs caractéristiques de croissance. Ce monde planctonique est rarement rencontré ou ne constitue qu'un état transitoire, la vie microbienne se déroule majoritairement sur les surfaces. D'une manière générale, 99% des microorganismes présents dans les environnements naturels sont fixés à des supports solides (Costerton , 1987). La prédominance de cet état peut être expliquée par la modification physiologique induite par cet état. Cette modification permet d'assurer la survie et la multiplication des microorganismes dans des environnements généralement hostiles ou stressants. Toutes les interfaces solides-liquides sont potentiellement propices à l'adhésion, à la colonisation microbienne et à la formation de biofilm bactérien.

L'adhésion des microorganismes aux surfaces solides est un problème très rencontré dans le domaine pharmaceutique, les hôpitaux et plus particulièrement dans les industries agroalimentaires. C'est un phénomène à l'origine physico- chimique. Ce processus est le résultat des interactions physico-chimiques (Van der Waals, électrostatiques, et acido-basiques) entre la surface de substrat et la surface cellulaire. Trois approches ont été proposées pour expliquer l'adhésion microbienne aux surfaces.

## II. Mécanismes et interactions physico-chimiques : surface-bactérie :

L'adhésion est la capacité des microorganismes à se fixer sur des surfaces de natures variées : corps solide, cellule animale ou végétale. Ce phénomène est dû à deux types d'interactions :

- ✚ Les interactions spécifiques qui peuvent exister entre deux microorganismes ou entre un microorganisme et une surface biologique. Ces interactions impliquent l'intervention des structures polysaccharidiques des adhésines, des pilis ou des protéines de surface. Ces interactions spécifiques ne sont possibles que si la distance entre les deux corps est inférieure à 1,5 nm (Busscher and Weerkamp 1987).
- ✚ Les interactions non spécifiques, ce sont des interactions physico-chimiques qui interviennent entre les cellules microbiennes et le substrat et qui dépendent des propriétés physico-chimiques présentées par chaque corps : charge électrostatique, hydrophobicité et caractère donneur / accepteur d'électrons (Busscher et al. 1984). Les interactions physico-chimiques comprennent : les interactions électrostatiques, les interactions de Van der Waals, et les interactions acido-basiques (Van Oss 1997).

Dans la littérature, certains chercheurs ont tenté de décrire le processus d'adhésion de manière rationnelle en utilisant des principes de la physique et de la chimie. Le processus d'adhésion a été décrit principalement



via la théorie des systèmes colloïdaux. Bien que dans certains cas, les bactéries se comportent comme de petites particules, elles demeurent des organismes vivants, dont la forme et les propriétés de surfaces sont a priori complexes. Les vraies particules colloïdales se déplacent grâce à l'application de forces externes. Quand une surface est mise en contact direct avec une solution, les molécules et les atomes de cette surface interagissent avec les composés de la solution et le type des forces, ou d'interactions, dépend de la composition chimique des deux milieux.

### III. Etapes de la formation des biofilms bactériens sur des surfaces solides

La formation de biofilm est un processus relativement lent et peut atteindre un millimètre d'épaisseur en quelques jours en fonction des conditions de culture (Melo et al., 1992). Les micro-organismes dans un biofilm ne sont pas uniformément distribués. Ils poussent sous forme de micro colonies emprisonnées dans une matrice intercalée de canaux très perméable à l'eau (Costerton et al., 1994a). La composition d'un biofilm peut être hétérogène, en raison de la colonisation par différents micro-organismes possédant différents besoins nutritionnels. Les biofilms n'existent pas nécessairement sous forme de couche uniforme sur l'ensemble de la surface du substrat. L'augmentation de la taille d'un biofilm est favorisée par le dépôt ou par la fixation d'autres solutés organiques et inorganiques et de particules présentes dans la phase liquide environnante (Melo et al., 1992).

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (Characklis et Marshall 1990 ; Lappin-Scott et Costerton 1995). L'observation directe des biofilms par microscopie, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont conduit à un modèle de développement en cinq étapes (*Figure 5*):

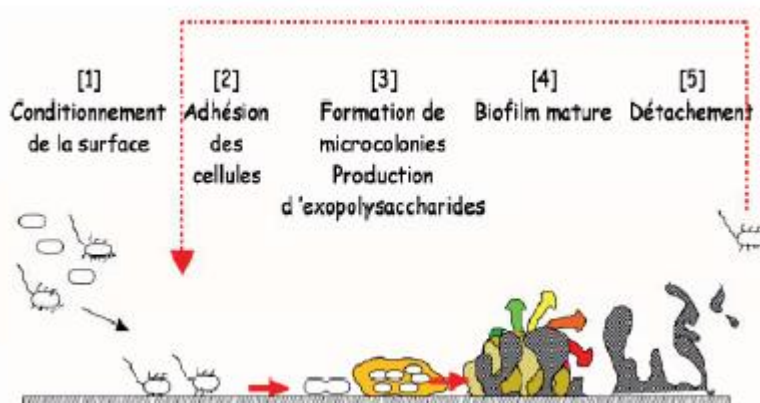


Figure 5 : Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien.

## 1. Transport des microorganismes aux surfaces :

Avant d'adhérer à une surface, le transport des microorganismes à cette surface peut être correctement décrit en termes de diffusion pour les particules de petites tailles (0.01 à 0.1  $\mu\text{m}$ ) (Dickinson & Stainsby, 1982). Pour des particules de grandes tailles (0.5 à 10  $\mu\text{m}$ ), comme pour la plupart des microorganismes, le transport dépend des conditions hydrodynamiques. Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en conditions statiques ou en écoulement laminaire), les particules peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (Characklis, 1983 ; Characklis et al., 1990) :

- b) **Sédimentation** : ce mécanisme est dû aux forces de gravité et il est d'autant plus significatif en cas d'agrégation ou floculation des particules.
- c) **Mouvement brownien** : chaque molécule ou chaque particule immergée dans un milieu liquide présente une énergie brownienne de  $3/2 KT$  (Van Oss et al. 1986), où K est la constante de Boltzmann et T la température en kelvin. Ce mouvement brownien peut provoquer la désorption spontanée des particules adsorbées à une surface, si les forces d'adhésion sont par ailleurs suffisamment faibles. Ces forces sont négligeables dans le cas de particules de dimension supérieure à 1  $\mu\text{m}$ .
- d) **Chimiotaxie** : ce mécanisme apparaît lorsque les microorganismes mobiles flagellés sont capables de se déplacer vers des substances nutritives telles que les acides aminés ou les sources du carbone (sucres) grâce aux signaux détectés par l'intermédiaire du récepteur spécifique.

Par ailleurs, lorsque les forces de cisaillement sont importantes (écoulement turbulent), le transport des microorganismes vers la surface est régi par des forces impliquées dans la dynamique des fluides. Dans ce cas, on distingue deux types de phénomènes :

- ✚ Les phénomènes qui se produisent dans la masse liquide, dans ce cas les particules sont dispersées par mouvement de convection qui maintient une concentration uniforme.
- ✚ Les phénomènes qui apparaissent dans la couche laminaire qui draine la surface (Characklis et al., 1990), dans ce cas les particules peuvent être dirigées vers la surface solide par mouvement descendant turbulent, forces de poussée, sédimentation, mouvement brownien ou chimiotaxie. Leur transport est freiné par les forces de frottement et de drainage (Characklis, 1983 ; Characklis et al., 1990).

## 2. Conditionnement de la surface par le milieu

La nature du milieu, du matériau, ainsi que les caractéristiques de surface de ce dernier, sont des paramètres essentiels intervenant lors de cette première étape. En effet, la surface est le siège d'une absorption irréversible de macromolécules telles que des acides humiques, des polysaccharides ou des

protéines, conduisant à la formation d'un film conditionnant ("conditioning film") (Baier, 1980 ; Little et Jacobus, 1984). Ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau et par conséquent prévenir l'approche des bactéries ou, au contraire, créer un micro-environnement favorable à l'adhésion stable des bactéries (Ishida et Griffiths, 1990).

### **3. Adhésion des bactéries**

L'adhésion microbienne implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. Cette approche nécessite différents appendices bactériens, tels que les flagelles et les cils (O'Toole et Kolter, 1998 ; Gavin et al 2003) qui permettent également à la bactérie de se déplacer sur la surface. D'autres appendices, les pilis sont pour leur part impliqués dans l'attachement initial à la surface (Fletcher et al., 1993 ; McBride, 2001).

Dans un premier temps, l'adhésion est le résultat d'interactions physico-chimiques entre microorganismes et support récepteur (Busscher et Weerkamp, 1987 ; van Loosdrecht et al., 1990 ; An et Friedman, 1997). À ce stade, la bactérie peut désorber de la surface et retrouver son état planctonique, l'adhésion est donc réversible. Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes de l'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm (Kuchma et al., 2005 ; Spiers et al., 2003) et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature.

### **4. Croissance et maturation du biofilm bactérien**

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux.

### **5. Facteurs cellulaires influençant le phénomène d'adhésion des microorganismes :**

L'adhésion microbienne aux surfaces est un processus régi par les différentes caractéristiques du milieu environnant, de substrat, et de la surface cellulaire. Une compréhension du phénomène d'adhésion nécessite une étude profonde sur l'effet de toutes ces caractéristiques.

#### **5.1. Caractéristiques des cellules microbiennes :**

La surface du substrat peut avoir plusieurs caractéristiques qui jouent un rôle très important dans le processus d'adhésion. Characklis et al., (1990) ont montré qu'une augmentation de la colonisation

microbienne apparaît avec l'augmentation de la rugosité de la surface. (Vanhaecke et al. 1990) ont rapporté que l'adhésion d'une bactérie hydrophile, *Pseudomonas aeruginosa*, augmente avec la rugosité moyenne de l'acier inoxydable. Les propriétés physico-chimiques de la surface de substrat peuvent aussi exercer une grande influence sur la vitesse et la quantité d'adhésion. D'après Ivarsson et al. (1981), l'adhésion bactérienne ou l'adsorption macromoléculaire est plus importante lorsque les répulsions électrostatiques entre le microorganisme et le solide sont faibles.

Plusieurs chercheurs ont trouvé que les microorganismes adhèrent plus rapidement à une surface non polaire et hydrophobe qu'à une surface hydrophile. Les caractéristiques énergétiques des surfaces solides sont des paramètres importants dans les phénomènes d'adhésion bactérienne (Bellon-Fontaine et al. 1990). Selon les caractéristiques énergétiques de la surface solide étudiée, l'adhésion microbienne peut être augmentée ou diminuée, d'une part et d'autre part, la répartition des cellules adhérentes aux surfaces solides peut être différente (Van Pelt et al. 1985).

### **5.2. Propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne :**

Les propriétés physico-chimiques: hydrophobicité, charge électrostatique, donneur d'électrons/accepteur d'électrons et les propriétés structurales (fibre, flagelle...) ont une grande influence sur l'adhésion microbienne. L'hydrophobicité de la surface cellulaire est généralement acceptée comme facteur important dans le phénomène d'adhésion (Van Loosdrecht et al. 1987). (Van Loosdrecht et al. 1987) ont montré que l'hydrophobicité de plusieurs microorganismes est bien corrélée avec l'adhésion à une surface solide. Cette corrélation indique que les cellules hydrophobes adhèrent mieux que les cellules hydrophiles. (Husmark and Rønner 1992)(Husmark and Rønner 1993) ont montré que l'adhésion des spores bactériennes augmente avec l'hydrophobicité de leur surface.

Le rôle de la charge dans le phénomène d'adhésion a été étudié par plusieurs auteurs (Mozes et al. 1988)(Van der Mei et al. 1993)(Van der Mei et al. 1995)(Van der Mei and Busscher 1997).

La corrélation entre la charge de la surface et l'adhésion n'est pas linéaire; ainsi l'effet de la charge paraît plus important pour l'adhésion des cellules hydrophiles que celles hydrophobes.

Van Oss (1996) a rapporté que l'énergie des interactions acido-basiques peut être deux fois plus importante que celle due aux interactions de Van der Waals ou des interactions électrostatiques, mais leur rôle dans le phénomène d'adhésion est rarement étudié.

La présence des appendices (flagelles, pilis, fimbriae) à la surface des cellules peut également avoir un effet sur l'adhésion des microorganismes. En effet, la présence des flagelles peut influencer l'étape de transport et les interactions physico-chimiques et par conséquent le processus d'adhésion.

(Vatanyoopaisarn et al. 2000) ont rapporté que l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur l'acier inoxydable est forte quand cette souche porte des flagelles. Corpe (1980) a montré que les fimbriae jouent un rôle dans l'adhésion en recouvrant les répulsions électrostatiques qui existent entre les microorganismes et le substrat.

### 5.2.1. Mode et milieu de culture :

Les propriétés et la composition du milieu de suspension jouent un rôle déterminant dans l'adhésion microbienne à la surface des matériaux. L'augmentation de la force ionique du milieu favorise l'adhésion des cellules sur la surface, ceci peut être expliqué par la diminution de la longueur de Debye avec l'augmentation de la force ionique causant une diminution de la barrière énergétique pour que les cellules adhèrent. (Fletcher 1988) a trouvé que l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium, calcium, ion ferrique) a un effet sur l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* à la surface du verre.

### 5.3. Caractéristiques du support influençant l'adhésion

Pour étudier l'adhésion microbienne sur les matériaux, il est important de prendre en compte le type de métal ou de matériau, l'hydrophobicité, la rugosité de surface, les procédures de nettoyage (Boulangé-Petermann 1996) et la présence ou non d'un film organique.

#### 5.3.1. Caractéristiques énergétiques des surfaces solides

Les caractéristiques énergétiques des surfaces solides sont des paramètres importants dans les phénomènes de l'adhésion bactérienne (Bellon- Fontaine et al 1990). Selon les caractéristiques énergétiques de la surface solide étudiée, l'adhésion microbienne peut être augmentée ou diminuée, d'une part et d'autre part, la répartition des cellules adhérentes aux surfaces solides peut être différente (Van Pelt et al 1985; Fregard 1991).

#### 5.3.2. Rugosité des surfaces solides

Selon les auteurs, les surfaces rugueuses :

- ✚ sont plus actives ;
- ✚ protègent les cellules des forces de cisaillement dues à l'écoulement.

En revanche, pour d'autres auteurs, la rugosité permet de réduire la surface de contact entre le micro-organisme et le support, favorisant ainsi son détachement (Boulangé-Petermann 1997). Ainsi, la rugosité des supports ne paraît pas influencer directement l'adhésion. Certains auteurs ont rapporté que

la rugosité des matériaux influence l'adhésion au-dessus d'une valeur de rugosité moyenne de  $0,9\mu\text{m}$  (Hilbert et al 2003). D'autres auteurs affirment qu'au-dessus de  $10\mu\text{m}$  (Scheuerman et al 1998), la rugosité n'a plus d'influence sur l'adhésion. Il apparaît alors que pour que la rugosité influence l'adhésion des micro-organismes, sa valeur moyenne doit être de l'ordre de grandeur du diamètre de l'élément biologique étudié.

### 5.3.3. Film organique

L'adsorption de composés organiques sur la surface solide entraîne sa modification physico-chimique. Ce film organique masque en partie ou totalement les propriétés initiales de la surface et augmente l'adhésion ou au contraire la diminue. Le conditionnement par des molécules organiques ne semble cependant pas éliminer l'adhésion bactérienne.

### 5.3.4. Nettoyage des surfaces

Les traitements de nettoyage des surfaces influencent la charge et l'énergie de surface du matériau (Boulangé-Petermann 1997, 1996). Selon les produits utilisés pour le nettoyage des surfaces (produits acides, basiques, ...), les surfaces peuvent être plus ou moins chargées et posséder des énergies de surface différentes, engendrant ainsi une adhésion différente du micro-organisme. Le nettoyage de l'acier avec un mélange HF/HNO<sub>3</sub> dissout la couche d'oxydes du matériau. Dès que le matériau est exposé à l'air, il se recouvre à nouveau d'oxydes. Selon le temps d'exposition à l'air, la couche d'oxydes ne possède pas les mêmes propriétés et peut donc influencer l'adhésion.

## 5.4. Caractéristiques du milieu environnant :

### 5.4.1. Température :

La température représente un facteur qui influence l'adhésion microbienne. L'adhésion de *Enterococcus faecalis* sur le verre diminue lorsque la température augmente, par contre, elle augmente avec la température lorsque celle-ci adhère sur le silicium (Gallardo-Moreno et al. 2002). (Mafu et al. 1990) ont montré que *Listeria monocytogenes* adhère à une température  $T=4^{\circ}\text{C}$  et à la température ambiante, mais le temps nécessaire pour l'adhésion à  $4^{\circ}\text{C}$  est trois fois plus important que celui nécessaire à la température ambiante.

### 5.4.2. pH :

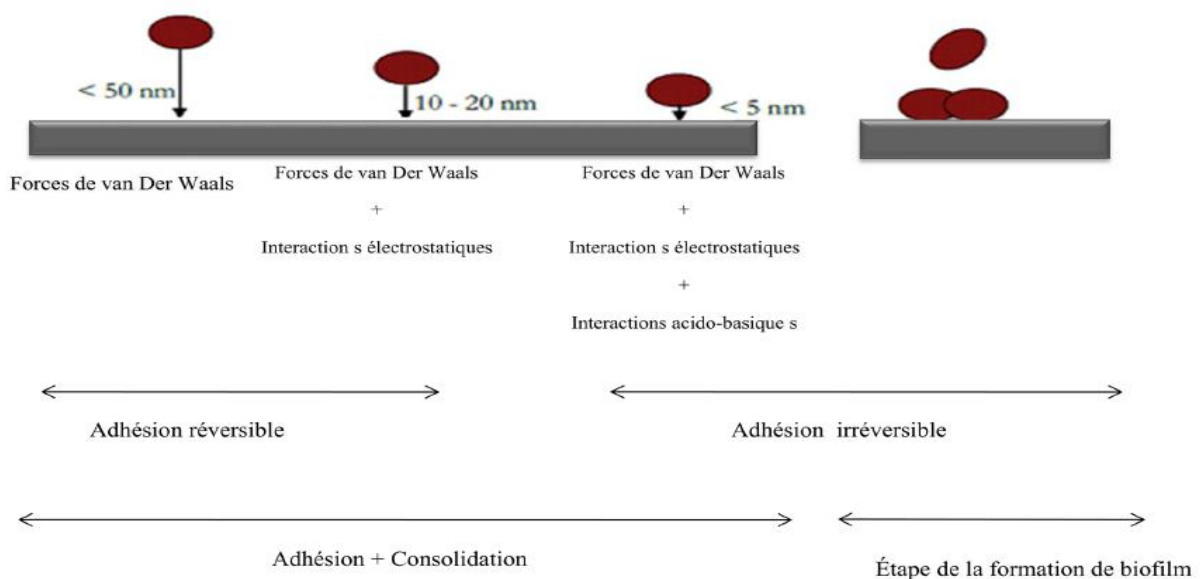
Le pH de milieu de suspension influence les propriétés électrostatiques et les propriétés acido-basiques par la réduction ou l'augmentation de la dissociation des groupements acido-basiques par exemple les

phosphates et les carboxyles. Cependant, le pH représente un facteur très intéressant dans l'adhésion microbienne. Peu d'études concernant l'effet de pH sur l'adhésion microbienne ont été réalisées. Pour cette raison, parmi les objectifs principaux de ce travail, nous avons voulu étudier la relation entre le pH du milieu de suspension et l'adhésion microbienne à une surface inerte. (Hamadi et al., 2005, Katsikogianni et al., 2004, Di Bonaventura et al., 2008, Hori et al., 2010, Zupan et al., 2009, Bridier et al., 2010; Yang et al., 2016).

#### IV. Interactions physico-chimiques :

Une fois les microorganismes arrivent à proximité des surfaces par les mécanismes de transport cités auparavant, ils peuvent adhérer par l'intermédiaire des interactions physico-chimiques (Figure 6). Ces interactions comprennent (Van Oss, 1996) :

- ☒ Les interactions de Van der Waals ;
- ☒ Les interactions électrostatiques ;
- ☒ Les interactions acido-basiques donneur d'électrons - accepteur d'électrons au sens de Lewis).

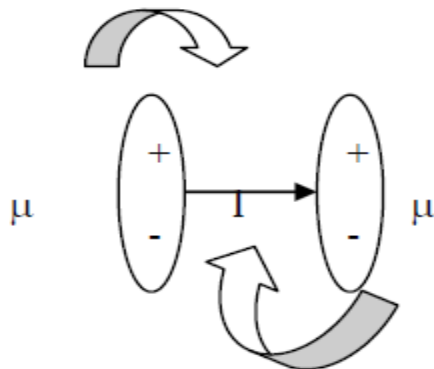


**Figure 6: Schéma de l'adhésion d'un microorganisme sur un support et les différentes interactions qui interviennent en fonction de leur distance de séparation (Fletcher, 1996).**

##### 1. Les interactions de Van der Waals

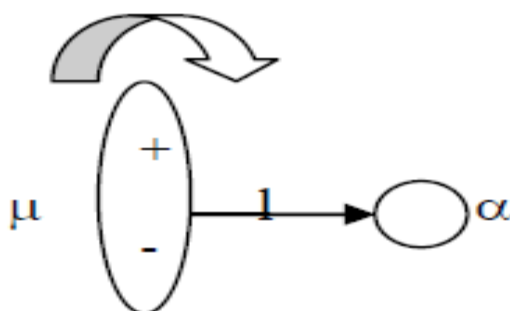
Ces forces sont décrites par Van der Waals en 1873. Elles impliquent l'existence d'une interaction d'attraction entre deux atomes neutres. Il a été rapporté que les forces de Van der Waals comprennent trois types de forces :

- ✚ **Forces de Keesom** (forces d'orientation). Ces forces qui sont décrites par Keesom en 1915 indiquent les interactions entre deux molécules polaires, c'est-à-dire d'une interaction dipôle – dipôle (orientation) (figure 7)



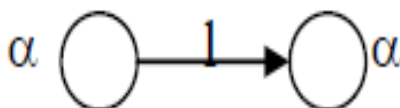
**Figure 7: Interaction de Keesom entre deux molécules polaires (Keesom en 1915).**

- ✚ **Forces de Debye** (forces d'induction) : décrites par Debye en 1920, elles impliquent les interactions entre un dipôle permanent et un dipôle induit (Figure 8)



**Figure 8: Forces de Debye entre deux molécules séparées avec une distance (Debye en 1920).**

- ✚ **Forces de London** : ce sont de faibles forces intermoléculaires qui proviennent des forces attractives entre deux molécules non polaires. Les forces de London peuvent être présentées entre deux molécules non polaires (**figure 9**) car les électrons se déplacent autour de la molécule. Il y a une grande chance que la densité d'électrons ne sera pas distribuée uniformément autour de la molécule. Lorsqu'une distribution non uniforme apparaît, un dipôle est créé. Ce dipôle peut réagir avec d'autres dipôles.



**Figure 9: Forces de London entre deux molécules non polaires**



## 2. Les interactions électrostatiques :

Une particule, une bactérie ou une surface plane immergée dans un fluide acquièrent une charge de surface provoquée par l'adsorption ou l'ionisation des groupements présents à leur surface (James, 1991). Cette adsorption et cette ionisation dépendent du pH du milieu. Pour un pH neutre, la plupart des corps solides (microorganismes) portent une charge négative. La surface chargée qui est immergée dans un milieu aqueux facilite la redistribution des ions.

## 3. Les interactions acido-basiques :

Dans un milieu aqueux, les interactions polaires comprennent principalement l'interaction entre donneur d'hydrogène et accepteur d'hydrogène (ou entre acide et base de Bronsted). D'après Van Oss (1996), ce concept doit être élargi aux interactions donneuses d'électrons / acceptuses d'électrons ou interactions acido-basiques au sens de Lewis. Les forces d'interactions polaires sont essentielles en milieux aqueux et décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance. Les interactions acido-basiques présentent des énergies pouvant être deux fois plus grandes que les interactions de Van der Waals ou les interactions électrostatiques (Van Oss et al. 1988).

## V. Les approches théoriques de l'adhésion bactérienne aux surfaces solides :

### 1. Approche thermodynamique :

Cette approche considère le processus d'adhésion comme la création d'une nouvelle interface entre le substrat, le microorganisme (MS) et la destruction de deux premières interfaces : Microorganismes et liquide (ML) et solide- liquide SL (figure 10).

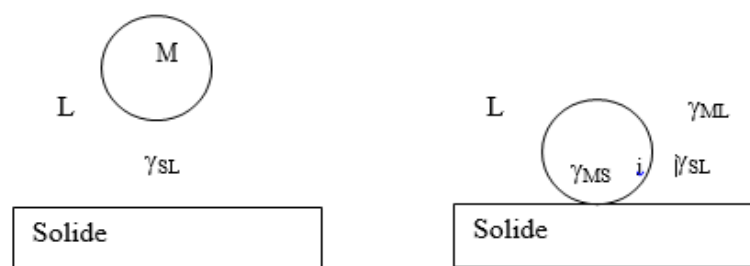


Figure 10: Présentation de l'adhésion d'un microorganisme à la surface solide selon l'approche thermodynamique (Bos et al. 1999).

La tendance pour qu'il y ait une association des deux surfaces est exprimée comme un équilibre de l'énergie libre:

$$\Delta G_{\text{adh}} = \gamma_{\text{MS}} - \gamma_{\text{ML}} - \gamma_{\text{SL}} \quad (1)$$

Avec :  $\Delta G_{adh}$  représente la tension superficielle (énergie libre inter-faciale).

Parmi les approches théoriques, on peut citer : l'angle de contact qui peut être relié à l'énergie libre de la surface selon l'équation de Young :

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (2)$$

Où  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  et  $\gamma_{LV}$  sont respectivement les tensions inter-faciales entre le substrat solide S et la phase vapeur, V, entre S et le liquide L et entre L et V ;  $\cos \theta$  représente l'angle de contact sur le solide (Neumann et al. 1974).  $\gamma_{LV}$  et  $\gamma$  sont les seuls paramètres qui peuvent être déterminés expérimentalement. Alors une relation entre tous les paramètres apparaît nécessaire. D'après des hypothèses thermodynamiques, une équation d'état qui permet de relier ces paramètres a été trouvée (Ward and Neumann 1974) :

$$\gamma_{SL} = f(\gamma_{SV}, \gamma_{LV}) \quad (3)$$

L'utilisation des données expérimentales de l'angle de contact et la tension interfaciale du liquide vapeur permet d'aboutir à l'équation suivante (Neumann et al. 1974) :

$$\gamma_{SL} = [(\gamma_{SV})^{1/2} - (\gamma_{LV})^{1/2}] / (1 - 0.015(\gamma_{SV}\gamma_{LV})^{1/2}) \quad (4)$$

(2) et (4) impliquent que :

$$\cos \theta = [(0.015\gamma_{SV} - 2)(\gamma_{SV}\gamma_{LV})^{1/2} + \gamma_{LV}] / (0.015\gamma_{LV}) \quad (5)$$

Alors d'après l'équation (5)  $\gamma_{SV}$  et  $\gamma_{SL}$  peuvent être déterminées. De la même manière  $\gamma_{BL}$  et  $\gamma_{BS}$  peuvent être calculées.

La description de l'adhésion par l'approche thermodynamique indique le rôle de l'énergie de la surface et de l'hydrophobicité et elle tient compte des forces à courte distance (Busscher et al. 1984) mais elle ne tient pas en considération les interactions électrostatiques. En réalité les interactions électrostatiques et l'hydrophobicité ont une influence sur l'adhésion (Mozes et al. 1987).

L'approche thermodynamique peut être corrélée avec les résultats expérimentaux (Asther et al. 1990)(Busscher et al. 1990) (Bellon-Fontaine et al. 1996). Mais dans certains cas, elle ne peut pas expliquer les résultats d'adhésion (McEldowney and Fletcher 1986) (Pratt-Terpstra et al. 1988)(Sjollema et al. 1990).

**2. Approche de l'adhésion par la théorie classique DLVO :**

Ce premier modèle fut développé par (Derjaguin and Landau 1993). Dans cette théorie, l'adhésion microbienne était décrite comme un équilibre entre les interactions attractives de Lifshitz Van der Waals et les interactions électrostatiques répulsives ou attractives. Selon cette théorie, l'énergie libre d'interaction totale **GT** entre deux corps séparés par la distance **d** est la somme de l'énergie d'attraction due aux forces de London –Van der Waals **GV** et de l'énergie de répulsion (attraction) due aux forces électrostatiques **GE** :

$$GT = GV + GE$$

L'énergie d'interaction dépend de la géométrie des entités qui interagissent entre elle. Pour un système idéal sphère (cellule)-plan (substrat), l'énergie d'attraction de Van der Waals est donnée par la relation suivante :

$$GV = -A/6[2a (d + a)/d (d+2a) - \ln (d+2a/d)] \quad (6)$$

(6) peut être simplifiée pour une faible distance de séparation ( $d \ll a$ ),  $GV = -Aa/6d$

Avec **A** est la constante de Hamaker (Rutter et Vincent, 1980 ; Norde et Lyklema, 1989 ; Lyklema, 1995), **a** : rayon de la sphère, **d** : distance de séparation entre la sphère et le plan.

L'énergie électrostatique est exprimée selon la relation suivante :

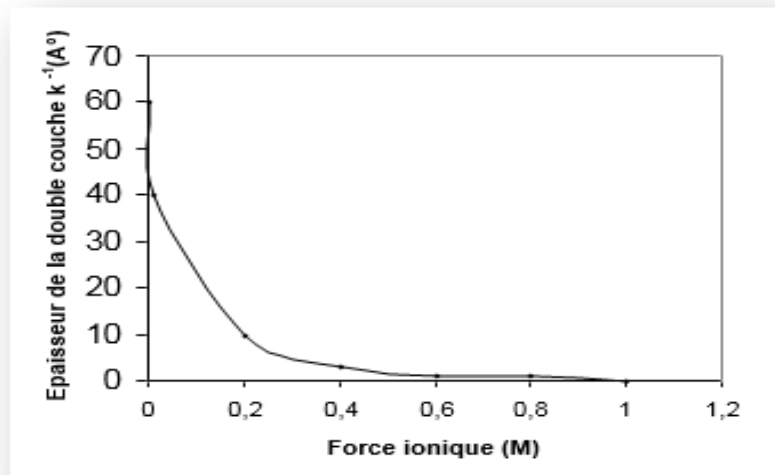
$$G_E (d) = \pi \epsilon a (\xi_1^2 + \xi_2^2) (2\xi_1 \xi_2 \ln [1 + \exp (-kd)] / (1 - \exp (-kd))] / (\xi_1^2 + \xi_2^2) + \ln (1 - \exp (-2kd))$$

$\epsilon$ : permittivité de milieu

$\xi$ : le potentiel zêta.

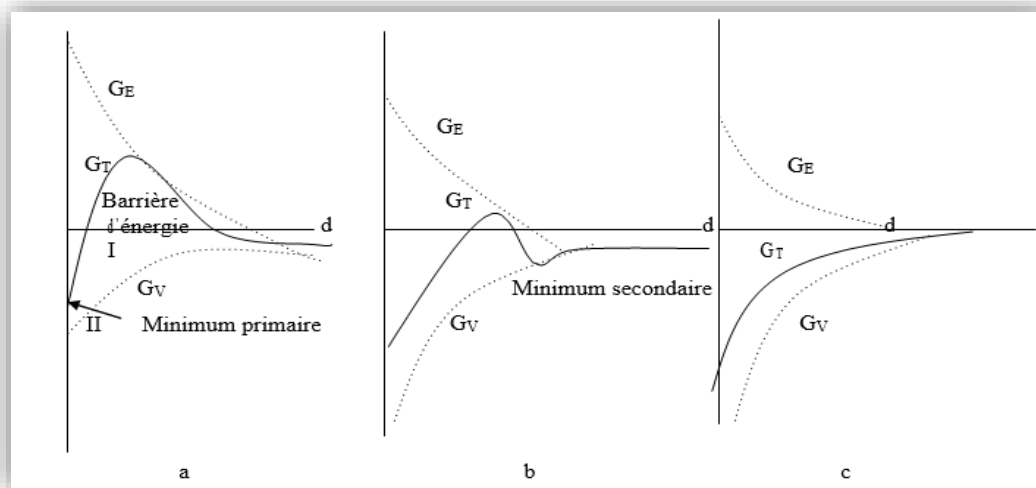
$k^{-1}$  : l'épaisseur de la double couche,  $k^{-1}$  peut être calculée d'après l'équation suivante :

$k = [e^2 \sum z_i n_i / \epsilon \kappa T]^{1/2}$  où **e** : charge de l'électron ; **k**: constante de Boltzmann, **z<sub>i</sub>** : valence des ions ; **n<sub>i</sub>** : nombre d'ions par unité de volume. **k** étant proportionnelle à la concentration en électrolytes dans le milieu, plus cette concentration augmente plus **k** augmente (Figure 11) et plus les interactions électrostatiques de la double couche deviennent faibles.



**Figure 11: L'épaisseur de la double couche en fonction de la force ionique de PBS à pH 7 (Bos et al. 2000)**

L'énergie d'attraction de Van der Waals n'est pas influencée par la force ionique, par contre les interactions électrostatiques diminuent avec l'augmentation de la force ionique (Bos et al. 2000). Par conséquent, l'énergie d'interaction totale est influencée par la force ionique (figure 12).



**Figure 12: Énergie d'interaction totale d'après DLVO entre deux entités qui sont chargées de même signe (a) : force ionique faible, (b) : force ionique intermédiaire, (c) : force ionique forte.**

Pour des concentrations en électrolytes faibles (inférieures à  $10^{-4}$  mol/l), l'épaisseur de la double couche  $k^{-1}$  étant importante, et il existe une barrière d'énergie d'interaction (I), la particule est donc repoussée et

ne peut se stabiliser à proximité de la surface réceptrice. L'énergie exigée par la cellule pour traverser ce maximum et s'approcher de la surface est forte. Pour des concentrations intermédiaires, la barrière d'interaction subsiste mais elle est plus faible. Une certaine fraction de collision particules – surfaces permet aux particules de franchir la barrière et de se stabiliser forcément. Dans ce cas, les microorganismes tendent à s'accumuler premièrement au minimum secondaire et ultérieurement au premier minimum. Les forces d'interactions sont essentiellement de type Van der Waals. Lorsque la distance de Séparation est supérieure ou égale à 6 nm, il peut y avoir un minimum secondaire d'énergie car  $GE(d)$  est nulle. Ce minimum dépend de la taille des particules et permet leur stabilisation temporaire. Pour une concentration ionique élevée, l'épaisseur de la double couche est faible,  $GE(d)$  est nulle au-delà de 2 nm et il n'y a plus de barrière énergétique d'interaction. Toutes les collisions particule/surface entraînent l'établissement d'un contact permanent irréversible. Généralement, les microorganismes et les surfaces solides sont chargés négativement (Van Loosdrecht et al. 1987)(Busscher et al. 1990). Dans ce cas, quelle que soit la concentration en électrolyte de milieu de suspension, les microorganismes qui ont une taille importante rencontrent une forte barrière d'énergie répulsive à faible distance de la surface (5nm) qui les empêchera d'adhérer dans le minimum primaire situé à moins de 3 nm de la surface mais ils peuvent se positionner dans la zone de minimum secondaire. Lorsque les cellules sont adhérentes réversiblement, elles peuvent encore manifester le mouvement brownien (MARSHALL et al. 1971). Par contre, l'adhésion irréversible diminue ce mouvement et les cellules paraissent immobiles. L'énergie qui pousse les microorganismes du minimum secondaire au minimum primaire peut être fournie soit par le mouvement brownien ou bien par les cellules pouvant posséder une énergie thermique suffisante pour traverser la barrière (MARSHALL et al. 1971)(Van Loosdrecht et al. 1989).

La théorie DLVO tient compte des interactions à longue distance et met en évidence le rôle des interactions électrostatiques, mais cette théorie néglige les interactions à courte distance par exemple les interactions dipôle – dipôle, les interactions dipôle- dipôle induit (debye) et les interactions acides - bases. Ces dernières sont prédominantes dans les milieux aqueux et jouent un rôle très important dans l'adhésion microbienne. Finalement, la théorie DLVO permet de prévoir qualitativement l'adhésion des microorganismes mais ne peut pas donner des renseignements quantitatifs sur le phénomène.

### **3. Théorie de DLVO modifiée par Van Oss (Extended DLVO) :**

Généralement, il apparaît que les deux précédentes théories ne peuvent pas expliquer complètement l'adhésion microbienne. Van Oss suggère un développement de la théorie DLVO (Van Oss et al. 1986). Dans cette nouvelle approche, trois types d'interactions sont prises en considération : interactions

électrostatiques, interactions de Van der Waals, et interactions acido-basiques. Les interactions acido-basiques dépendent du caractère donneur d'électrons-accepteur d'électrons entre les entités polaires dans le milieu aqueux et elles sont responsables de toutes les anomalies trouvées dans l'interprétation théorique des interactions inter-faciales dans un milieu car leur énergie peut dépasser l'énergie des forces classiques de DLVO.

L'énergie totale d'interaction est exprimée comme suit :

$$G_T = G_E + G_{LW} + G_{AB}$$

Avec :

a : rayon de la sphère

$$\Delta G_{AB}(d) = 2\pi a \lambda \Delta G_{adh}^{AB}(d_0) \exp[(d_0 - d)/\lambda]$$

$\lambda$  : longueur de corrélation qui concerne la molécule d'eau

$d_0$  : distance à l'équilibre.

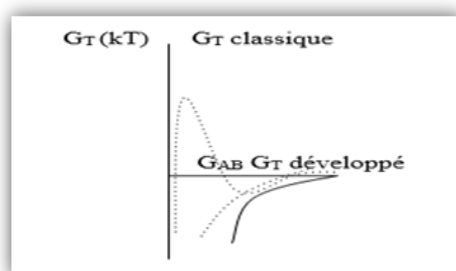
$\Delta G_{adh}^{AB}$  : l'énergie libre d'interaction à la distance d'équilibre.

$\Delta G_{adh}^{AB}(d_0)$  peut être calculée par l'utilisation de donneur d'électrons  $\gamma^-$  et accepteur d'électrons  $\gamma^+$  des entités qui réagissent entre elles (Van Oss, 1994).

L'énergie libre d'interaction acido-basique entre les deux entités 1 et 2 immergées dans un milieu liquide 3 est exprimée par (Van Oss, 1994)

$$\Delta G_{132 AB} = 2[(\gamma_3^+)^{1/2}[(\gamma_1^-)^{1/2} + (\gamma_2^-)^{1/2} - (\gamma_3^-)^{1/2}] + (\gamma_3^-)^{1/2}[(\gamma_1^+)^{1/2} + (\gamma_2^+)^{1/2} - (\gamma_3^+)^{1/2}] - (\gamma_1^+ \gamma_2^-)^{1/2} - (\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2}]$$

L'introduction du terme d'énergie d'interaction acido-basique dans l'énergie totale d'interaction (DLVO Extended) montre une grande influence sur la variation de l'énergie d'interaction (figure 13).



**Figure 13: Comparaison entre l'énergie d'interaction déduite de DLVO classique et DLVO développée (Bos et al., 1999).**

Ainsi, il faut noter que les interactions acido-basiques sont à courte distance et elles ont un effet significatif pour de petites distances de séparation (5 nm à 10 nm) (Bos et al. 1999).

### ❖ Limites des approches théoriques classiques

La théorie DLVO et l'approche thermodynamique ont fourni des explications au phénomène d'adhésion microbienne, mais elles présentent plusieurs limitations.

- ✚ Pour la théorie DLVO : les surfaces qui réagissent entre elles sont supposées être homogènes, rigides, lisses et non pénétrables par les ions,
- ✚ Pour l'approche thermodynamique : les surfaces sont considérées homogènes; le système est considéré en équilibre; les interactions électrostatiques ne sont pas prises en considération car les énergies de surface sont déterminées par l'angle de contact.

*Chapitre III :*  
**Technologies et techniques utilisées pour l'étude  
des interactions microorganisme/support**



## I. Introduction :

Les industries agroalimentaires ont l'obligation de prendre toutes les mesures visant à garantir la sécurité sanitaire de leurs produits. Les progrès importants réalisés en matière de sécurité microbiologique des aliments depuis 10 ans ont été accompagnés d'une multiplication des analyses effectuées par les usines sur les produits finis, les intrants et l'environnement industriel (chaîne de fabrication et locaux), pour identifier les sources de contamination et pour valider l'efficacité des mesures de maîtrise des dangers. Suite à la réduction des fréquences et des niveaux de contamination, le renforcement du niveau de maîtrise hygiénique des produits doit faire intervenir de nouveaux outils. Plusieurs techniques sont fait l'objet d'étude la contamination microbienne, soit en terme d'études de l'adhésion ou bien de la formation du biofilm, ainsi l'étude de différents paramètres interviennent dans l'adhésion pour éviter ou prévenir la contamination et maîtrisé le risque aux niveaux dès l'industrie agroalimentaires, l'objectif de ce chapitre c'est l'étude des différents techniques et technologie pour l'étude des interactions microorganisme/support.

## II. Technique du MATS

La MATS "Microbial Adhesion To Solvents", méthode mise au point par (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996), permet de déterminer les caractères donneur/ accepteur d'électrons (acide/ base au sens de Lewis) et hydrophobe/ hydrophile des microorganismes. Cette méthode de partage repose sur l'affinité des microorganismes pour différents solvants de propriétés physicochimiques connues. Elle est basée sur la comparaison entre l'affinité des cellules microbiennes à un solvant monopolaire et un solvant apolaire. Le solvant monopolaire peut être acide ou basique, au sens de Lewis, mais les deux solvants, polaire-apolaire, doivent avoir les composantes de la tension de surface de Lifshitz- Van der Waals similaires.

Sur cette base, pour déterminer les propriétés acides ou basiques des cellules microbiennes en utilisant la méthode de MATS, deux paires de solvants ont été sélectionnées : la paire Chloroforme (solvant acide qui montre un caractère basique négligeable quand il est pur) et Hexadécane et la paire Diéthyléther (DEE) (solvant basique fort) et Hexane. L'Hexadécane et l'Hexane sont des n- alcanes apolaires (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996)

L'hydrophobicité correspond au pourcentage des cellules adhérees aux solvants apolaires, l'hexadécane et l'hexane. La souche est considérée hydrophobe lorsque ce pourcentage dépasse 50%. Dans le cas contraire, elle est considérée comme hydrophile. De nombreuses études ont rapporté que l'hydrophobicité des surfaces microbiennes mesurée par l'hexadécane est précise et reproductible (Dickson and Koohmaraie, 1989, Pelletier *et al.*, 1997b).

Le caractère donneur/accepteur d'électrons correspond à la différence d'affinité des cellules bactériennes entre les solvants polaires et apolaires qui constituent chaque couple de solvants.

C'est alors la différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme (acide, accepteur d'électrons) et celui de l'hexadécane qui permet d'évaluer le caractère donneur d'électrons des cellules microbiennes. Le caractère des souches étudiées est basique quand cette différence est positive. Alors que la différence entre le pourcentage d'adhésion au diéthyléther (basique, donneur d'électrons) et celui d'hexane permet d'évaluer le caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes. Le caractère des souches étudiées est acide lorsque cette différence est positive (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

### III. La chromatographie d'interaction hydrophobe

La chromatographie d'interaction hydrophobe ((Mozes *et al.*, 1989) (hydrophobic interaction chromatography) est une méthode qui sépare les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe. Son principe repose sur le fait qu'en présence d'une force ionique élevée (fortes concentrations en sels), les molécules d'eau constituant l'enveloppe d'hydratation des protéines sont déplacées pour hydrater les anions et les cations provenant de la dissociation du sel (relargage, salting out). Ceci entraîne une réorganisation des molécules d'eau autour des protéines et l'exposition de leurs zones hydrophobes favorisant l'établissement d'interactions hydrophobes entre ces zones (normalement enfouies) et les groupements hydrophobes portés par la phase stationnaire. Les protéines qui se lient à la phase stationnaire réadoptent leur conformation native lorsqu'un tampon avec une force ionique faible est ajouté. Il en résulte une élution des protéines.

### IV. Le partage entre deux phases (PEG/DEX)

Le partage entre deux phases DEX/PEG (Gerson, 1980) dépend des caractéristiques extérieures autres que la charge. Ces caractéristiques sont considérées liées à l'hydrophobicité de surface des cellules puisque la phase supérieure (riche en PEG) a une énergie plus faible que la phase inférieure (riche en DEX).

L'hydrophobicité est exprimée comme le rapport en pourcentage entre des cellules dans la phase supérieure et la quantité totale des cellules mises en essai.

Cette appellation regroupe l'ensemble des essais pour lesquels la suspension cellulaire est mise en contact avec la surface inerte dans des conditions statiques ou des conditions d'agitation peu maîtrisées. A l'issue d'un temps de contact variable (de quelques minutes à plusieurs jours), le support est la plupart du temps rincé et les microorganismes restant adhérents sont comptés sous microscope optique, avec ou sans

marquage préalable. Les microorganismes peuvent également être dénombrés après avoir été détachés du support par sonication. Les procédures de rinçage sont le plus souvent non standardisées (par exemple, un rinçage « doux », préconisé sans autre précision, est effectué) et vont dépendre de l'opérateur, rendant ainsi impossible toute comparaison entre des résultats provenant de différents laboratoires. Par ailleurs, pendant le rinçage, les microorganismes adhérents sont soumis à des forces de détachement relativement importantes. Ainsi, un rinçage « doux » soumet le microorganisme à une force de l'ordre de  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  N. Mais le simple fait de sortir la lame de la suspension cellulaire se révèle de loin le plus drastique. En effet, cette dernière étape correspond à l'établissement d'une interface eau-air, ce qui se traduit par des forces de détachement de l'ordre de  $10^{-7}$  N (Leenaars, 1988). Ces forces, le plus souvent appliquées de manière non intentionnelle, conduisent en fait à évaluer la rétention du microorganisme sur le support plutôt que sa réelle adhésion.

### **V. Méthodes de quantification et de l'étude de l'adhésion des micro-organismes aux surfaces :**

#### **1. Dénombrement des cellules viables cultivables**

Pour dénombrer les cellules viables adhérentes, il faut les décrocher du support solide soit par traitement aux ultra-sons, soit en « grattant » les surfaces. Les micro-organismes ainsi récupérés sont alors ensemencés en gélose nutritive et incubés, généralement à leur température optimale de croissance. Cette technique ne permet que de déterminer les formes viables et cultivables (Heidelberg, 1997). De plus, il est à noter que la remise en suspension des cellules décrochées implique une dilution et augmente ainsi le seuil de sensibilité de cette méthodologie.

#### **2. Les microplaques**

Cette technique n'est qu'une variante de la précédente. En effet, elle consiste à faire adhérer la suspension cellulaire au fond et sur les parois d'une plaque « 96 puits ». Les procédures de rinçage et de marquage sont du même type que dans la technique d'immersion. Cette technique est qualifiée de technique « haut-débit » car elle permet une lecture rapide et automatisée des résultats. Elle est notamment utilisée pour réaliser des criblages, par exemple pour évaluer la sensibilité de biofilms à une palette d'antibactériens ou d'antifongiques selon le biofilm considéré (Ramage *et al.*, 2001).

#### **3. Méthodes microscopiques de quantification de l'adhésion sur un support solide :**

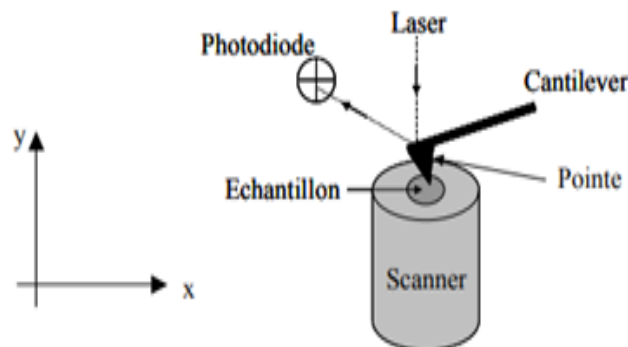
Avant d'évaluer la force d'adhésion proprement dite, avec les difficultés opératoires liées à la complexité des surfaces microbiennes, il est nécessaire de mettre au point des méthodes expérimentales permettant la quantification du niveau d'adhésion pour un microorganisme en contact avec une surface donnée et sa variation en fonction des conditions environnementales.

#### a) La microscopie électronique à balayage

C'est à la microscopie électronique à balayage que l'on doit les premières données sur la structuration des biofilms. Bien que largement controversée aujourd'hui, notamment car elle présente un risque de dénaturation de l'échantillon biologique, dû à la fixation artificielle des structures, au recouvrement par un film métallique et au travail sous vide, elle offre encore de nombreuses informations. (Nett and Andes, 2006) présentent une belle illustration de la structure bi-dimensionnelle d'un biofilm formé par *C. albicans*.

#### b) La microscopie à force atomique

Actuellement, la microscopie à force atomique (AFM) est peut-être la technique la plus précise utilisée pour étudier les premières étapes de la formation du biofilm.



**Figure 14: Principe général de l'AFM d'après (Dufrêne, 2002)**

L'un des avantages de l'AFM est la possibilité de travailler sur des échantillons en milieu liquide. Les images obtenues par AFM ne sont pas générées par un rayonnement lumineux incident comme en microscopie optique classique, mais par la mesure de la force existant entre une pointe et la surface d'un échantillon (Dufrêne and Rouxhet 1996). La figure 14 expose le principe simplifié de cette technique. Une image est obtenue suite à l'enregistrement de l'évolution de cette force quand la pointe balaye l'échantillon dans les dimensions x et y de l'espace. De plus, l'échantillon étant monté sur un support piézoélectrique, un positionnement dans les trois dimensions de l'espace est possible. La pointe est fixée sur un cantilever déformable qui agit comme un ressort. Sa déformation - ou déflexion- est mesurée à l'aide d'un laser focalisé sur la partie libre du cantilever, le rayon réfléchi étant détecté par une photodiode. Une forte

déflexion du cantilever révèle une force d'attraction globale importante entre la pointe et l'échantillon. De nombreuses approches expérimentales ont été développées afin de mesurer la force d'interaction entre un microorganisme et un support.

L'une d'elles consiste à « attacher » directement le microorganisme sur la pointe puis à déterminer l'évolution des courbes force-retrait entre ce microorganisme et le support d'intérêt (Ong and Mackie, 1999). Cependant, la pointe étant plus large que le microorganisme, il est difficile de conclure quant à l'influence « parasite » de la pointe sur la déflexion engendrée (Klein *et al.*, 2003). Il faut, de plus, noter que la phase critique de cette manipulation est l'« attachement » de la cellule sur la pointe. En effet, l'architecture macromoléculaire de la membrane du microorganisme peut être dénaturée. Un moyen de préserver cette architecture serait de le faire adhérer par interactions spécifiques. Une autre approche, proposée par Lower et ses collaborateurs consiste à fixer sur la pointe des billes portant des fonctions amines, sur lesquelles ont adhéré les bactéries (Lower et al. 2000). Il est également possible de préparer un tapis bactérien, et d'étudier les interactions de la pointe avec ce tapis.

L'AFM se révèle donc être l'outil nanométrique d'avenir pour la mesure des forces d'interaction car elle présente une sensibilité de mesure suffisante.

### c) La microscopie optique

Cette technique est particulièrement intéressante pour étudier la structuration dans l'espace du biofilm mature. C'est en utilisant cette technique que Chandra et al. (2001) ont pu mettre en évidence l'effet de la nature du support sur l'architecture du biofilm. Ce dernier est formé dans une petite cellule directement placée sous le microscope, évitant ainsi la création d'interface dommageable avec l'air. L'observation de la structure 3D est rendue possible par reconstruction d'images.

## VI. Techniques d'étude des propriétés physicochimiques

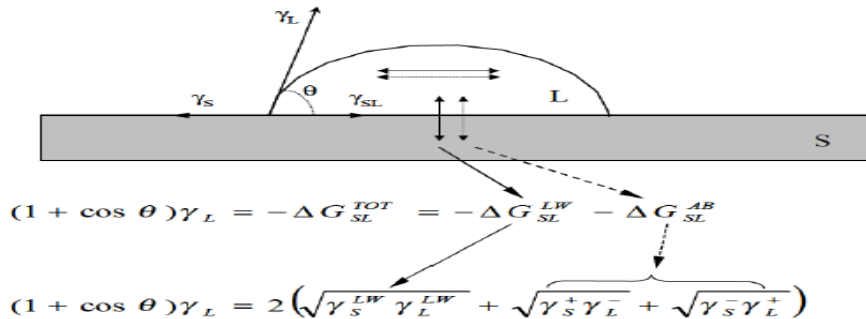
### 1. La méthode de l'angle de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer **l'angle de la tangente du profil d'une goutte** déposée sur le substrat, avec sa surface. Elle permet de mesurer **l'énergie de surface** du liquide ou du solide.

La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

**1.1.Principe :**

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact ( $\theta$ ).



**Figure 15: Angle de contact comme balance de force. Les énergies apolaires sont indiquées par des flèches pleines horizontales et verticales ; les énergies polaires (Acide-base de Lewis) sont désignées par des flèches à tirets horizontales et verticales.**

Dont :

- ✓ Les énergies apolaires sont indiquées par des flèches pleines horizontales et verticales
- ✓ Les énergies polaires (Acide-base de Lewis) sont désignées par des flèches à tirets horizontales et verticales.

**✚ La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :**

- Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.
- Si on utilise plusieurs liquides de référence différents (formamide & diiodomethane), on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui d'Owens Wendt.
- Si on mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

**1.2.Calcul de l'énergie de surface :**

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par 3 paramètres :

- La tension interfaciale solide-liquide  $\gamma_{SL}$
- La tension interfaciale solide-vapeur  $\gamma_{SV}$  ( $\gamma_S$ )
- La tension interfaciale liquide-vapeur  $\gamma_{LV}$  ( $\gamma_L$ )

Ces 3 paramètres sont reliés par l'équation de Young :

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta = 0$$

Seules  $\gamma_{LV}$  et  $\theta$  sont mesurables, par conséquent il est nécessaire d'avoir des relations supplémentaires pour estimer les inconnues  $\gamma_{SL}$  et l'énergie de surface  $\gamma_{SV}$ . Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer ces inconnues ;

### 1.2.1. Modèle de Neumann :

Dans ce modèle, on ne distingue pas les différentes composantes de l'énergie de surface et on n'essaie pas non plus de les relier aux propriétés physico-chimiques du matériau. L'équation reliant les composantes à l'angle de contact s'écrit :

$$\cos \theta \gamma_{SL} = \frac{(0.015\gamma_S - 2)\sqrt{\gamma_S\gamma_L} + \gamma_L}{\gamma_L(0.015\sqrt{\gamma_S\gamma_L} - 1)}$$

L'utilisation de cette équation doit être limitée à des systèmes qui ne sont pas trop polaires et aux valeurs obtenues avec un même liquide.

### 1.2.2. Modèle d'Owens et Wendt :

Dans le modèle d'Owens et Wendt, on considère que l'énergie de surface s'exprime sous la forme :

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^{nd}$$

Dans laquelle :

- $\gamma_s^d$  composante dispersive
- $\gamma_s^p$  composante non-dispersive

L'équation reliant les composantes à l'angle de contact s'écrit alors :

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d} \sqrt{\gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p} \sqrt{\gamma_L^p}$$

Dans ce modèle, on a besoin de deux liquides différents pour obtenir l'énergie de surface. Toutefois une approximation est faite sur le terme non dispersif en considérant qu'il est la moyenne géométrique de  $\gamma_s^{nd}$  et de  $\gamma_L^{nd}$ . Cette approximation ne permet pas de rendre compte du comportement des polymères polaires en milieu aqueux.

### 1.2.3. Modèle de Good Van Oss :

Dans le modèle de Good Van Oss, l'énergie de surface s'écrit :

$$\gamma_s = \gamma_s^d + 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-}$$

Avec :

- $\gamma_s^d$  composante dispersive (interaction dipôle-dipôle)
- $\gamma^{S+}, \gamma^{S-}$  composantes polaires

La relation entre les composantes de l'énergie de surface du solide, celles du liquide et l'angle de contact de la goutte s'écrit :

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \left( \sqrt{\gamma_s^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_s^-} \right)$$

En déposant une goutte de 3 liquides différents dont les composantes dispersives et polaires sont connues, on peut obtenir l'énergie de surface du solide.

Tableau 6: Les caractéristiques énergétiques des trois liquides utilisés pour mesurer les angles de contact décrites par Van Oss (1996).

Liquides	$\gamma_L$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L^{p+}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L^{p-}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Eau	72.8	21.8	51	25.5	25.5
Glycérol	64.0	34.0	30.0	3.92	57.4
Formamide	58	39	19	2.28	39.6
Ethylène Glycol	48.0	29	19	1.92	47
a-Bromonaphtalène	44.4	44.4	≈0	0	0
Diiodométhane	50.8	50.8	0	0	0
Cis-décàline	32.2	32.2	≈0	0	0

## 2. La Spectroscopie Infrarouge :

### 2.1. Principes de base de la spectroscopie Infra Rouge :

La radiation électromagnétique comporte le caractère de dualité onde-corpuscule. La fréquence ( $\nu$ ) de vibration est la caractéristique ondulatoire du rayonnement. La longueur d'onde  $\lambda$  est la distance parcourue pendant une période de vibration de la source. Le concept quantique (corpuscule) permet de décrire les interactions énergétiques de la lumière avec la matière au niveau moléculaire. Une radiation lumineuse a des comportements des corpuscules appelés photons. Ces photons ont la capacité de transporter une quantité d'énergie finie en fonction de la fréquence de la radiation (Lachenal G. 2006). Le spectre électromagnétique (Dalibart M. et Servant S. 2000) comporte différentes régions de rayonnement : les rayons gamma, les rayons X, l'ultraviolet, le visible, l'infrarouge, les micro-ondes et les ondes radios fréquences. De manière générale, les ondes électromagnétiques sont caractérisées par quatre grandeurs : la période, la fréquence, la longueur d'onde et le nombre d'onde.



La lumière infrarouge est un rayonnement électromagnétique comportant toutes les caractéristiques fondamentales de la lumière (propagation, réflexion, réfraction, interférences, diffraction, diffusion et polarisation). Les transitions d'énergie observées dans le domaine infrarouge sont de type vibrationnel. Par définition, la spectroscopie infrarouge s'intéresse aux vibrations des molécules lorsqu'elles sont soumises à une onde électromagnétique. Le domaine infrarouge est sous divisé en trois régions selon la fréquence (Figure 16) : Le proche infrarouge (PIR) (0,8 à 2,5  $\mu\text{m}$  soit 12500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), le moyen infrarouge (MIR) (2,5 à 25  $\mu\text{m}$  soit 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) et le lointain infrarouge (25 à 1000  $\mu\text{m}$  soit 400-10  $\text{cm}^{-1}$ ).

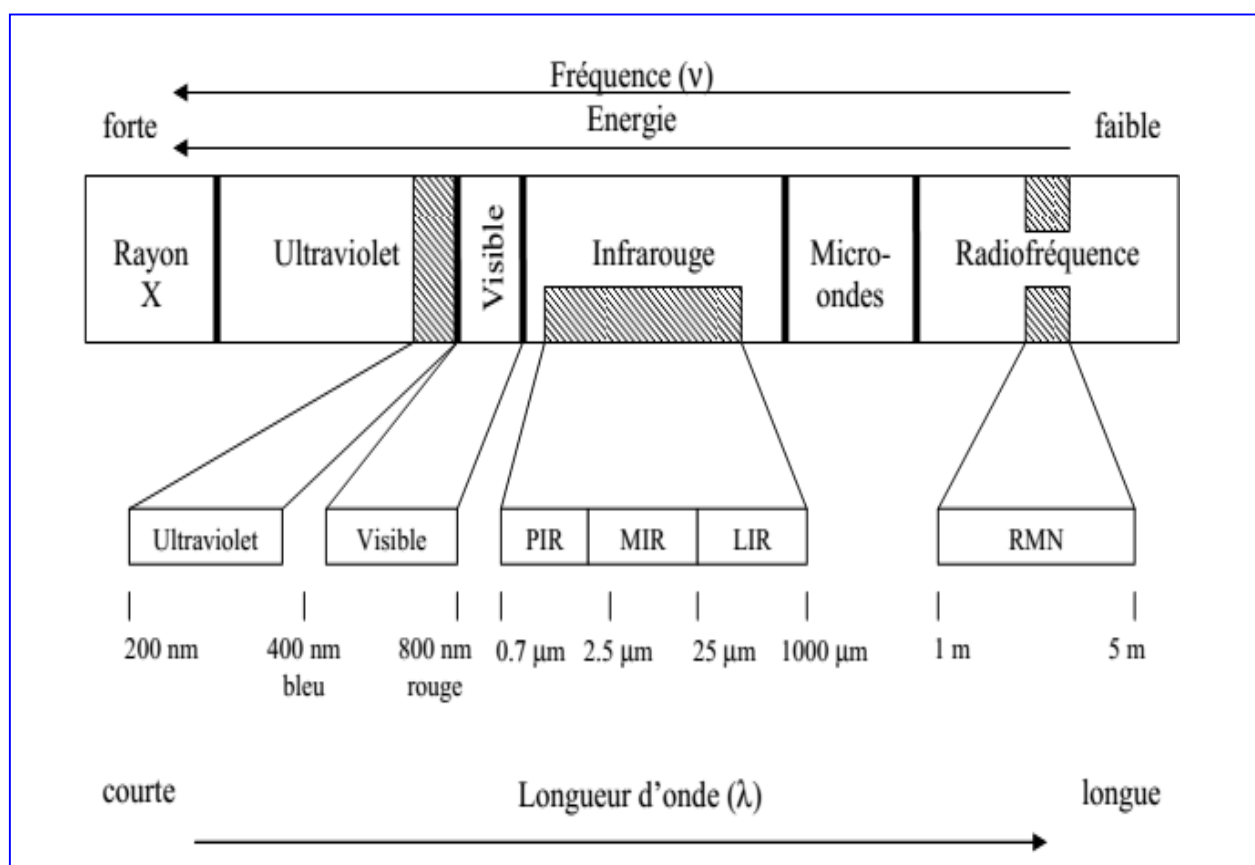


Figure 16: Domaines spectraux du rayonnement électromagnétique

### 2.2. Fondements théoriques :

La première formule reliant la vitesse de lumière  $c$ , la longueur d'onde  $\lambda$  et la fréquence  $\nu$  d'un rayonnement en mouvement dans le vide, est donnée par l'équation suivante :

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Les énergies qui constituent l'énergie interne d'une molécule (l'énergie éventuelle de translation, l'énergie de rotation, l'énergie de vibration et l'énergie électromagnétique) sont quantifiées. Elles ne prennent que des valeurs discrètes, et le photon émis sera absorbé par le matériau, s'il permet à la molécule constituant ce matériau de passer de l'état initial ( $E_1$ ) à un état excité supérieur ( $E_2$ ). Le photon apporte l'énergie  $h\nu$  qui est exactement égale à la différence d'énergie ( $E_2-E_1$ ) entre les deux états. Cette énergie est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

Le rayonnement émis d'une manière continue, sera diminué à la fréquence ( $\nu$ ), et donc il est absorbé (apparition d'une bande d'absorption). L'analyse en spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption d'une lumière émise par le matériau à analyser. Il en résulte une absorption d'énergie au niveau des différentes liaisons moléculaires. L'intensité de la lumière absorbée ou transmise suit la loi de B er-Lambert, selon l'équation suivante :

$$A = \text{Log}\left(\frac{1}{T}\right) = K.P.C$$

Avec :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

A : absorbance ou densité optique

T : transmittance

P :  paisseur ou trajet optique

K : constante fonction de l'analyte (extinction molaire)

C : concentration de la matière absorbante optique

Dans la phase des analyses, la mesure de l'intensité (I) se fait soit par rapport à l'air soit par rapport aux constituants de la matrice, excepté l'élément recherché. Dans ces conditions, l'absorbance est donnée par l'équation suivante :

$$A = \text{Log}\left(\frac{1}{T_{\text{éch}}}\right) - \text{Log}\left(\frac{1}{T_{\text{std}}}\right) = \text{Log}\left(\frac{T_{\text{std}}}{T_{\text{éch}}}\right)$$

Avec :

$T_{\text{std}}$  : Transmittance dans l'air ou le blanc (référence)

$T_{\text{éch}}$  : Transmittance dans l'échantillon

### 2.3. Attribution des bandes dans le moyen infra rouge :

Généralement, le spectre MIR est constitué de bandes d'absorption qui provient des modes de vibration des groupements fonctionnels fondamentaux. L'interprétation des spectres est faite d'une façon empirique, autrement dit, elle consiste le plus souvent, à comparer les résultats obtenus avec ceux cités dans la bibliographie. Cette dernière est fondée essentiellement sur l'analyse des molécules isolées par spectroscopie MIR. La position des bandes est en fonction de la nature de liaison (vibrateur) et son environnement.

Les liaisons entre atomes plus lourds vibrent à plus basse fréquence, alors que les liaisons entre atomes légers vibrent à plus haute fréquence. Selon la loi de Hook, la fréquence  $\nu$  et la masse réduite  $\mu$  sont inversement proportionnelles.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

L'intensité de la bande d'absorption est variable en fonction de la concentration, de la nature et de la polarité de la liaison. La fréquence de vibration est influencée par nombreux facteurs externes ou internes à la molécule : Taille et électronégativité des atomes environnants, liaisons hydrogène, effet stérique et conformation. Ces facteurs sont considérés comme un avantage, parce qu'ils permettent une forte sélectivité et par conséquent, facilitent l'analyse et l'identification spectrale.

D'une manière indépendante de leurs environnements, des groupements fonctionnels absorbent habituellement, la lumière infrarouge dans la même région. Ainsi, les vibrations d'élongation caractéristiques de la liaison C-H apparaissent presque toujours entre 3200 et 2800  $\text{cm}^{-1}$ , les vibrations d'élongation du carbonyle (C=O) entre 1800 et 1600  $\text{cm}^{-1}$ , alors que les bandes des cycles aromatiques apparaissent au-dessous de 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

En général, le spectre moyen infrarouge est divisé en quatre régions (1999) :

- La région qui s'étend de 3700 à 2500  $\text{cm}^{-1}$  est nommée région d'élongation d'hydrogène parce que les vibrations d'élongation des liaisons C-H, O-H, et N-H apparaissent à ces

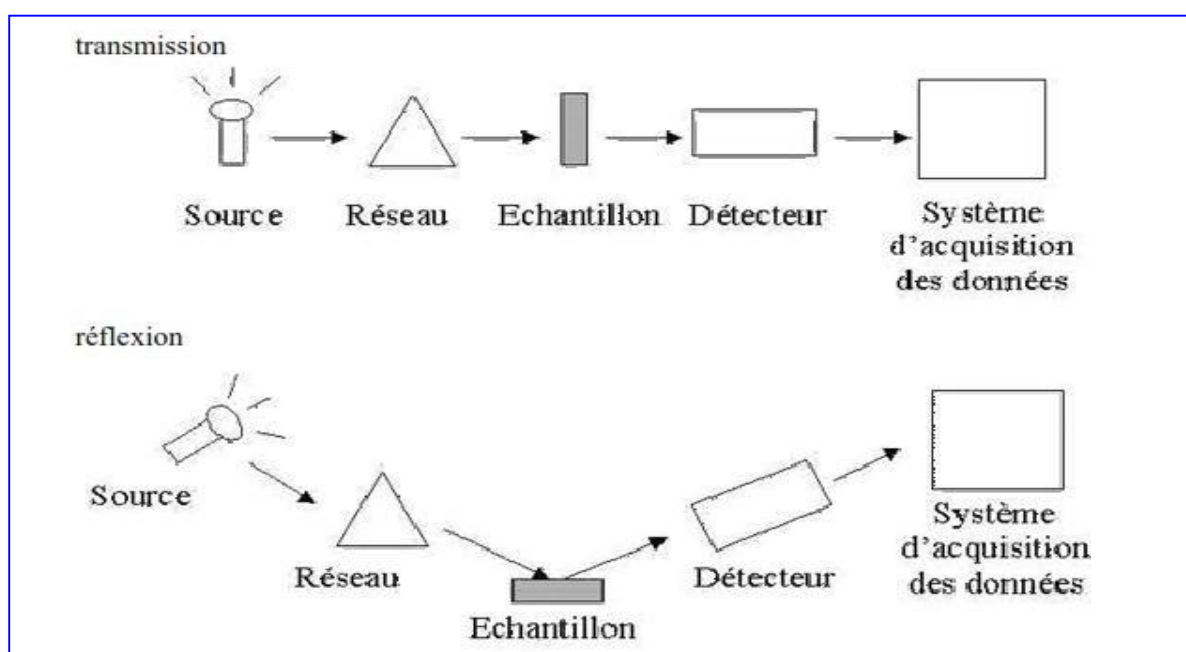
nombre d'onde.

- La région d'élongation des doubles liaisons allant de 2000 à 1600  $\text{cm}^{-1}$  et on y trouve les bandes des liaisons C=C, C=O, et C=N.
- La région s'étalant de 1600 à 1000  $\text{cm}^{-1}$  est la région d'empreinte digitale. Cette région est très complexe et difficile à interpréter à cause du grand nombre de bandes d'infrarouge qui se trouvent dans cette région (les vibrations d'élongation des liaisons simples C-O, C-C et C-N, vibrations de déformation de la liaison C-H, et quelques bandes relatives aux cycles de benzène). L'utilité de ce dernier est que les nombreuses bandes peuvent servir comme une empreinte digitale pour des molécules.
- La région allant de 1000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , est appelée parfois la région aromatique, car les bandes intenses caractéristiques des cycles de benzène sont présentes dans cette région.

## 2.4. La spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR) :

### 2.4.1. Spectromètre dispersif :

Le spectromètre infrarouge de dispersion remonte aux années 1940 (Bellon-Maurel V. 1992). Cette conception a contribué à répondre à l'utilisation de la spectroscopie infrarouge comme une technique d'analyse pour caractériser les composés organiques dans les laboratoires. La figure 17 représente le principe de fonctionnement des spectromètres dispersifs



**Figure 17: Schéma d'un spectromètre dispersif.**

Dans un spectrophotomètre dispersif, le faisceau lumineux incident passe par un disperser, qui

forme le spectre de cette lumière, pour irradier l'échantillon à analyser. Après l'interaction de la lumière et l'échantillon, deux modes sont possibles : La réflexion totale ou atténuée, dans le cas où le faisceau incident se réfléchit et la transmission quand la lumière traverse l'échantillon. Les faisceaux transmis ou réfléchis sont capturés par des capteurs, qui vont les convertir en signal pour obtenir le spectre IR.

### **2.5. Analyse des données Infrarouge :**

Les spectres IR sont riches en informations utiles qui expliquent les caractéristiques chimiques, physiques et biochimiques des échantillons analysés, néanmoins ces informations peuvent être parfois difficiles à extraire. L'utilisation des méthodes mathématiques, informatiques et d'analyse statistique multivariée constitue un outil, permettant l'extraction et l'exploitation de l'information cachée dans les spectres infrarouges.

Les méthodes spectroscopiques sont très employées pour l'analyse qualitative et quantitative des constituants de produits agroalimentaires (Bertrand D. et al., 2006). En général, quand les spectres sont bien clairs et non superposés, on peut calculer une concentration à partir de l'intensité du signal. Par contre, lors de l'analyse de matrices complexes, les signaux ne sont pas toujours bien définis. Par conséquent, il n'est pas facile d'identifier et de quantifier les différents constituants.

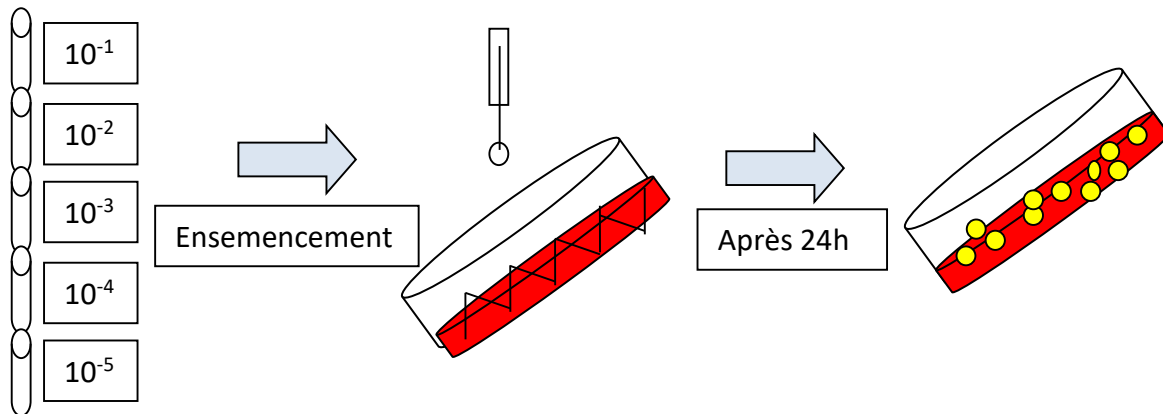
**DEUXIEME PARTIE :  
TECHNIQUES ET METHODES  
EXPERIMENTALES**

## I. Souches bactériennes :

### 1. Isolement et identification de *S.aureus* à partir de lait cru

Pour l'isolement de *Staphylococcus*, nous avons utilisé le milieu Chapman, milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre *Staphylococcus* (coques Gram + regroupés en amas).

L'ensemencement est fait à partir des différentes dilutions de l'inoculum (lait cru) dans le milieu Chapman par stries, et incubation dans l'étuve à température de 37°C, pendant 24h.



Après 24h, nous avons observé des colonies des *Staphylocoques* dont la couleur et le bombage différents. Nous avons prélevé six colonies, chacune est cultivée à nouveau dans le milieu Chapman pour confirmation.

### 2. Confirmation des *S. aureus* par le test catalase et ADNase :

#### 2.1. Test de catalase :

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

Si la bactérie possède la catalase, alors un dégagement gazeux est observé (Leyral et Vierling, 2007).

#### 2.2. Test d'ADNase :

- ✚ Le test est réalisé en boîte de Pétri contenant un milieu avec ADN et le bleu de toluidine.
- ✚ Chauffer 15 min à 100°C une culture de 24h en bouillon cœur-cervelle du *Staphylocoque* étudié. Laisser refroidir.
- ✚ Ensemencer par stries épaisses dans le milieu.
- ✚ Incuber pendant 4 h minimum à 37°C. L'apparition d'une teinte rose autour de la strie révèle la libération des polynucléotides résultants de l'hydrolyse de l'ADN du milieu.

Nous avons effectué le test de catalase et d'ADNase pour chaque souche isolée du lait cru.

### 2.3. Conditions de cultures :

Les souches utilisées au cours de cette étude étaient de genre *Staphylococcus aureus* isolées à partir du lait cru.

- Les bactéries sont incubées pendant 24 heures à 37°C dans le milieu liquide de Luria Bertani.
- Les bactéries sont incubées pendant 24 heures à 25°C dans le lait UHT (entier ou écrémé).
- Après 24 h de culture en milieu liquide les cellules mises dans une solution de KNO<sub>3</sub> à une force ionique de 0.1 M. Pour éliminer les résidus de milieu de culture, les cellules sont lavées par une succession de deux centrifugations (15 min à 8400g) et remises en suspension dans la solution de KNO<sub>3</sub>.

La densité optique de la suspension bactérienne est ajustée entre 0,7 et 0,8 à 405 nm (Hamadi and Latrache 2008).

NB : Après 24h, les bactéries développées dans le milieu laitier sontensemencées une autre fois dans le milieu Chapman pour la confirmation.

#### 2.3.1. Milieux de culture lait entier

Les six souches de *S. aureus* isolées à partir du lait cru, sont incubées pendant 24 heures à 25°C dans le lait entier.

#### 2.3.2. Milieux de culture lait écrémé :

Les six souches de *S. aureus* isolées à partir du lait cru, sont incubées pendant 24 heures à 25°C dans le lait écrémé.

## II. Caractérisation physico- chimiques de la surface des souches microbiennes :

### 1. Préparation des filtres :

10 ml de la suspension bactérienne sont déposés sur un filtre d'acétate de cellulose de 0.45µm (Sartorius), lavés préalablement par 10 ml d'eau distillée. Ensuite, ils sont filtrés jusqu'à l'obtention d'une couche mince de cellules bactériennes. Les filtres sont placés soigneusement sur un support et laissés sécher à température ambiante de 5 à 10 min.

### 2. Caractérisation physico-chimique des souches de *S. aureus*

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte d'un liquide déposée sur le support, avec sa surface. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre de surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.



- Si nous utilisons l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, nous pouvons déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.
- Si nous utilisons d'autres liquides comme le formamide et le diiodométhane, nous pouvons accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss (van Oss et al. 1988). Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact  $\theta$ . En pratique, une goutte de liquide des solvants est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser.

### III. Caractérisation physico-chimique des supports solides

#### 1. Traitements des supports par le lait UHT (entier et écrémé) :

Les supports du verre, polystyrène ; polyéthylène et des aciers inoxydables 304 et 316L sont nettoyés, avant de mesurer l'angle de contact, par trempage pendant 15 min dans une solution d'éthanol à 95 % suivi de six rinçages à l'eau distillée stérile et d'une stérilisation par autoclavage (15 min à 120°C). Trois à six mesures d'angle de contact ont été réalisées sur chaque échantillon en utilisant 3 solvants : eau distillée, formamide et diiodométhane pour l'étude des changements des propriétés de surface des supports de verre, polystyrène, polyéthylène et des aciers inoxydables par le lait UHT. Après le nettoyage des surfaces, celles-ci sont immergées dans 10 ml du lait entier ou écrémé selon le cas, pendant 3h suivi de six rinçages à l'eau distillée.

NB : Pour chaque support, 3 essais ont été réalisés à des temps différents.

#### 2. Verre

La surface solide sélectionnée pour cette étude est le verre de lame de microscope (Knittel Glazer, Germany). La surface est nettoyée, avant chaque essai d'adhésion, par une solution d'éthanol et l'eau distillée suivi d'une stérilisation.

#### 3. Acier inoxydable

Les deux types d'aciers utilisés dans notre étude sont les aciers AISI 316L et 304. Ils appartiennent à la classe des alliages austénitiques contenant du fer-chrome et nickel avec 12 à 30% de chrome et 7 à 30% de nickel. Dans notre étude, le type 316L contient du molybdène, absent de la composition du 304, qui lui confère une résistance accrue à la corrosion en milieu chloré. En dehors de cette différence, ils sont en tous points identiques. La série 300 (fer-chrome-nickel) est recommandée par l'Institut Américain du fer et de l'acier (AISI) pour les surfaces en contact avec les aliments (Sundgren et al., 1985 ; Hayashi et al., 1989).

Ces aciers sont généralement choisis pour leur prix abordable, leur bonne résistance mécanique, leur résistance accrue à la corrosion et également pour leur forte résistance à l'abrasion (Holah & Thorpe, 1990).

#### **4. Polystyrène**

Le polystyrène ou frigolite est le polymère de formule  $-n-$ , obtenu par polymérisation du monomère styrène  $\text{CH}_2=\text{CH-Ph}$ .

#### **5. Polyéthylène :**

Le polyéthylène (PE), ou polyéthène, désigne les polymères d'éthylène. Simples et peu chers à fabriquer, les PE constituent la matière plastique la plus commune, représentant avec 100 millions de tonnes, environ un tiers de l'ensemble des plastiques produits en 2018 et la moitié des emballages.

#### **6. Caractérisation physico-chimique des surfaces des supports par l'angle de contact**

Les supports du verre, polystyrène, polyéthylène et des aciers inoxydables 304 et 316L sont nettoyés, avant de mesurer l'angle de contact, par trempage pendant 15 min dans une solution d'éthanol à 95 % suivi de six rinçages à l'eau distillée stérile et d'une stérilisation par autoclavage (15 min à 120°C). Trois à six mesures d'angle de contact ont été réalisées sur chaque échantillon en utilisant 3 solvants : eau distillée, formamide et diiodométhane.

### **IV. Caractérisation énergétique des surfaces des supports solides et des souches bactériennes et estimation d'adhésion prédictive :**

Les caractéristiques énergétiques de la surface du verre (hydrophobicité, le caractère donneur d'électrons /accepteur d'électrons) sont déterminées à partir des mesures d'angle de contact par la méthode de la goutte posée avec un goniomètre (GBX).

Les angles de contact ont été réalisés avec trois liquides purs de caractéristiques énergétiques connues (tableau 7) : Eau, diiodométhane et formamide.

Tableau 7: Caractéristiques énergétiques de l'eau distillée, diiodométhane et formamide.

Liquide	$\gamma^{LW}$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ.m <sup>-2</sup> )
Eau (H <sub>2</sub> O)	21,6	25,4	25,4
Formamide (CH <sub>3</sub> NO)	38,7	2,3	39,4
Diiodométhane (CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> )	50,5	0,7	0,0

Les caractéristiques physico-chimiques de la surface sont obtenues à partir des mesures d'angles de contact à l'aide d'un goniomètre (GBX, France).

Les composantes de Lifshitz – Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) de verre ont été déterminées à partir de l'équation de Yong- Van Oss (1988) :

$$\cos \theta = -1 + 2 \cdot \frac{\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_s^{LW}}}{\gamma_L} + 2 \cdot \frac{\sqrt{\gamma_s^+ - \gamma_L^-}}{\gamma_L} + 2 \cdot \frac{\sqrt{\gamma_s^- - \gamma_L^+}}{\gamma_L}$$

### 1. Calcul de l'énergie de surface :

D'après Vogler (1998), la surface est considérée hydrophobe si  $\theta_w$  est supérieur à 65° et hydrophile si  $\theta_w$  est inférieur à 65°. Basé sur l'approche de (Van Oss et al., 1988a, Van Oss, 1995), il est possible de déterminer le degré d'hydrophobicité d'une substance (i) vis-à-vis de l'eau (w). Il est exprimé en unité internationale (mJ.m<sup>-2</sup>). La surface peut être classée hydrophile quand le  $\Delta G_{iwi}$  est positive et hydrophobe quand le  $\Delta G_{iwi}$  est négative.

L'énergie libre d'interaction entre les molécules de surface d'une substance(i) immergée dans l'eau (w) est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G_{iwi} = -2 \left( \left( \gamma_s^{LW} \right)^{1/2} \left( \gamma_w^{LW} \right)^{1/2} + \left( \gamma_s^+ \right)^{1/2} \left( \gamma_w^- \right)^{1/2} + \left( \gamma_s^- \right)^{1/2} \left( \gamma_w^+ \right)^{1/2} \right)$$

$\gamma^{LW}$  : Composante de Lifshitz- Van der Waals de la surface; i

$\gamma^{LW}$  : Composante de Lifshitz- Van der Waals de l'eau ; w

$\gamma^+$  : Composante d'accepteur d'électrons de la surface ; i

$\gamma^+$  : Composante d'accepteur d'électrons de l'eau ; w

$\gamma^-$  : Composante de donneur d'électrons de la surface ;

i : Composante de donneur d'électrons de l'eau.

## V. Adhésion prédictive de *S. aureus* sur les supports solides : Calcul de l'énergie libre d'interaction totale

L'adhésion prédictive des bactéries aux différents supports est déterminée par le calcul d'énergie libre d'interaction totale ( $\Delta G_{BLS\ TOT}$ ) entre une bactérie (B) et un support (S) dans un liquide (L). Elle est considérée comme la somme de trois énergies ; énergie de Van der Waals ( $\Delta G_{BLS\ LW}$ ), énergie acido-basique ( $\Delta G_{BLS\ AB}$ ) et énergie électrostatique ( $\Delta G_{BLS\ EL}$ ).

Ces trois énergies sont calculées selon les équations suivantes :

$$\Delta G_{BLS\ TOT} = \Delta G_{BLS\ EL} + \Delta G_{BLS\ LW} + \Delta G_{BLS\ AB}$$

$$\Delta G_{LW} = ((\gamma_{BLW})^{1/2} - (\gamma_{SLW})^{1/2})^2 - ((\gamma_{BLW})^{1/2} - (\gamma_{LLW})^{1/2})^2 - ((\gamma_{SLW})^{1/2} - (\gamma_{L\ LW})^{1/2})^2$$

$$\Delta G_{AB} = 2[(\gamma_{L^+})^{1/2} [(\gamma_{B^-})^{1/2} + (\gamma_{S^-})^{1/2} - (\gamma_{L^-})^{1/2}] + (\gamma_{L^-})^{1/2} [(\gamma_{B^+})^{1/2} + (\gamma_{S^+})^{1/2} - (\gamma_{L^+})^{1/2}] - (\gamma_{L^-} \gamma_{S^+})^{1/2} - (\gamma_{L^+} \gamma_{S^-})^{1/2}]$$

$\Delta G_{EL}$  : est négligeable car les tests de l'adhésion sont réalisés à une force ionique élevée (Gallardo-Moreno et al. 2002).

Le calcul de  $\Delta G_{tot}$  permet de juger théoriquement si l'adhésion d'une bactérie sur une surface donnée est possible ( $\Delta G_{tot} < 0$ ) ou impossible ( $\Delta G_{tot} > 0$ ).

## VI. Analyse des surfaces des supports par infrarouge (MIR)

Un spectrophotomètre Bruker "Vector 22" équipé d'un détecteur DTGS, d'une source Globar (IR) et d'un séparateur de Germanium KBr, a été utilisé pour enregistrer les spectres MIR de supports en verre, polystyrène, polyéthylène et acier inoxydable 316L et 304 traités avec deux types de lait UHT. Les échantillons ont été scannés 98 fois dans la plage spectrale de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $600\text{ cm}^{-1}$  avec une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$ . La référence a été mesurée avant l'analyse de chaque échantillon. Les surfaces sont placées directement sur la surface centrale du diamant. Les mesures sont effectuées à température ambiante. Le logiciel utilisé dans cette étude permet l'acquisition automatique des spectres sans aucune forme de manipulation informatique pouvant affecter la qualité des résultats. La transformée de Fourier est automatiquement calculée par le logiciel avant l'acquisition des spectres. La plaque ATR est nettoyée avec

une solution d'éthanol, ce qui lui permet de sécher. La propreté a été vérifiée en prenant un spectre de référence et en le comparant avec le spectre de référence précédent.

## VII. L'adhésion microbienne de *S. Aureus* sur les surfaces solides

### 1. Préparation des suspensions bactériennes

Les cellules bactériennes sont suspendues dans une solution de  $\text{KNO}_3$  à 0,1M et ajustées à une densité optique entre 0,7 et 0,8 (approximativement  $10^8 \text{ CFU.ml}^{-1}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre à 405 nm (Hamadi et al. 2005).

### 2. Test d'adhésion sur le verre

#### 2.1. Adhésion des souches de *Staphylococcus aureus* sur le verre :

Pour chaque essai, six flacons contenant la même quantité de lait (50 ml de lait écrémé ou entier) sont numérotés de 1 à 6. Dans chaque flacon une souche de *staphylococcus aureus* estensemencée dans le milieu LB. Les six flacons sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

Après 24h d'incubation, une dissemblance de phases apparait, une phase liquide et une autre solide. Les phases liquides (surnageant) des six souches sont soumises à une centrifugation (15 min à 8400g) après récupération des culots. Les cellules sont lavées deux fois par la solution de  $\text{KNO}_3$  0,1M.

#### 2.2. Adhésion de *Staphylococcus aureus* au verre traité par deux types de lait UHT :

On ajuste la densité optique des suspensions obtenues jusqu'à l'obtention d'une valeur entre 0.7 et 0.8 à 405nm. Les lames de verre traitées par les deux types de lait (entier et écrémé) sont immergées dans la suspension bactérienne pendant 30min, 1h, 1h30, 2h, et 2h30min à 25°C. À la fin de chaque temps de contact les lames sont rincées trois fois avec de l'eau distillée pour éliminer les cellules non adhérentes.

#### 2.3. Réalisation de la coloration de gram de *S. aureus* adhérent au verre traité par les deux types de lait :

La coloration de gram dans cette étude nous a permis de colorer les bactéries adhérentes. Cette coloration a été réalisée selon le protocole suivant :

- Coloration des lames par le cristal violet suivie d'un rinçage ;
- Fixation par le lugol suivie d'un rinçage ;
- Décoloration par une solution d'alcool-acétone suivie d'un rinçage ;
- Coloration par la fuchsine suivie d'un rinçage.

#### 2.4. Quantification de l'adhésion des bactéries par le logiciel Matlab® :

La quantification de l'adhésion est réalisée à l'aide d'un programme développé sur le logiciel Matlab v.7.1 par l'équipe de recherche du Laboratoire de bioprocédés et bio-interfaces de la faculté des sciences et techniques de Beni Mellal (Hamadi et al. 2005).

Les images microscopiques obtenues sont converties en images de 256 niveaux de gris et sont traitées afin d'établir un histogramme représentant le nombre de pixels en fonction de leur intensité. Dans ce traitement, l'intensité 0 est attribuée à un pixel noir, alors qu'un pixel blanc correspond à l'intensité 255. Les zones correspondant à la colonisation des microorganismes sont facilement détectées par rapport à l'image originale.

### **3. Test d'adhésion des souches de *Staphylococcus aureus* au polystyrène :**

Le test d'adhésion a été réalisé par la préparation de la suspension bactérienne de densité optique d'environ 0.7 à 0.8 (pour avoir approximativement  $10^8$  UFC/ml) et la mise en contact avec les deux supports par remplissage des puits de la plaque ELISA par environ 180  $\mu$ l de la suspension bactérienne. L'adhésion des cellules a été conduite dans un liquide de force ionique ( $\text{KNO}_3$  0.1 M) et dure 3 heures. Ensuite, les cellules non adhérentes ont été éliminées par trois rinçages à l'eau distillée (Briandet et al. 1999).

Pour la révélation des résultats de l'adhésion sur le polystyrène, les contenus des puits de la plaque ELISA sont vidés, et la lecture se fait par le **lecteur ELISA** qui affiche les valeurs de la DO pour chaque puits.

#### **3.1. Quantification de l'adhésion bactérienne par les microplaques :**

Dix millilitres de suspension bactérienne contenant  $10^8$  CFU /ml ont été incubés dans une boîte de Pétri contenant un coupon de verre traité avec du lait (entier ou écrémé) pendant 3 h à 25°C. Après cette incubation de 3 h à 25°C, les coupons ont été ensuite rincés trois fois avec de l'eau distillée stérilisée pour éliminer les bactéries non adhérentes.

***TROISIEME PARTIE :***  
**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

*Chapitre I :*  
**Études des caractéristiques physicochimiques des  
surfaces bactériennes et des supports solides par  
la méthode de l'angle de contact**



## I. Introduction :

Les propriétés physico- chimiques de la surface bactérienne sont impliquées dans plusieurs phénomènes interfaciaux comme l'adhésion microbienne et la formation des biofilms (van der Mei et al. 1995). Ces propriétés comprennent l'hydrophobicité, la charge électrostatique et le caractère donneur d'électrons / accepteur d'électrons.

L'hydrophobicité peut être déterminée par plusieurs méthodes comme l'angle de contact, l'adhésion microbienne aux hydrocarbures (MATH) (G.I.Geertsema-Doornbusch et al., 1993), l'adhésion microbienne aux solvants (MATS) (Bellon Fontaine et al., 1997) l'agrégation par les sels, partage entre phases aqueuses non miscibles polyéthylène glycol et dextran (PEG/DEX) (M. Lindah et al., 1981) et chromatographie d'interactions hydrophobes (A.T. Stenstrom et al., 1989). Par contre, le caractère donneur d'électrons et le caractère accepteur d'électrons peuvent être déterminé par trois méthodes : l'angle de contact, l'adhésion microbienne aux solvants (MATS) (Bellon-Fontaine et al. 1996) et la titration (Y. Hong et al., 2006).

La méthode de l'angle de contact est une technique rapide, utilisée pour la détermination l'hydrophobicité, et les propriétés acido-basiques de Lewis (le caractère donneur d'électrons /accepteur d'électrons) (Busscher et al. 1984) .

L'industrie laitière, comme toutes les industries agroalimentaires sont soumises à des sévères exigences en matière d'hygiène afin de lutter contre la prolifération indésirable de micro-organisme (bactérie et moisissure). *Staphylococcus aureus* est un facteur de toxi-infection alimentaires; Cette bactérie comme les autres pathogènes possède également la capacité d'adhérer à une grande variété de support, entre autre les surfaces utilisés en procédé agroalimentaire (Hood and Zottola., 1997).

Dans le cadre d'intervenir dans la compréhension de ce phénomène, le but de ce chapitre consiste à étudier les propriétés physico- chimiques de la surface de *Staphylococcus aureus* isolée du lait cru.

## II. Isolement et identification de la communauté bactérienne.

### 1. Isolement et purification

L'ensemencement du lait cru sur le milieu LB, nous a permis d'isoler 30 souches dont la couleur, et la morphologie sont différents.

Le repiquage répété sur Milieu Chapman a permis de purifier six souches de *Staphylococcus aureus*. Nous considérons comme positifs, les prélèvements qui, après culture sur Chapman, montrent la caractérisation coloniale de *Staphylococcus aureus* : colonies jaunes doré, bombées, arrondies, opaques, de petite taille 1 à 2 µm de diamètre, dégradant le mannitol en acide lactique (abaissement du pH = acidification du milieu : virage du milieu au jaune).

### 2. Confirmation des *S.aureus* par le test catalase et DNase :

On a effectué le test de catalase et DNase pour chacune de six souches purifiées du lait cru, les résultats sont présentés dans le tableau 8

Tableau 8: Résultats des tests catalase et DNase de 6 souches purifiées du Lait cru

SOUCHE	TEST CATALASE	TEST DNASE
Staph1	+	+
Staph2	+	+
Staph3	+	+
Staph4	+	+
Staph5	+	+
Staph6	+	+

✓ Les 6 souches sont catalase positif et DNase positive

## III. Caractérisation physicochimique des surfaces bactériennes de *Staphylococcus aureus* isolées à partir lait CRU

La détermination des propriétés physicochimiques a été effectuée pour six souches de *Staphylococcus aureus*, chacune est cultivée dans trois milieux de cultures : milieu LB, le lait entier, et le lait écrémé.

Dans ce chapitre on s'est intéressé à étudier les propriétés physico- chimiques de la surface cellulaire de *Staphylococcus aureus* isolée à partir lait cru ainsi de savoir l'effet de milieu de culture sur ses propriétés.

Les résultats de la mesure de l'angle de contact, des composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), des composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) de la surface des 6 souches de *S. aureus* cultivées dans 3 milieu de culture sont présentés dans le tableau 9 :

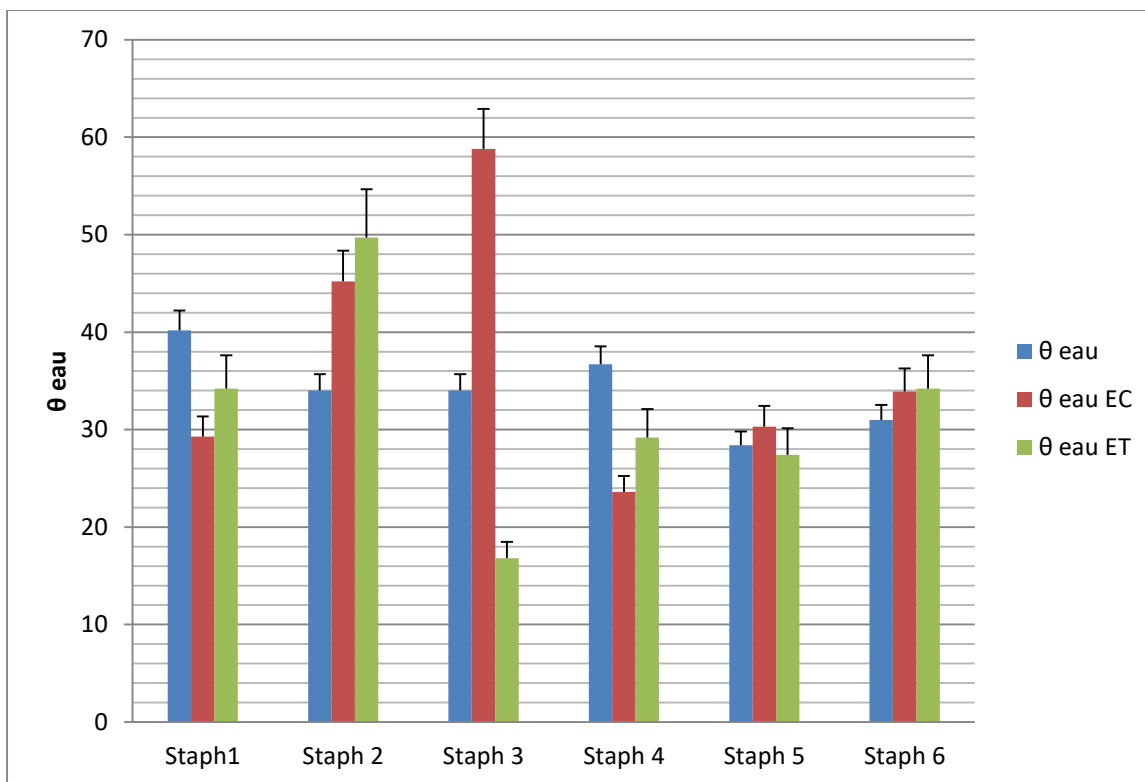
Tableau 9: Mesures de l'angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) des 6 souches de *S.aureus* cultivé dans le milieu LB ; le lait entier (ET) et ecremee (EC)

Souches	Angle de contact			Energie de surface (mJ.m <sup>-2</sup> )			$\Delta G_{iwi}$ (mJ.m <sup>-2</sup> )
	Diio.	Form.	Eau	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	
<b>Staph1</b>	87.3	53.5	40.2	14.5	6	56.2	24
<b>Staph 2</b>	80.5	57.7	34	17.2	2.1	68.2	45.7
<b>Staph 3</b>	93.8	41.6	34	11.1	9.4	49.1	12.1
<b>Staph 4</b>	67.9	59.7	36.7	27	0	66.6	62.3
<b>Staph 5</b>	67	33.4	28.4	24.1	5	58	28.8
<b>Staph 6</b>	79.5	40.1	31	20.5	3.4	54.8	30.2
<b>Staph EC1</b>	62,8	25,1	29,3	27	4,1	44,4	18,97
<b>Staph EC2</b>	64,5	40	45,2	26	2,8	35	11,39
<b>Staph EC3</b>	86,9	20,6	58,8	14,1	20	9	-6,22
<b>Staph EC4</b>	63,8	26,3	23,6	41,2	0,4	52,5	32,61
<b>Staph EC6</b>	69,6	29,6	30,3	23,1	4,9	45,7	19,39
<b>Staph EC 6</b>	75	29,7	33,9	20,1	6,9	41,3	13,33
<b>Staph ET1</b>	62,6	22,2	34,2	27,1	5	37,4	11,44
<b>Staph ET2</b>	63	51,3	49,7	26,9	0,7	38,8	19,41
<b>Staph ET3</b>	71,4	27,5	16,8	22,1	4,9	56,8	28,21
<b>Staph ET4</b>	39,2	21,9	29,2	40	1	44	11,44
<b>Staph ET5</b>	82,5	18,5	27,4	16,2	11,8	41,6	8,27
<b>Staph ET6</b>	49,2	33,8	34,2	34,7	0,9	45,6	24,94

- ✓ Les résultats indiqués dans le tableau 9 nous permettent de déterminer l'hydrophobicité qualitative et quantitatives et le caractère donneur/accepteur d'électron

**a) Hydrophobicité qualitative de 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans les 3 milieux de culture (LB, le lait entier, et le lait écrémée)**

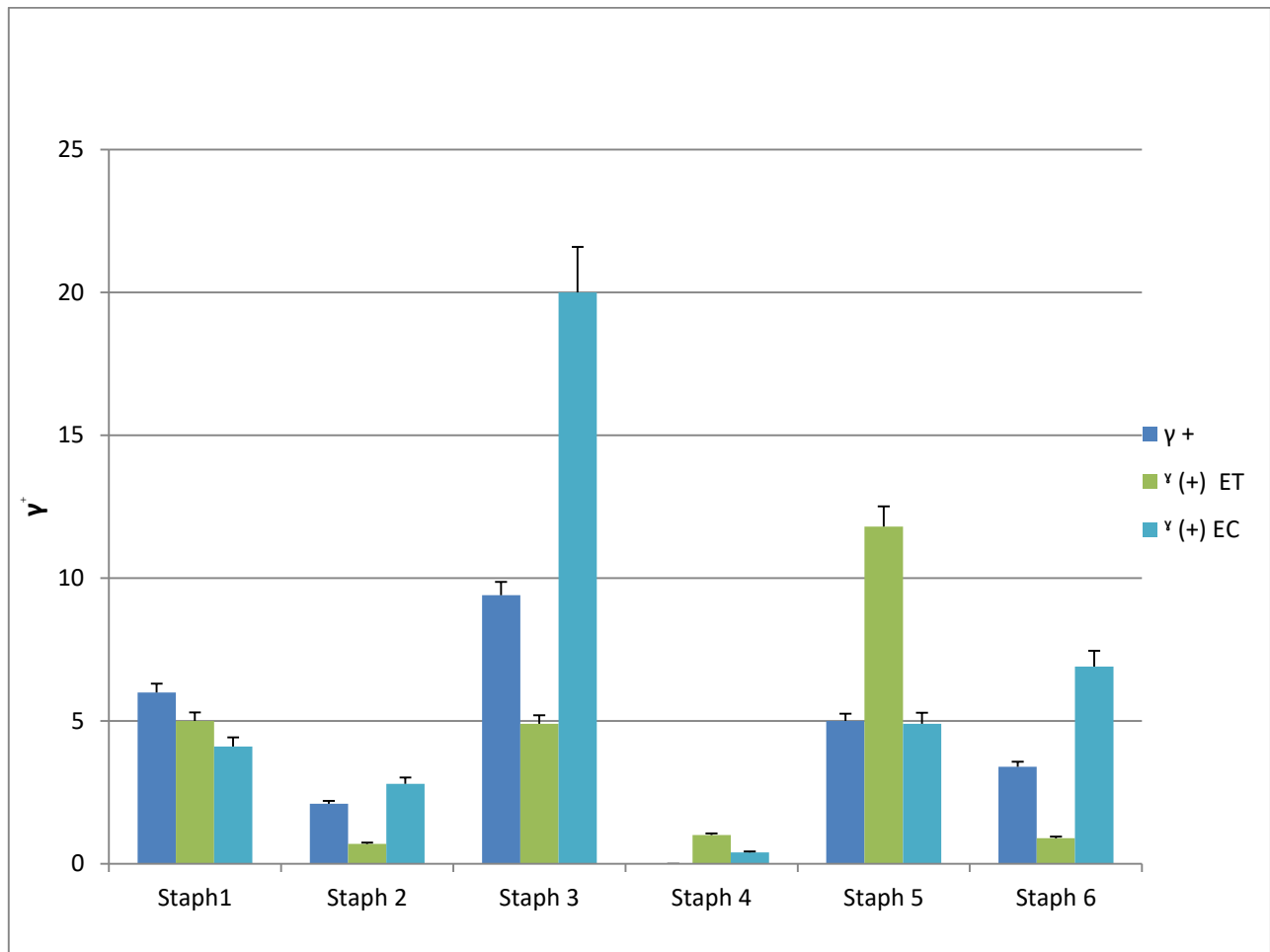
La figure 18 présente les résultats de  $\theta$  eau des 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et le lait écrémée



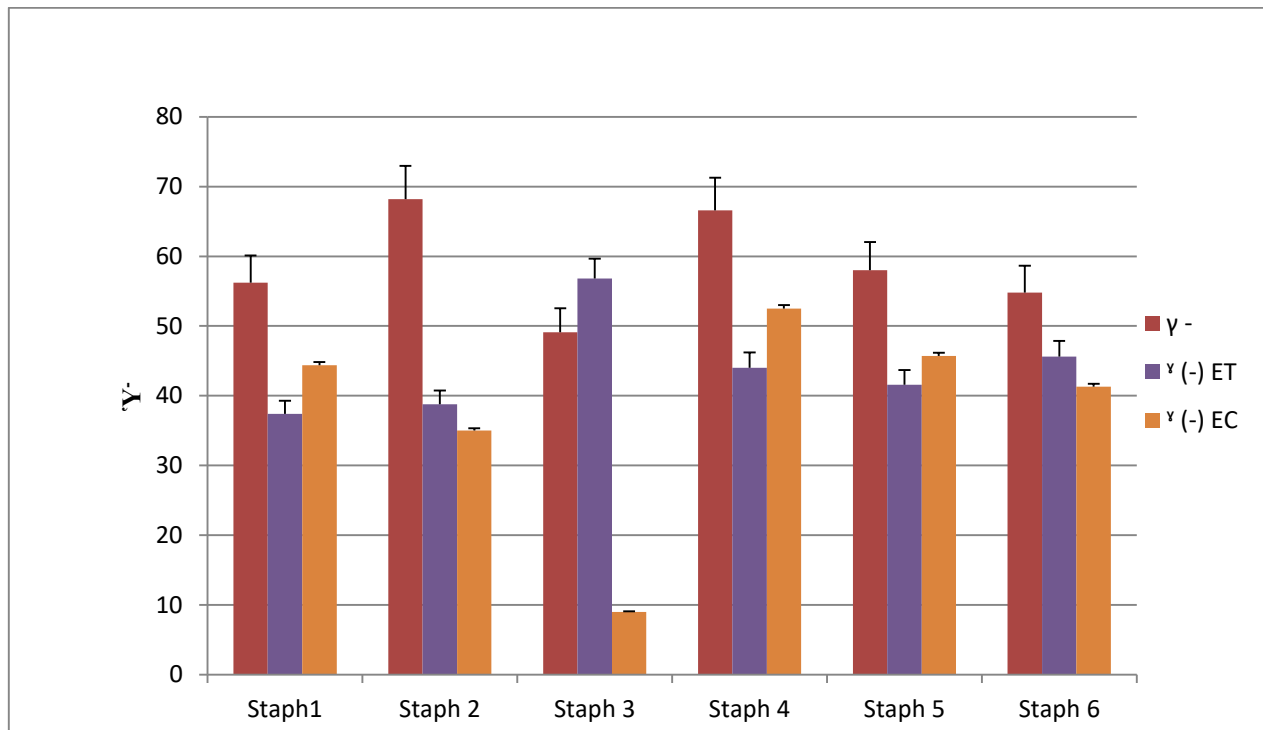
**Figure 18: hydrophobicité qualitative de six souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et écrémée.**

**b) Caractères donneur/accepteur d'électrons des 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans les 3 milieux de culture (LB, le lait entier, et le lait écrémée)**

Les figure 19 et 20 présente les résultats des caractères donneur/accepteur d'électrons des 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et le lait écrémée.



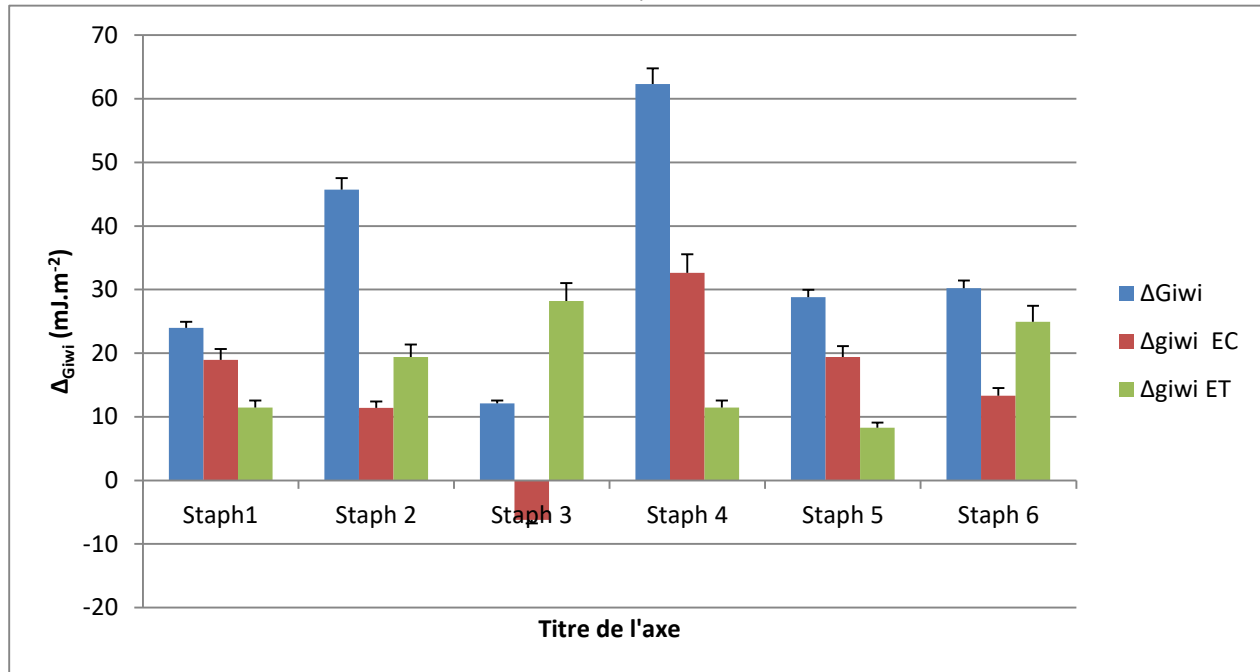
**Figure 19: Caractères accepteur d'électrons de six souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et ecremee**



**Figure 20: Caractères donneur d'électrons de six souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et écrémée**

**C) L'énergie libre  $\Delta G_{iwi}$  (mJ.m<sup>-2</sup>) des 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans les 3 milieux de culture (LB, le lait entier, et le lait écrémée)**

La figure 21 présente l'énergie libre  $\Delta G_{iwi}$  (mJ.m<sup>-2</sup>) des 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et le lait écrémée.



**Figure 21 : Energie libre de surface  $\Delta G_{iwi}$  (mJ.m<sup>-2</sup>) de six souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB, le lait entier et écrémé**

- Les 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le milieu LB ont un  $\theta_{eau}$  allant de 28,4° à 40,2° annonçant un caractère hydrophile de point de vue qualitatif. Quantitativement les six souches avèrent du 12,1 mJ.m<sup>-2</sup> jusqu'au 62.3 mJ.m<sup>-2</sup>
- Les 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le lait UHT **écrémé** ont un  $\theta_{eau}$  allant de 23,6° à 58,8° annonçant un caractère hydrophile de point de vue qualitatif. Quantitativement 5 souches avèrent du 23,6 mJ.m<sup>-2</sup> jusqu'au 58,8 mJ.m<sup>-2</sup> annonçant un caractère hydrophile sauf la 3<sup>ème</sup> qui est hydrophobe.
- Les 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru et cultivées dans le lait UHT **entier** ont un angle de contact ( $\theta_{eau}$ ) allant de 6,2° à 49,7° annonçant un caractère hydrophile de point de vue qualitatif. Quantitativement les six souches avèrent du 8,27 mJ.m<sup>-2</sup> jusqu'au 28,21 mJ.m<sup>-2</sup> annonçant un caractère hydrophile.

De point de vue qualitatif, les surfaces des 6 souches étudiées quel que soit le milieu de culture (LB, le lait entier ou écrémé), présentent un caractère hydrophile ( $\theta_{eau} < 65^\circ$ ) (Vogler, 1998).

De point de vue quantitatif, les résultats du tableau 9 montrent que toutes les souches présentent un caractère hydrophile ( $\Delta G_{iwi} \geq 0$ ), à l'exception de la souche 3 cultivée dans le lait écrémé qui est relativement hydrophobe ( $\Delta G_{iwi} \leq 0$ ).

A la lumière des résultats obtenus (tableau 9), nous constatons que toutes les six souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru cultivées dans le milieu LB présentent un caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) bien remarquable et un caractère accepteur d'électrons faible. En remplaçant le milieu de culture LB par Le lait UHT entier ou écrémé, le caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) des 6 souches a diminué, surtout pour la souche 3 cultivée dans le lait écrémé (Staph EC3) (tableau 9). Toutes les souches expriment des valeurs faibles à négligeables de  $\gamma^+$ , à l'exception de la souche 3 cultivée dans le lait écrémé (Staph EC3) qui présente un caractère accepteur d'électron d'élévé.

#### IV. Discussions :

Au cours de cette étude nous avons utilisé la méthode de l'angle de contact afin de déterminer et de montrer les caractéristiques physico-chimiques de la surface de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru, qui va nous servir à expliquer l'aptitude de ces souches à adhérer aux surfaces.

D'une part les résultats obtenus montrent, que la surface de toutes les souches de *Staphylococcus aureus* présente un caractère qualitativement hydrophile. D'autre part le calcul de l'énergie libre d'adhésion  $\Delta G_{iwi}$  présente des valeurs positives donc, quantitativement hydrophile, sauf la souche *Staphylococcus aureus* 3 cultivée dans le lait écrémé. Toutes les souches présentent un caractère donneur d'électron ( $\gamma^-$ ) très remarquable, contrairement au caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ ) où on a remarqué qu'il est plus ou moins faible. Aussi la surface des *Staphylococcus aureus* génère des interactions de Van Der waals ( $\gamma^{LW}$ ) moyennes.

Le caractère hydrophile de *Staphylococcus aureus* a été confirmé par beaucoup de travaux (Dickson and Koohmaraie 1989)(Hamadi et al. 2009a)(Merghni et al. 2015), où ils ont utilisé différentes méthodes citant par exemple : l'angle de contact et l'adhésion à l'Hexadecan, la méthode de MATS, (Merghni et al. 2015) qui ont montré que l'affinité de *Staphylococcus aureus* à l'hexa-décane était très faible. Nous avons observé également que le degré d'hydrophobicité et de caractère donneur d'électrons et le caractère accepteur d'électrons change au sien de mêmes souches. Ceci est en accord avec les résultats trouvés par Teixeira et al., (2005) lorsqu'ils ont déterminé l'hydrophobicité de 10 souches de *P. aeruginosa*, par la mesures d'angle de contact et



ils ont observé, que chaque souche présente des degrés différents d'hydrophobicité, et que celle-ci change entre les souches de la même espèce.

Les mêmes observations ont été notées par Van der Mei et al., (1998) lors de l'étude de 142 isolats de diverses espèces parmi eux *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus spp*, *Entérocoques* et les *streptocoques*. Ils ont démontré qu'aucun constat clair n'a été noté pour les propriétés physicochimiques de surface entre les souches étudiées. De plus, les mêmes résultats ont été trouvés par Flint et al., (1997) lorsqu'ils ont déterminé l'hydrophobicité de 12 souches de *Streptocoques*, et ils ont observé que chaque souche de *Streptocoques* étudiée, à un degré d'hydrophobicité différent de l'autre.

Les résultats obtenus montrent également que les 6 souches de *Staphylococcus aureus* expriment différentes propriétés physicochimiques. Ceci pourrait être dû à la composition chimique de la surface cellulaire de chaque groupe. Plusieurs travaux ont montré que l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact, est directement corrélée avec le rapport élevé des concentrations de N/C et inversement corrélée avec celui des concentrations de O/C (Mozes et al. 1989)(Mozes et al. 1988)(Cowan et al. 1992)(Cuperus et al. 1993)(Latrache et al. 1994)(van der Mei and Busscher 1997)(Dufrière and Rouxhet 1996)(Latrache et al. 2002). Ces résultats indiquent que l'origine de l'hydrophobicité mesurée par l'angle de contact est liée aux groupements contenant l'azote. Par ailleurs, l'origine de l'hydrophilicité est liée à la présence des groupements contenant l'oxygène.

. Les résultats montrent aussi que les souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans les 3 milieux (milieu LB, milieu lait UHT entier, et milieu UHT écrémée) annoncent un caractère donneur d'électrons très remarquable, Ces résultats peuvent être expliqués par la relation qui existe entre la composition chimique de la surface cellulaire et le caractère donneur d'électrons et le caractère accepteur d'électrons. Dans ce sens, Hamadi et al. (2012) ont étudié la relation entre la composition chimique de la surface d'*Escherichia coli*, le caractère donneur d'électrons et le caractère accepteur d'électrons. Ils ont trouvé que le caractère donneur d'électrons est corrélé à la présence de groupements phosphates et le caractère accepteur d'électrons est corrélé à la présence de groupements amines. Ils ont montré aussi que la présence d'une concentration élevée de polysaccharides semble être responsable de valeur élevée du caractère accepteur d'électrons. Les travaux de (Briandet et al. 1999)(Pelletier et al. 1997), ont montré que le caractère donneur d'électron est attribué à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire. Ainsi

que le caractère accepteur d'électrons est à l'origine de la présence des groupements acides exposés à la surface cellulaire.

### V. Conclusions :

Dans ce travail, nous avons pu isoler des souches bactériennes du lait cru ~~sur un milieu de culture LB.~~

La culture sur milieu Chapman nous a permis de sélectionner 6 souches de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats positifs des tests DNase et CATALASE ont confirmés que ces 6 souches sont bien des *Staphylococcus aureus*.

L'étude des propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, caractère donneur / accepteur d'électrons) des bactéries de *Staphylococcus aureus* cultivées dans différents milieux de culture (LB, lait entier et lait écrémé). Il apparait que :

- Le lait a un pouvoir remarquable de modifier l'hydrophobicité des surfaces bactériennes,
- Quel que soit le milieu de culture les six souches présentent un caractère donneur d'électrons très remarquable,
- L'énergie libre d'adhésion  $\Delta G_{iwi}$  présente des valeurs positives donc, quantitativement hydrophile, sauf la souche 3 cultivée dans le lait écrémé.



*Chapitre II :*

**Physico-chimie et chimie des surfaces de 5 supports  
solide conditionnés par le lait UHT**

## I. Introduction :

L'adhésion bactérienne à des supports solides est un phénomène indésirable qui conduit à la formation des biofilms bactériens. En effet, la colonisation des surfaces des équipements de travail par des bactéries pathogènes peut être une source majeure de contamination alimentaire et de toxi-infections. Cela pourrait entraîner des graves problèmes de santé publique et une dégradation de la qualité organoleptique, nutritionnelle et microbiologique du produit.

Dans l'environnement de la transformation alimentaire, il est admis que l'adhésion microbienne est généralement soutenue par l'adsorption de molécules organiques et inorganiques formant un film de conditionnement sur les surfaces de l'équipement.

De nombreux travaux s'intéressent à prévenir ou limiter le bio-encrassement sur diverses surfaces. La modification des propriétés des surfaces est donc un moyen approprié pour parvenir à une meilleure gestion de l'encrassement. La plupart d'entre eux concernent des revêtements de divers matériaux, qui peuvent être classés approximativement en fonction de leur mouillabilité et qui traitent le problème de l'encrassement par différents mécanismes. Tout d'abord, les revêtements hydrophiles tels que les brosses polymères ou les hydrogels impliquant des polymères neutres (Caro et al., 2009)(Khalil et al. 2014)(Liu et al. 2014) ou chargés (McArthur et al., 2000) (Shi et al., 2011 Wu et al., 2015) hautement hydratables ont d'excellentes propriétés protéo-répulsives. Leur capacité à lier étroitement les molécules d'eau dans des structures bien organisées leur permet d'agir comme une barrière et de protéger le substrat contre l'adsorption de protéines (Krishnan et al. 2008)(Mérian and Goddard 2012). D'autre part, les modifications des surfaces hydrophobes, qui impliquent généralement des composés à base de silicone (Khorasani et al., 2005 ; (Nwankire et al. 2009)(Fang et al. 2010) ou des composés fluorés (Barish et Goddard, 2013 (Molena et al. 2014)(Oldani et al. 2015). En outre, les surfaces biomimétiques 3D, telles que les surfaces de type lotus, sont de plus en plus étudiées pour leur potentiel auto nettoyant (Mérian and Goddard 2012)(Ragesh et al. 2014) induit par leur rugosité particulière à double échelle (c'est-à-dire une microrugosité supportant des saillies à l'échelle nanométrique) combinée à une faible énergie de surface (Yan et al. 2011). La connaissance des bases physicochimiques de la bio-contamination des surfaces pourrait permettre de prévoir la contamination microbiologique.

Les méthodes spectroscopiques sont largement utilisées pour l'analyse qualitative et quantitative des constituants des produits agroalimentaires. La méthode de couplage de la spectroscopie MIR (Medium Infrared Spectroscopy) et PLS (Partial Least Squares Regression) est également appliquée pour déterminer le profil des acides gras dans le lait (Ferrand et al. 2011).

L'objectif de ce chapitre est d'étudier, par la méthode de l'angle de contact, l'effet du film conditionnant formé par le lait UHT (entier, écrémé), sur les Propriétés physicochimique des surfaces de l'acier inoxydable, le verre, le polyéthylène et le polystyrène, et par la suite d'évaluer les détails moléculaires potentiels de ce film conditionnant par la méthode de SI spectroscopie infrarouge.

## II. Caractéristiques physico-chimiques des supports traités et non traités avec deux types de lait UHT :

Dans la première partie de ce chapitre on va procéder à la caractérisation des supports traités et non traités avec deux types de lait UHT par la méthode de l'angle de contact.

### 1. Propriétés physico-chimiques les supports solides non traités :

Le tableau 10 présente les résultats de l'angle de contact des surfaces de l'acier inoxydable, le verre, le polyéthylène et le polystyrène.

Tableau 10: Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma_{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) des différents supports

support	Contact angles (°)			Surface tension :			$\Delta G_{iwi}$ ( $mJ m^{-2}$ )
	$\theta$ diométhane	$\theta$ formamide	$\Theta$ water	$\gamma$ (LW)	$\gamma$ (+)	$\gamma$ (-)	
acier inoxydable 304	58,6	63	102,5	27,3	2,5	1,1	-55,9
acier inoxydable 316l	60	69	62	27	0,3	27,8	3,6
surface polyéthylène	88,3	83,3	86,9	13,5	0,4	12,6	-28,2
surface polystyrène	54,8	92,2	97,3	31,5	3,4	8,7	-28,6
surface verre	46,4	45,8	36,5	36,3	0	54	42,7

De point de vue qualitatif et quantitative Les trois supports de l'acier inoxydable 304, le polyéthylène et le polystyrène sont relativement hydrophobes [( $\Theta_w$  (102,5), (86,9), (97,3) et  $\Delta G_{iwi}$  (-55,9) (-28,2) (-28,6)]. Le verre et l'acier inoxydable 316L sont hydrophiles ( $\Theta_w$  (36,5), (62) et  $\Delta G_{iwi}$  (42,7), (3,6)).

### 2. Propriétés physico-chimiques des supports solides traités par deux types de lait UHT :

Le tableau 11 présente les résultats de l'angle de contact des surfaces de l'acier inoxydable, le verre, le polyéthylène et le polystyrène traités par deux types du lait entier et écrémé.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 11: Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) des différents supports traités par deux types du lait UHT(entier et écrémé) :

support	Contact angles (°)			Surface tension: components and parameters (mJ m <sup>-2</sup> )			$\Delta G_{iwi}$ (mJ m <sup>-2</sup> )
	$\theta$ diiométhane	$\theta$ formamide	$\theta_{water}$	$\gamma^{(LW)}$	$\gamma^{(+)}$	$\gamma^{(-)}$	
Polyet_ecrem	65,2	109,8	101,4	25,6	8,7	16,4	-8,6
Polyet_entier	96,2	122,4	118,3	10,1	2,6	6,1	-39,6
Verre_ecrem	63,9	70,7	82,1	26,3	0,1	10,1	-35,6
Verre_entier	54,7	89,7	95,1	31,6	2,8	9,3	-28,7
A316l_ecrem	73,7	25,2	85,9	20,9	0,7	7,2	-39,6
A316l_entier	76,1	59,7	82,6	19,5	4,3	3,9	-36,5
A304_entier	86,7	75,2	107,1	14,2	4,8	0,3	-52,7
A304_ecrem	66,1	83,6	66	14,5	0,1	40,2	23,2
Polys_entier	74	95,4	64	20,7	1,5	13,3	-21,3
Polys_ecrem	59	85,1	51,1	29,2	6,8	87,4	40,8

Tous les supports étudiés traités par les deux types de lait annoncent un caractère hydrophobe ( $\theta_w$  de 66 à 118,3 et  $\Delta G_{iwi}$  de -21,3 à -52,7), sauf l'acier inoxydable 304 et le polystyrène après traitement par le lait écrémé présentent un caractère quantitativement hydrophile ( $\Delta G_{iwi}$  (23,2) et (40,8)).

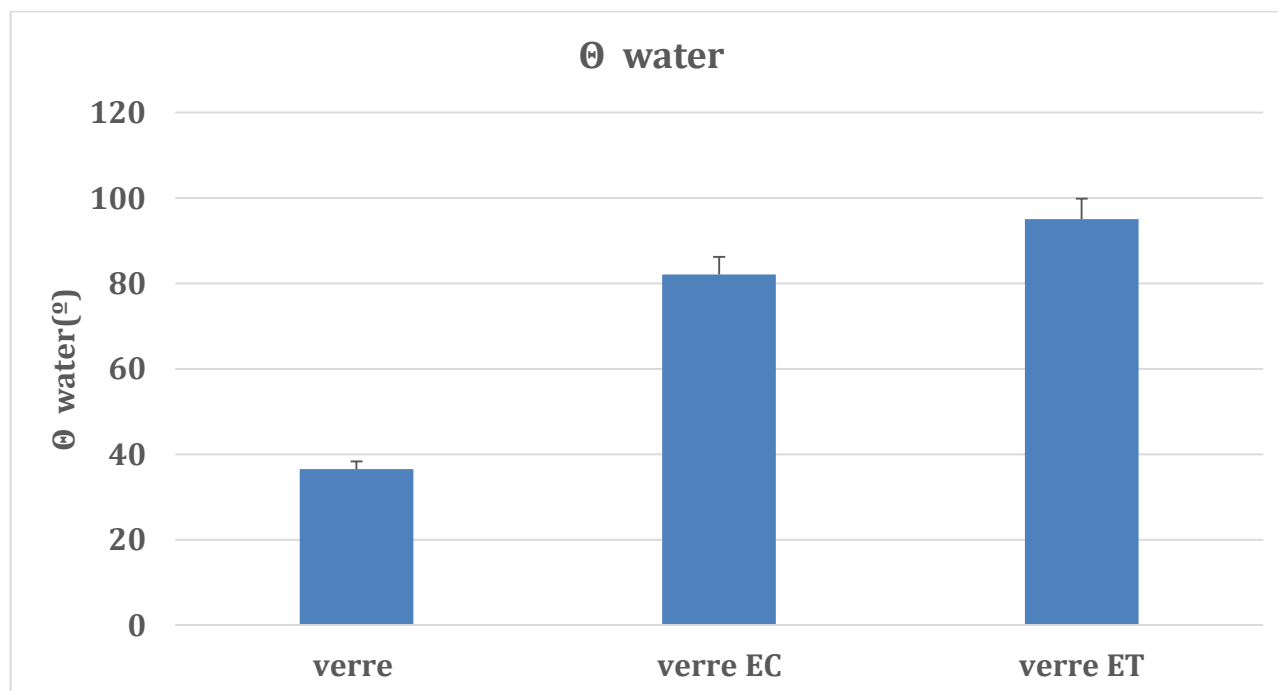


Figure 22: l'hydrophobicité du verre traité par deux types UHT (entier et écrémé)

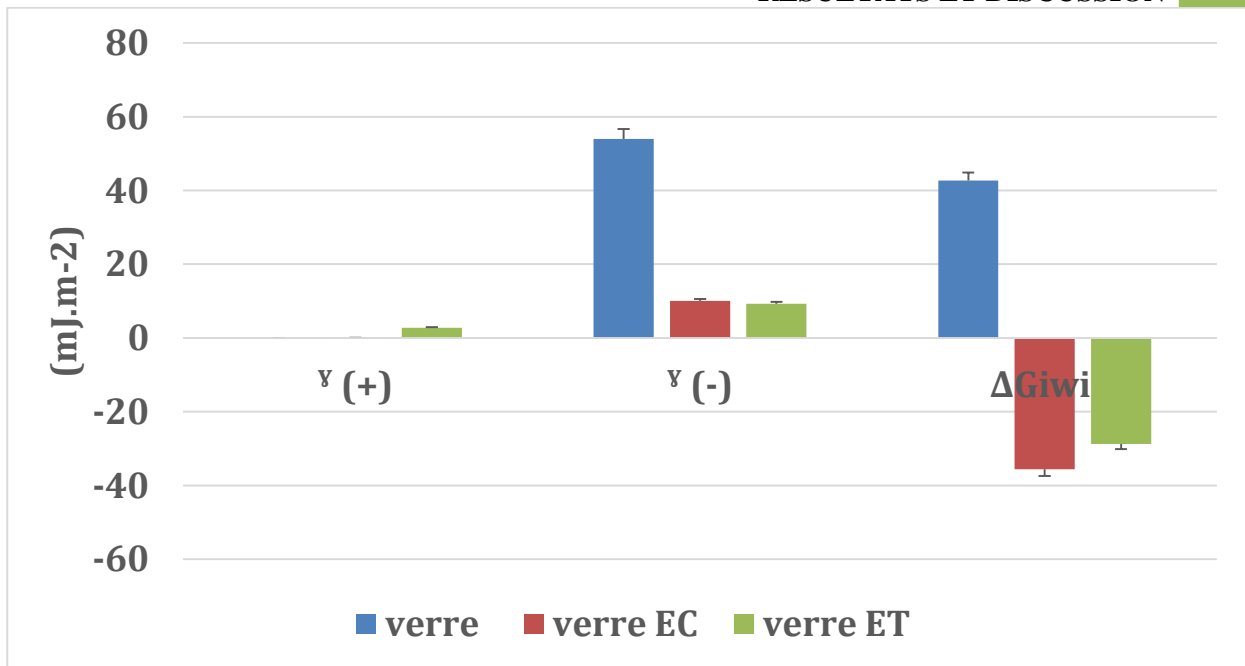


Figure 23: les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta Giwi$ ) du verre traité par deux types du lait UHT (entier et écrémé)

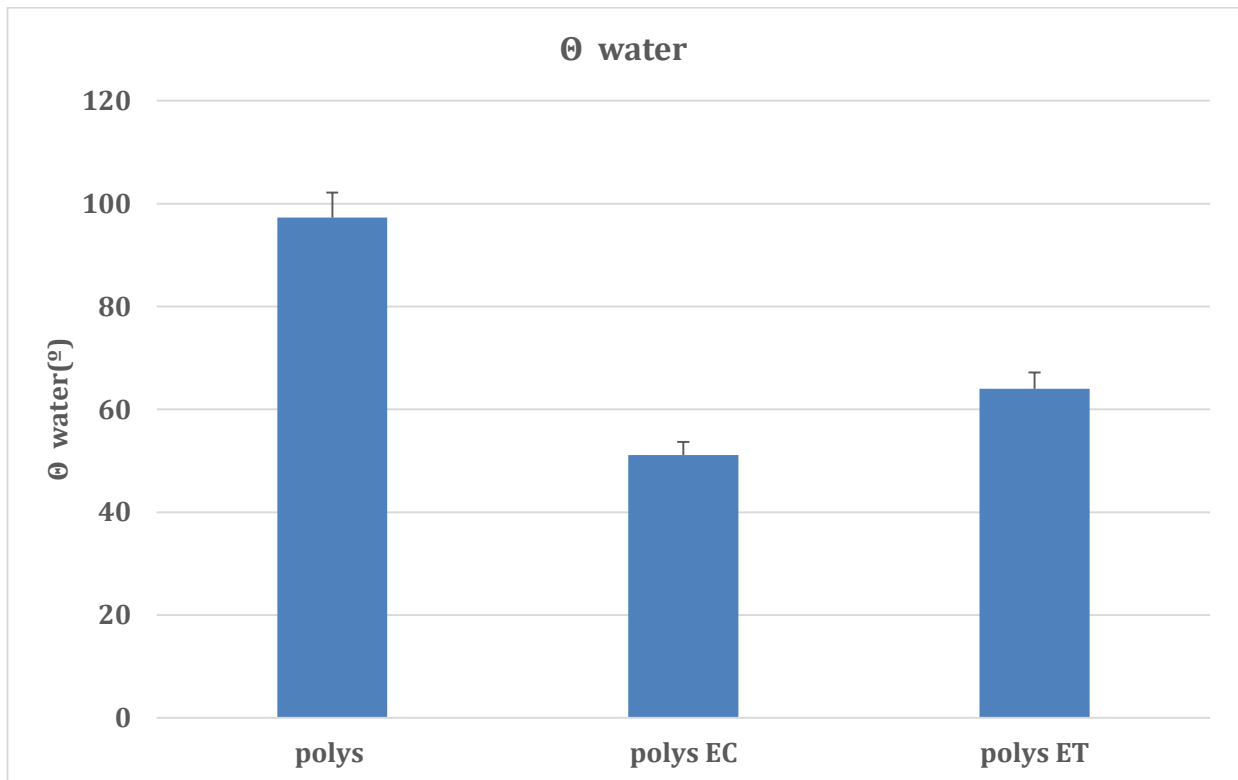


Figure 24: l'hydrophobicité du polystyrène traité par deux types de lait UHT (entier et écrémé)

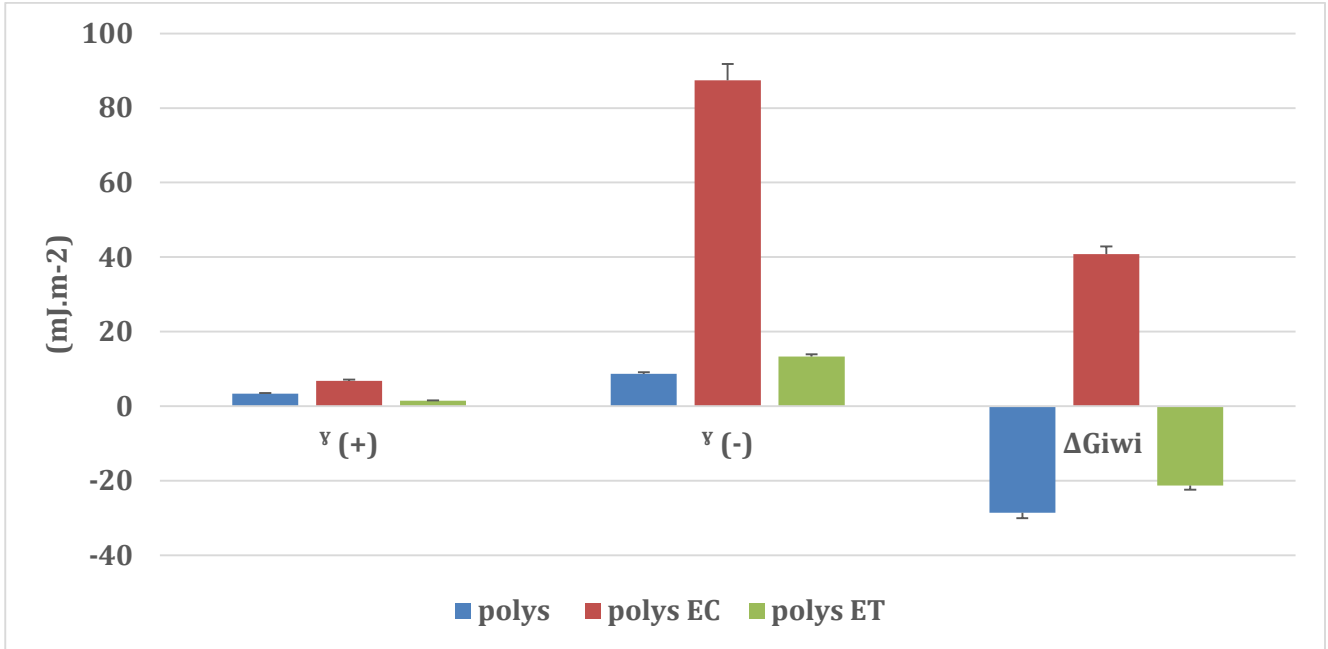


Figure 25: les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{\text{iwi}}$ ) du polystyrène traités par deux types du lait UHT(entier et écrémée)

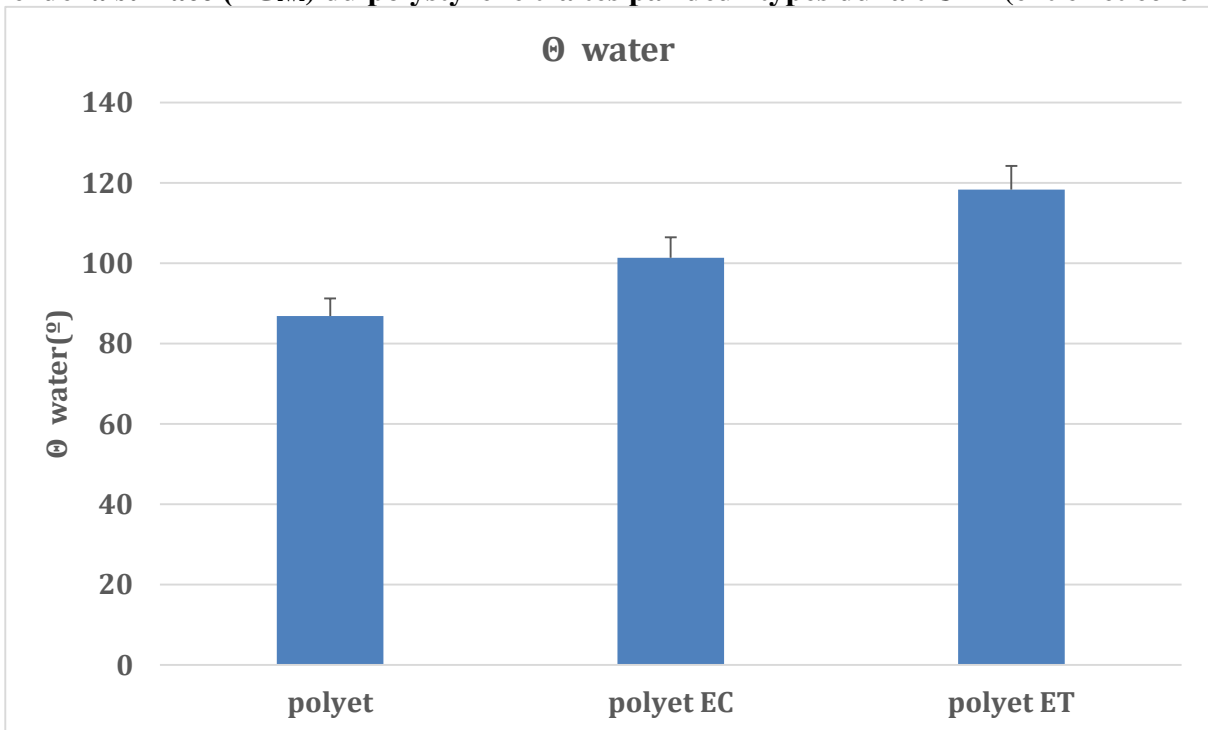


Figure 26: l'hydrophobicité du polyéthylène traités par deux types du lait UHT(entier et écrémée)



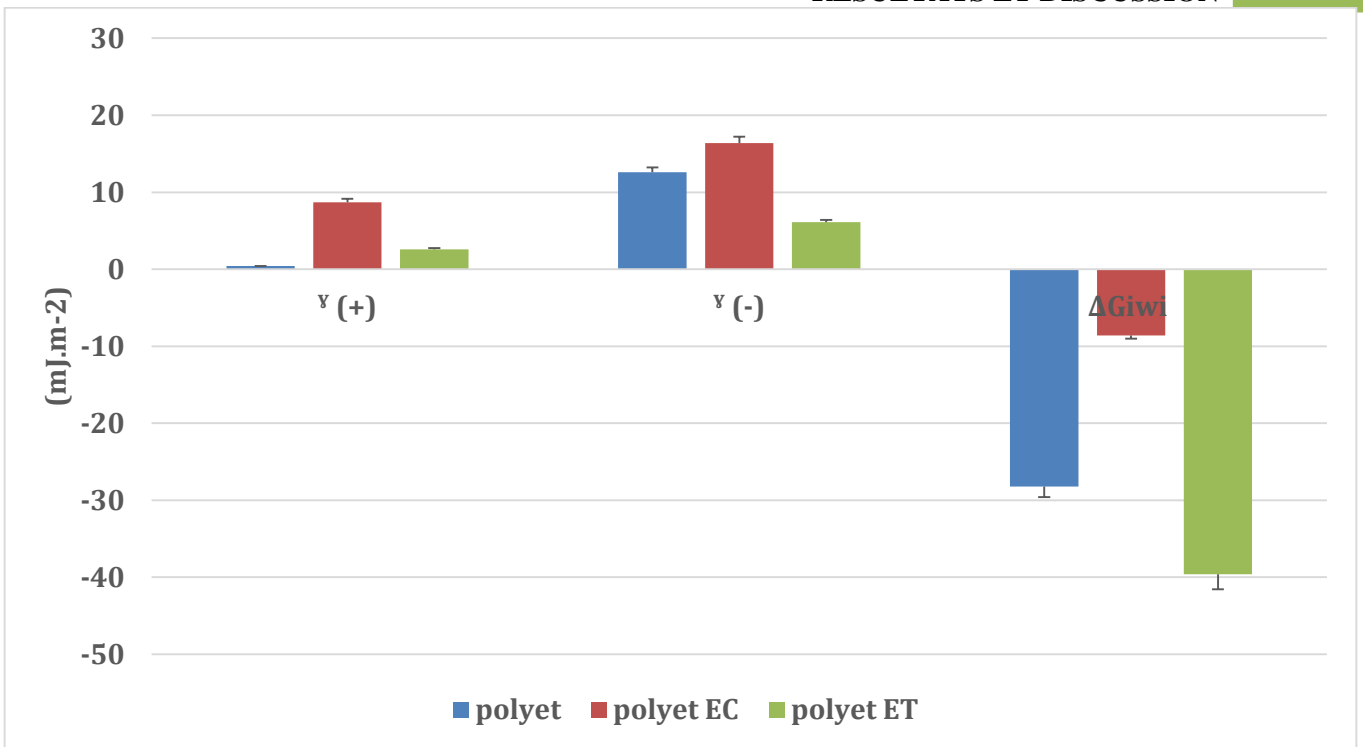


Figure 27: les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta Giwi$ ) du polyéthylène traités par deux types du lait UHT(entier et écrémée)

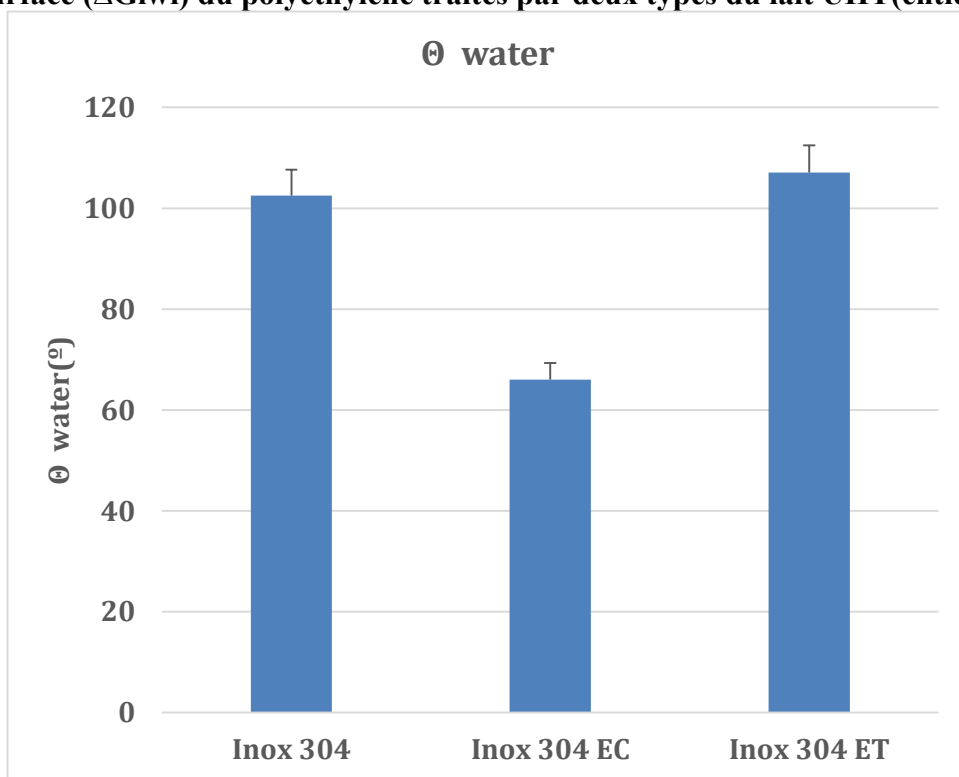


Figure 28: l'hydrophobicité de l'INOX 304 traités par deux types du lait UHT (entier et écrémée)

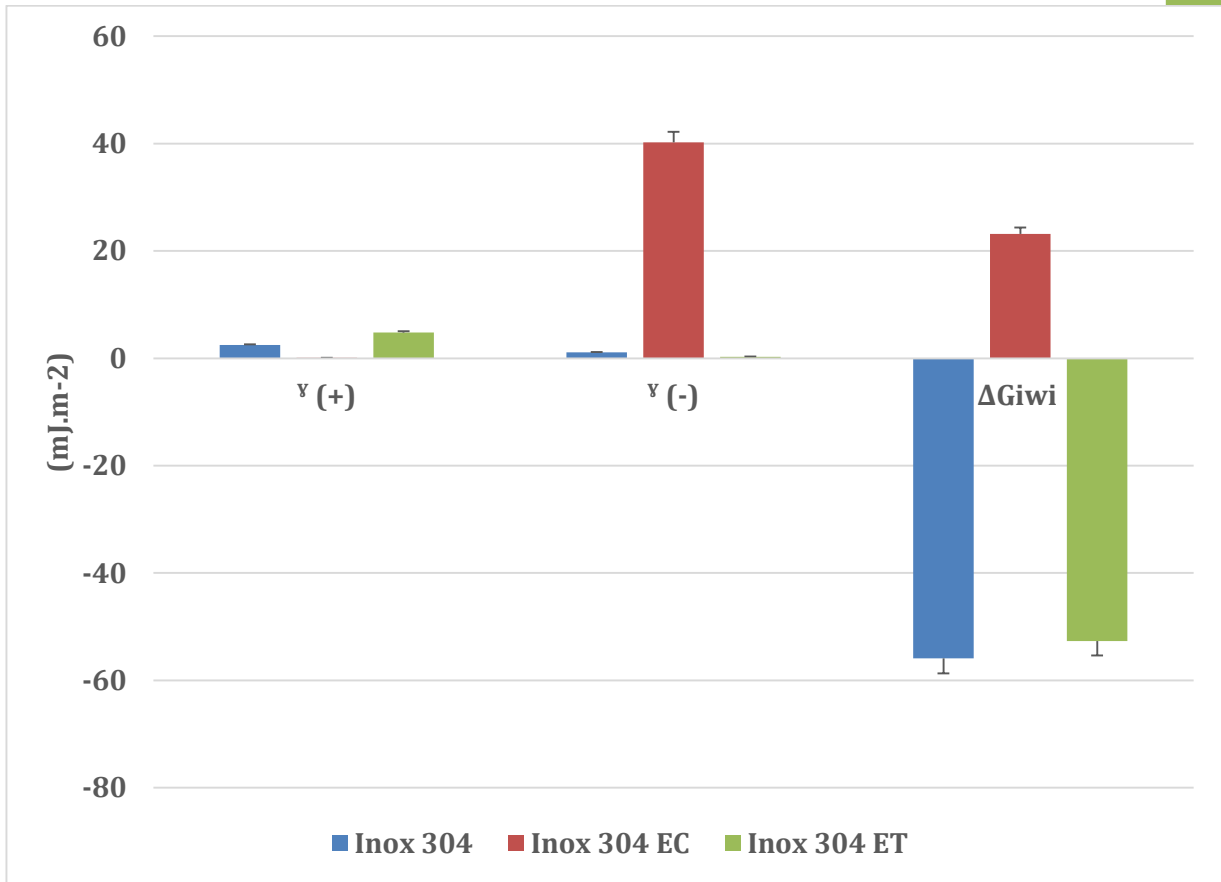


Figure 29: les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{wi}$ ) l'INOX 304 traités par deux types du lait UHT(entier et écrémée)

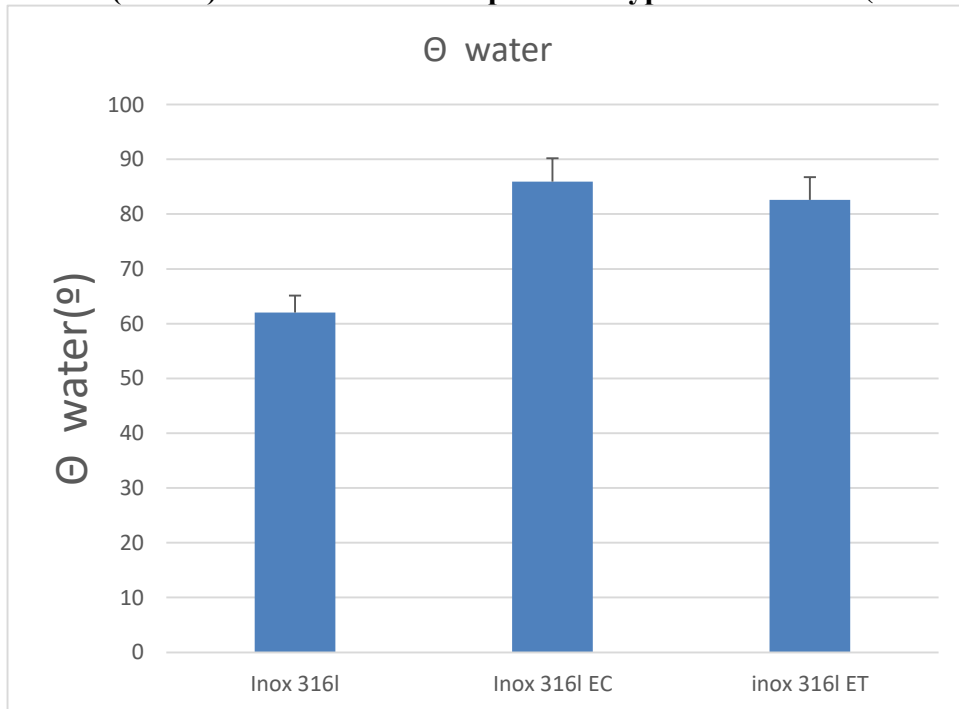
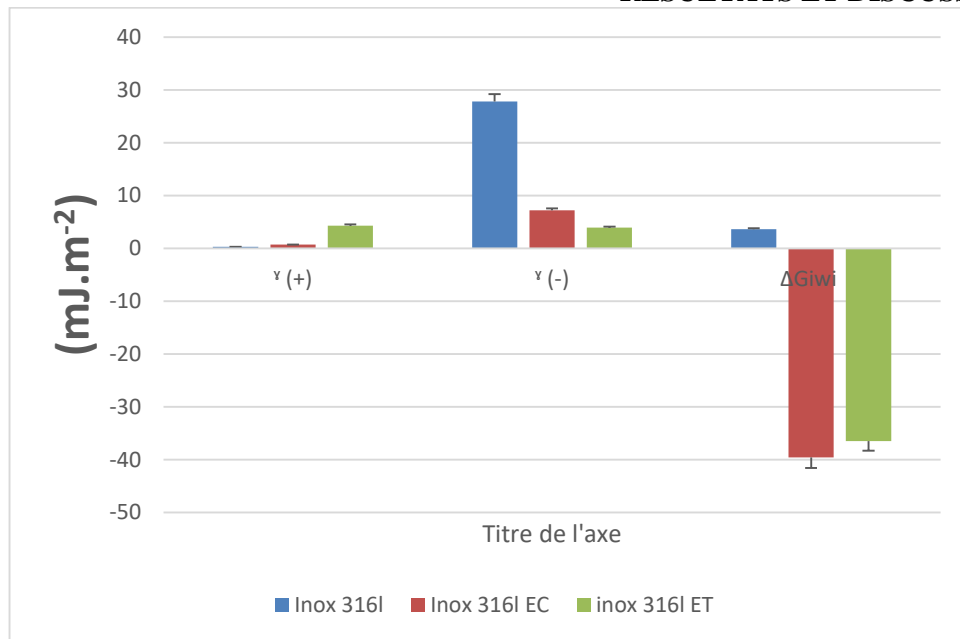


Figure 30: l'hydrophobicité de l'NOX 316L traités par deux types du lait UHT (entier et écrémée)



**Figure 31: les composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ) et d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ), et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ ) l'INOX 304 traités par deux types du lait UHT(entier et écrémée)**

Le traitement des supports de verre avec du lait entier, pendant 3 heures, renforce le caractère hydrophobe de la surface du verre ( $\Theta_w = 95,1^\circ > 65^\circ$ ). La même chose est remarquée au niveau du traitement des surfaces du polystyrène mais inversement au cas du verre, où nous constatons que les surfaces du polystyrène avaient initialement un caractère hydrophobe ( $\Theta_w = 97,3^\circ > 65^\circ$ ), mais avec le traitement de ce support par du lait entier son caractère hydrophile accru ( $\Theta_w = 64^\circ < 65^\circ$ ). En ce qui concerne les surfaces du polyéthylène nous avons remarqué que ce support avait en premier lieu un caractère hydrophobe ( $\Theta_{water} = 86,9^\circ > 65^\circ$ ), mais après traitement par le lait entier leur caractère hydrophobe est augmenté ( $118,3^\circ > 86,9^\circ > 65^\circ$ ).

Le traitement de la surface de l'acier inoxydable 316l avec le lait entier, change complètement. Avant le traitement, la surface de l'acier inoxydable 316l avait un caractère hydrophile très clair. Après son traitement au lait entier pendant 3 heures, elle devient hydrophobe. Par contre l'inox 304 ne rencontre aucun changement après le traitement avec le lait entier.

L'approche quantitative nous donne les mêmes constatations que l'approche qualitative, mais autrement, du fait que ce raisonnement ( $\Delta G_{iwi}$ ) est basé sur les forces à distance générées par les surfaces des cinq supports. L'hydrophobicité selon cette approche est traduite par le signe de la valeur de  $\Delta G_{iwi}$ . L'analyse de l'angle de contact d'une part, révèle pour le verre, le polystyrène, le polyéthylène, l'inox 316l, et l'inox 304 traitées par le lait entier des valeurs respectivement positives ( $\Delta G_{iwi} = 42.7 \text{ mJ/m}^2$ ), négatives ( $\Delta G_{iwi}$

## RESULTATS ET DISCUSSION

= -35.6 mJ/m<sup>2</sup>), négatives ( $\Delta G_{iwi} = -21,3$  mJ/m<sup>2</sup>), négatives ( $\Delta G_{iwi} = -36.5$  mJ/m<sup>2</sup>), et négatives ( $\Delta G_{iwi} = -52.7$  mJ/m<sup>2</sup>),

Concernant le caractère donneur/accepteur d'électrons, le traitement du verre par le lait entier a donné des résultats complètement différents de l'état initial, où nous avons remarqué que le caractère donneur

d'électrons du verre à diminuer brutalement ( $\gamma^{(-)}$  diminution de 54 mJ/m<sup>2</sup> à 9,3 mJ/m<sup>2</sup>), contrairement au caractère accepteur d'électrons qui a connu une légère augmentation ( $\gamma^{(+)}$  augmente de 0 mJ/m<sup>2</sup> à 2,8 mJ/m<sup>2</sup>).

Le traitement du polystyrène par le lait entier où nous avons constaté que les deux caractères donneur/accepteur d'électrons ont changé ( $\gamma^{(-)}$  augmente de 8.7 mJ/m<sup>2</sup> à 13,3 mJ/m<sup>2</sup> et  $\gamma^{(+)}$  diminue de 3.4 mJ/m<sup>2</sup> à 1,5 mJ/m<sup>2</sup>).

Par la suite, Le traitement du polyéthylène par le lait entier a provoqué une diminution de son caractère donneur d'électrons de  $\gamma^{(-)} = 12,6$  mJ/m<sup>2</sup> à 6,1 mJ/m<sup>2</sup> et une augmentation de son caractère accepteur d'électrons de  $\gamma^{(+)} = 0,4$  mJ/m<sup>2</sup> à 2,6 mJ/m<sup>2</sup>.

Pour l'inox 304, son traitement par le lait entier a provoqué une diminution de son caractère donneur d'électrons de  $\gamma^{(-)} = 1,1$  mJ/m<sup>2</sup> à 0,3 mJ/m<sup>2</sup> et une augmentation de son caractère accepteur d'électrons de  $\gamma^{(+)} = 2,5$  mJ/m<sup>2</sup> à 4,8 mJ/m<sup>2</sup>.

Ainsi, concernant les résultats de traitement des supports avec du lait écrémé, nous remarquons que le degré d'hydrophobicité de la surface des supports aussi bien de point de vue qualitatif que quantitatif. En se basant sur l'approche qualitative, l'angle de contact relative à l'eau change complètement lors du traitement des deux supports du verre et le polystyrène par le lait écrémé. Le verre avait en premier lieu un caractère hydrophile très remarquable ( $\Theta_w = 36,5^\circ < 65^\circ$ ), mais une fois qu'il est mis en contact avec du lait écrémé (absence de la matière grasse) pendant un certain temps (3 heures), son hydrophobicité s'inverse complètement ; le verre devient hydrophobe ( $\Theta_w = 82,1^\circ > 65^\circ$ ), ça d'une part. D'autre part, les surfaces du polystyrène acquièrent un caractère hydrophile ( $\Theta_w = 51,1^\circ < 65^\circ$ ).

En ce qui concerne les surfaces du polyéthylène nous avons remarqué que ce support avait en premier lieu un caractère hydrophobe ( $\Theta_{water} = 86,9^\circ > 65^\circ$ ), mais après l'avoir mis en contact avec du lait écrémé leur caractère hydrophobe est augmenté ( $117,5^\circ > 86,9^\circ > 65^\circ$ ).

Le traitement de la surface de l'acier inoxydable 316l avec le lait écrémé, change complètement. Avant le traitement, la surface de l'acier inoxydable 316l avait un caractère hydrophile très clair. Après son traitement au lait écrémé pendant 3 heures, elle devient hydrophobe. Par contre, l'inox 304 change complètement après traitement au lait écrémé qui devient hydrophile.

Le traitement de ces cinq supports par du lait écrémé, donne les valeurs de  $\Delta G_{iwi}$  des deux supports verre et polystyrène ( $\Delta G_{iwi}$  diminue de 42.7 mJ/m<sup>2</sup> à -35.6 mJ/m<sup>2</sup> pour le verre et augmente de -28.6 mJ/m<sup>2</sup> à 40.8 mJ/m<sup>2</sup> pour le polystyrène), mais ceci n'est pas remarquable pour le support polyéthylène

## RESULTATS ET DISCUSSION

( $\Delta G_{\text{wi}}$  diminue de  $-21.3 \text{ mJ/m}^2$  à  $-28.2 \text{ mJ/m}^2$ ). Dans le cas de l'inox 316l ( $\Delta G_{\text{wi}}$  diminue de  $3,6 \text{ mJ/m}^2$  à  $-39.6 \text{ mJ/m}^2$ ), contrairement à l'inox 304 ( $\Delta G_{\text{wi}}$  augmente de  $-55.9 \text{ mJ/m}^2$  à  $23.2 \text{ mJ/m}^2$ ).

En ce qui concerne les caractères donneur et accepteur des électrons, la surface du verre présente initialement un caractère donneur d'électrons très remarquable ( $\gamma^{(-)} = 54 \text{ mJ/m}^2$ ) et un caractère accepteur d'électrons nul (Hamadi et al. 2009b),(Hamadi et al. 2009) contrairement aux surfaces de polystyrène testées ( $\gamma^{(-)} = 8,7 \text{ mJ/m}^2$ ,  $\gamma^{(+)} = 3.4 \text{ mJ/m}^2$ ) et polyéthylène testées ( $\gamma^{(-)} = 12,6 \text{ mJ/m}^2$ ,  $\gamma^{(+)} = 0,4 \text{ mJ/m}^2$ ).

Le traitement du verre par le lait écrémé a donné des résultats complètement différents de l'état initial, où nous avons remarqué que le caractère donneur d'électrons du verre a diminué brutalement ( $\gamma^{(-)}$  diminution de  $54 \text{ mJ/m}^2$  à  $10,1 \text{ mJ/m}^2$ ), contrairement au caractère accepteur d'électrons qui a connu une légère augmentation ( $\gamma^{(+)}$  augmente de  $0 \text{ mJ/m}^2$  à  $0,1 \text{ mJ/m}^2$ ).

Le traitement du polystyrène par le lait écrémé a donné des résultats complètement différents de l'état initial, où on a remarqué que les deux caractères donneur/accepteur d'électrons ont augmenté ( $\gamma^{(-)}$  augmente de  $8,7 \text{ mJ/m}^2$  à  $87,4 \text{ mJ/m}^2$  et  $\gamma^{(+)}$  augmente de  $3,4 \text{ mJ/m}^2$  à  $6,8 \text{ mJ/m}^2$ ).

Le traitement du polyéthylène par le lait écrémé a montré que le caractère donneur d'électrons du polyéthylène a diminué brutalement ( $\gamma^{(-)}$  diminution de  $12,6 \text{ mJ/m}^2$  à  $1,4 \text{ mJ/m}^2$ ), et pour le caractère accepteur d'électrons n'a pas changé ( $\gamma^{(+)} = 0,4 \text{ mJ/m}^2$ ).

Pour l'inox 304, son traitement par le lait écrémé a provoqué une diminution de son caractère donneur d'électrons de  $\gamma^{(-)} = 1,1 \text{ mJ/m}^2$  à  $0.3 \text{ mJ/m}^2$  et une augmentation de son caractère accepteur d'électrons de  $\gamma^{(+)} = 2.5 \text{ mJ/m}^2$  à  $4,8 \text{ mJ/m}^2$ . Ainsi l'inox 316l, son traitement par le lait écrémé a provoqué une diminution de son caractère donneur d'électrons de  $\gamma^{(-)} = 27,8 \text{ mJ/m}^2$  à  $7,2 \text{ mJ/m}^2$  et une augmentation de son caractère accepteur d'électrons de  $\gamma^{(+)} = 0,3 \text{ mJ/m}^2$  à  $0,7 \text{ mJ/m}^2$ .

### III. Etude de film conditionnant des surfaces solides traitées par deux types de lait UHT par la spectroscopie infrarouge :

Dans cette partie, on va présenter les résultats des Spectre d'infrarouge des différents supports étudiés (verre, polystyrène, polyéthylène, acier inoxydable 304 et 316 l), avant et après leurs traitements avec du lait entier et écrémé :

#### 1. Support de verre :

La figure 27 présente le spectre infrarouge moyen du verre avant et après traitement par le lait UHT écrémé (a) et entier (b).

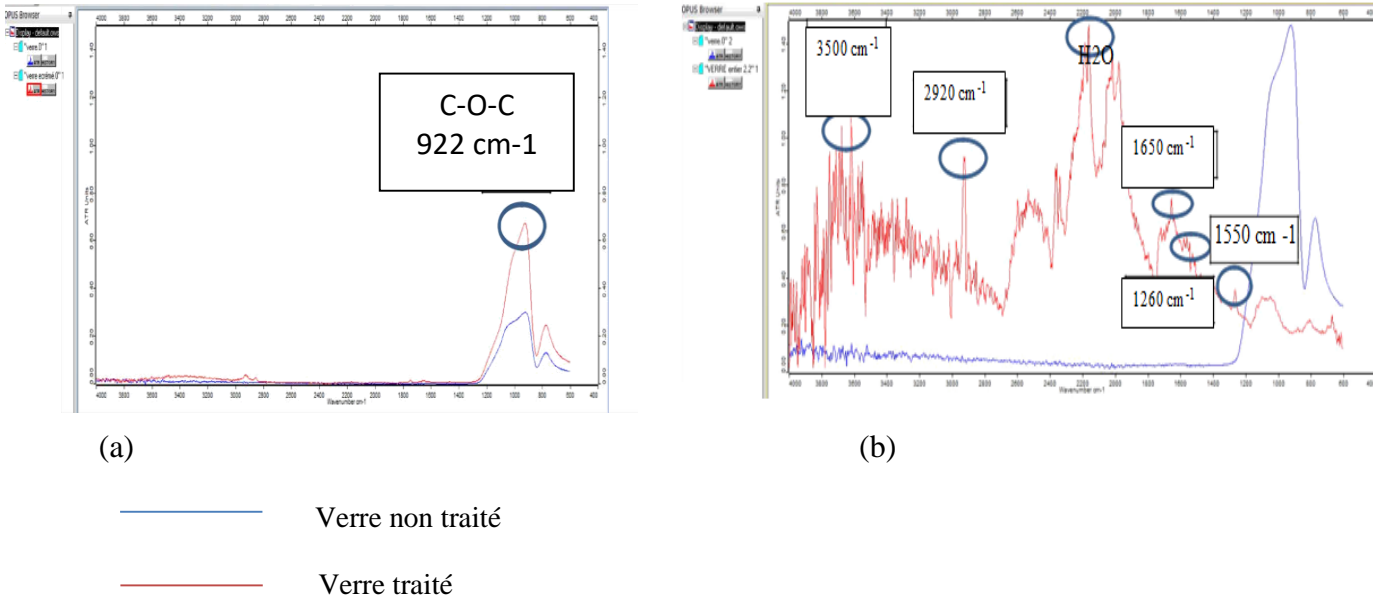


Figure 32: Spectre infrarouge du verre avant et après traitement par le lait UHT écrémé (a) et entier (b)

Support		Hydrophobicité	Bande caractéristique infrarouge
Verre	Entier	plus Hydrophobe	✓ C-H des groupements méthyle (-CH <sub>3</sub> ) et méthylène (-CH <sub>2</sub> )
	Ecrémée	hydrophobe	✓ (C-O-C) oligosaccharides (lactose) ✓ C=O de la fonction ester présente dans la fraction grasse (triglycérides) ✓ amides et des protéines ✓ groupements hydroxyle OH

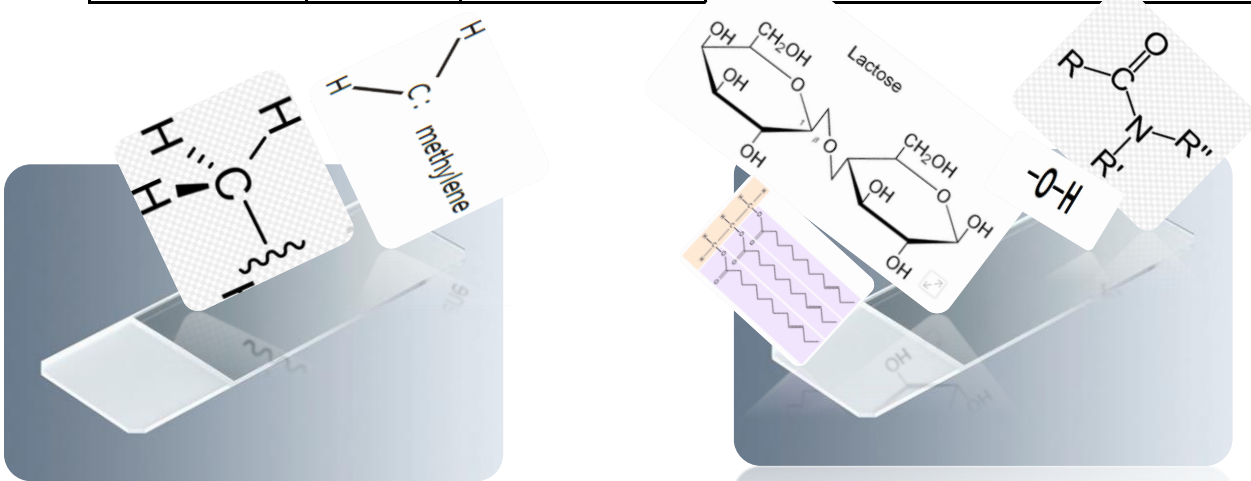


Figure 33: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface du verre

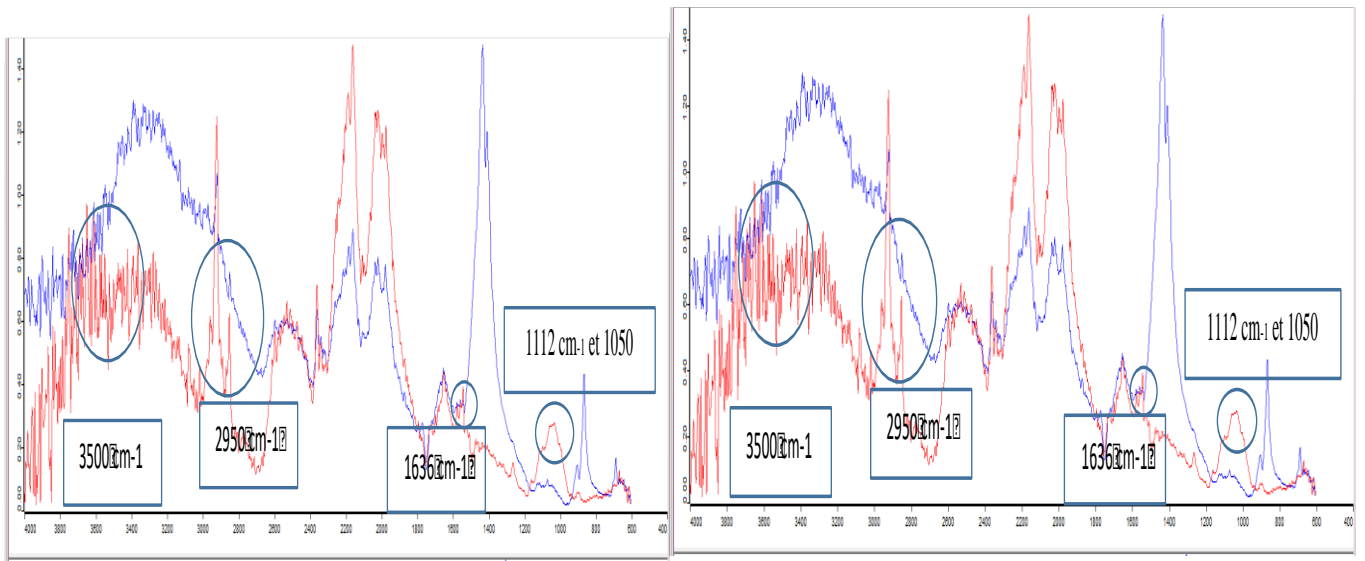
Le support du verre, on ne constate aucune différence dans les régions qui caractérisent la matière grasse et les protéines, une seule différence a été remarqué au niveau de la bande spectrale à  $923\text{ cm}^{-1}$ . Cette bande est attribuées aux liaisons (C-O-C) qui sont caractéristiques des oligosaccharides (lactose).

Contrairement au verre traité par le lait UHT entier, dans la première partie du spectre, il est possible de discerner les vibrations d'élongation, à  $2955\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  et à  $2872\text{ cm}^{-1}$  et  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Ces vibrations qui sont caractéristiques de la matière grasse, sont attribuées aux liaisons C-H des groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>) et méthylène (-CH<sub>2</sub>). La bande spectrale à  $1746\text{ cm}^{-1}$  est dominée par la réactivité de la liaison C=O de la fonction ester présente dans la fraction grasse (triglycérides), mais dans une moindre contribution de la fonction carbonyle, des acides carboxyliques et des protéines apparaissent.

Les deux bandes, situées aux environs de  $1650\text{ cm}^{-1}$  et  $1545\text{ cm}^{-1}$ , sont en particulier caractéristiques des fonctions amides et des protéines. La figure 28 montre aussi l'apparition des bandes correspondant aux groupements hydroxyle OH situées aux environs de  $3500\text{ cm}^{-1}$  et  $1636\text{ cm}^{-1}$ .

## **2. Support d'acier inoxydable (316l et 304).**

La figure 29 présente le spectre infrarouge moyen de l'acier inoxydable 304 avant et après traitement par le lait UHT écrémé.



(a)

(b)

— 304 non traité

— 304 traité

Figure 34: Spectres infrarouge moyen de l'acier 304 avant et après traitement par le lait UHT écrémé(a) et entier (b).

Support		Hydrophobicité	Bande caractéristique infrarouge
Acier inoxydable 304	Entier	hydrophobe	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ hydroxyles OH</li> <li>✓ C-H des groupes méthyle (-CH3) et méthylène (-CH2)</li> <li>✓ fonctions amides et des protéines</li> <li>✓ la liaison C-O</li> </ul>
	Ecrémée	Hydrophile	

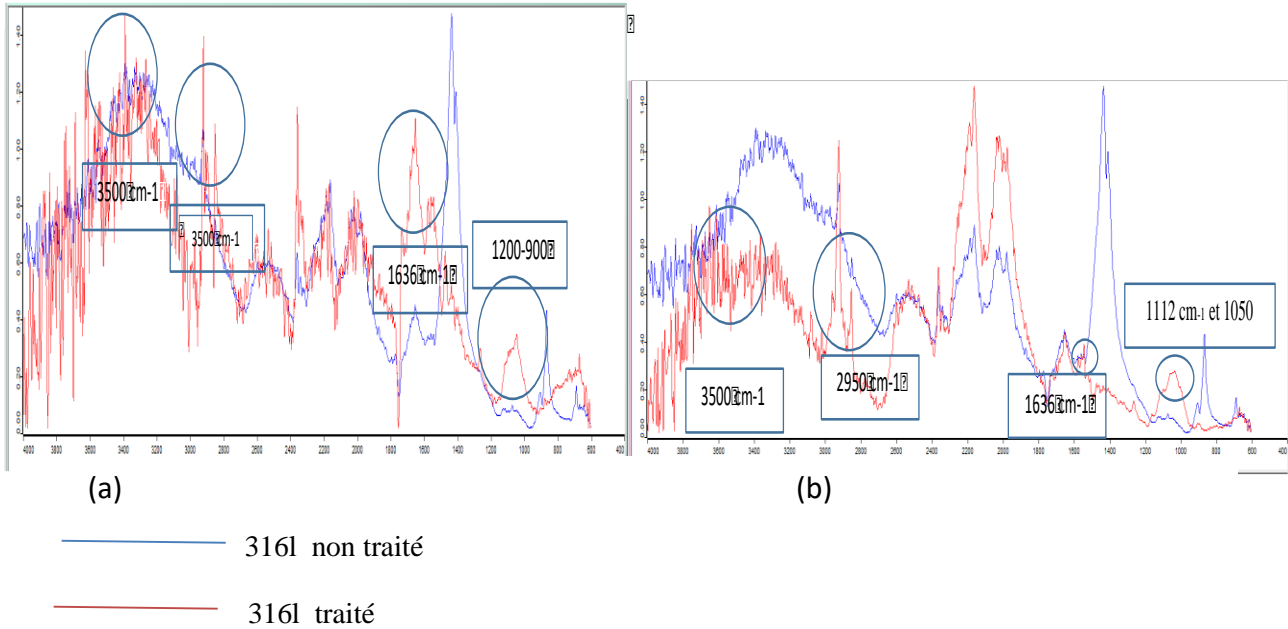


Figure 35: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de l'Inox 304



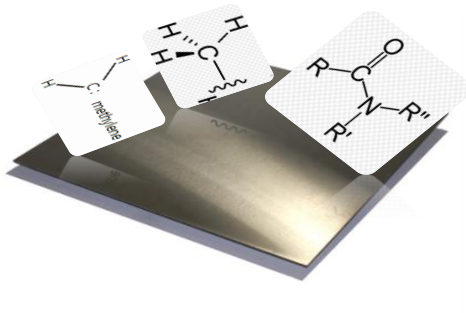
## RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 31:présente le spectre infrarouge moyen de l'acier inoxydable 316l avant et après traitement par le lait UHT écrémé.

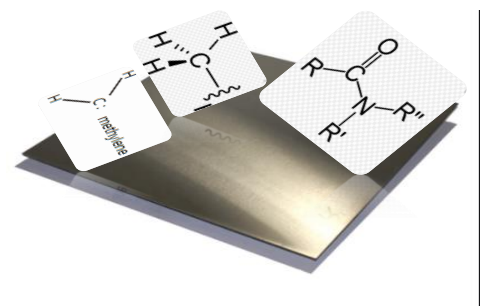


**Figure 36: Spectres infrarouge moyen de l'acier 316L avant et après traitement par le lait UHT écrémé(a) et entier (b).**

Support		Hydrophobicité	Bande caractéristique infrarouge
Acier inoxydable 316 L	Entier	Moins hydrophobe	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ hydroxyles OH</li> <li>✓ C-H des groupes méthyle (-CH<sub>3</sub>) et méthylène (-CH<sub>2</sub>)</li> <li>✓ fonctions amides et des protéines</li> <li>✓ la liaison C-O</li> </ul>
	Ecrémée	Plus hydrophobe	



Entier



Ecrémée

**Figure 37: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de l'Inox 316L**

Les résultats de l'acier inoxydable (316l et 304), ont montré que tous les spectres sont caractérisés par plusieurs bandes caractéristiques de l'interaction du rayonnement infrarouge avec les différents composants du lait que ça soit entier et écrémé. Nous avons remarqué l'apparition des bandes correspondant aux groupes hydroxyles OH, situées autour de  $3500\text{ cm}^{-1}$  et  $1636\text{ cm}^{-1}$ . Les vibrations d'élongation, asymétriques à  $2955\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$ ,  $2872\text{ cm}^{-1}$  et  $2854\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques des traces de matière grasse, (modes d'étirement symétrique des groupes CH<sub>2</sub> des chaînes acyles des lipides du lait) et sont attribuées aux liaisons C-H des groupes méthyle (-CH<sub>3</sub>) et méthylène (-CH<sub>2</sub>). De fortes absorptions ont été observées à  $2900\text{ cm}^{-1}$  et  $2800\text{ cm}^{-1}$ , respectivement, correspondant à des vibrations d'élongation de la liaison C-H des groupes CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>. Les deux bandes situées autour de  $1650\text{ cm}^{-1}$  et  $1545\text{ cm}^{-1}$ , sont particulièrement caractéristiques des fonctions amides et des protéines. Les bandes à environ  $1112\text{ cm}^{-1}$  et  $1050\text{ cm}^{-1}$  sont dominées par les vibrations d'élongation de la liaison C-O.

En ce qui concerne les bandes situées aux régions  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , elles caractérisent les liaisons C-O-C C-O-P, P-O-P des oligo et polysaccharides.

### 3. Le support de polystyrène :

La figure 33 présente le spectre infrarouge moyen de polystyrène avant et après traitement par le lait UHT écrémé.

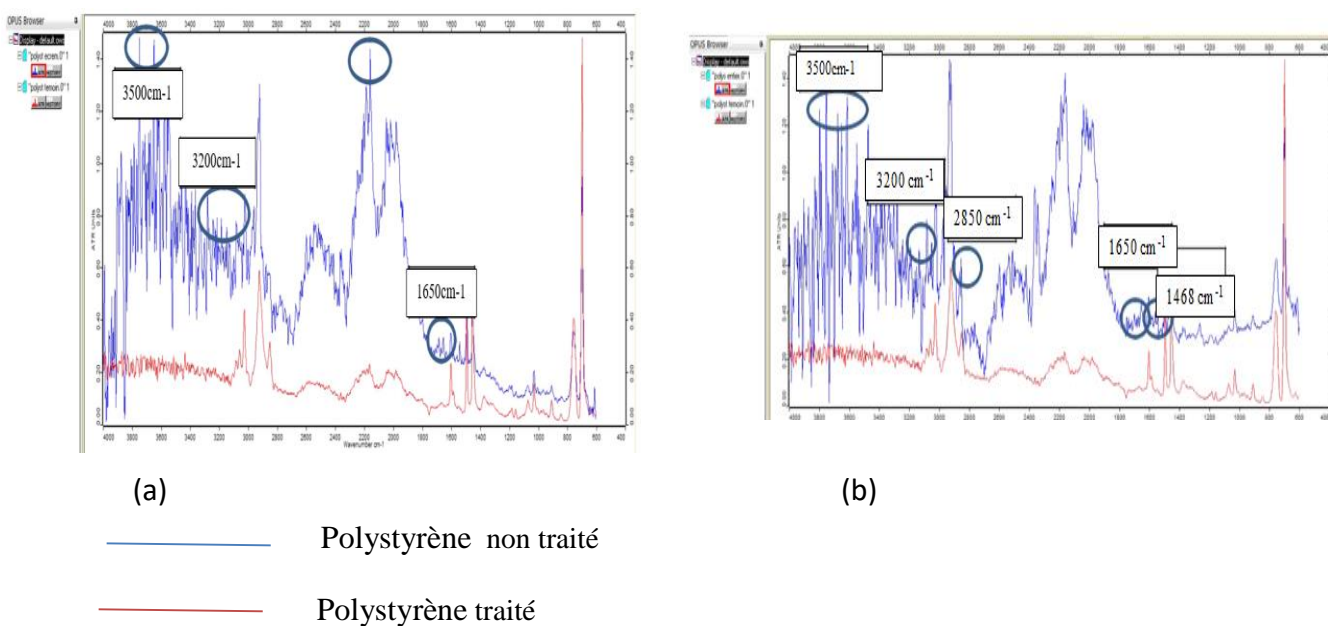
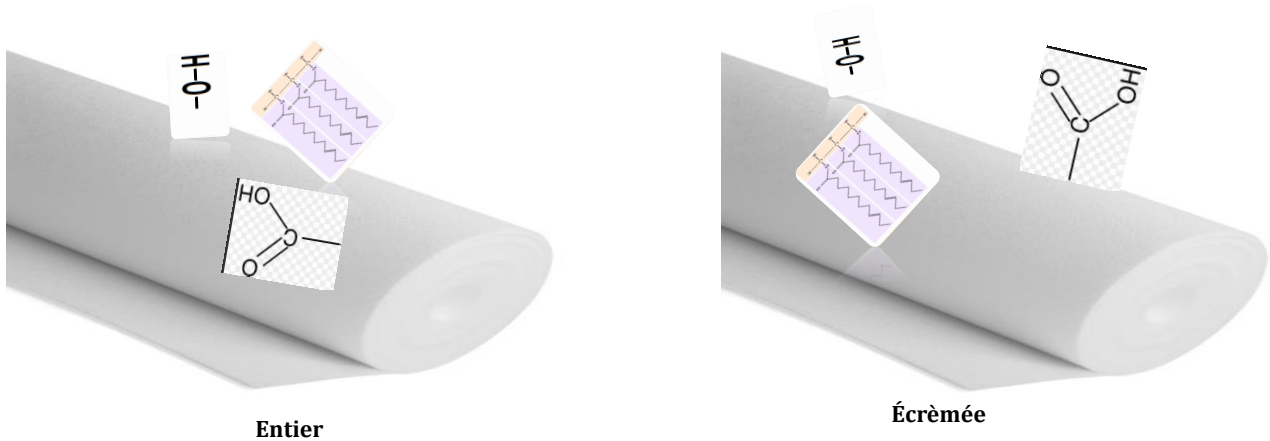


Figure 38: Spectre infrarouge du polystyrène avant et après le traitement par le lait UHT écrémée (a) et entier (b)

Support		Hydrophobicite	Bande caracteristique infrarouge
polystyrène	Entier	Moins hydrophile	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ groupements hydroxyle OH</li> <li>✓ la liaison C=O de la fonction ester présente dans la fraction grasse (triglycérides)</li> <li>✓ fonction carbonyle des acides carboxyliques et des protéines</li> </ul>
	Ecrémée	Plus hydrophile	



**Figure 39: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface de polystyrène**

En ce qui concerne le polystyrène, les résultats ont montré que, si nous avons comparés le polystyrène témoin avec celui traité par le lait UHT entier ou écrémé, il est remarquable que dans le cas de la surface traitée y a une apparition des bandes correspondants aux groupements hydroxyle OH, situées aux environs de  $3500\text{ cm}^{-1}$  et  $1636\text{ cm}^{-1}$ , La bande spectrale à  $1746\text{ cm}^{-1}$  est dominée par la réactivité de la liaison C=O de la fonction ester présente dans la fraction grasse (triglycérides). Mais dans une moindre contribution, de la fonction carbonyle des acides carboxyliques et des protéines, Les deux bandes situées aux environs de  $1650\text{ cm}^{-1}$  et  $1545\text{ cm}^{-1}$ , sont en particulier caractéristiques des fonctions amide des protéines.

#### 4. le support polyéthylène :

La figure 35 présente le spectre infrarouge moyen de polyéthylène avant et après traitement par le lait UHT écrémée et entier.

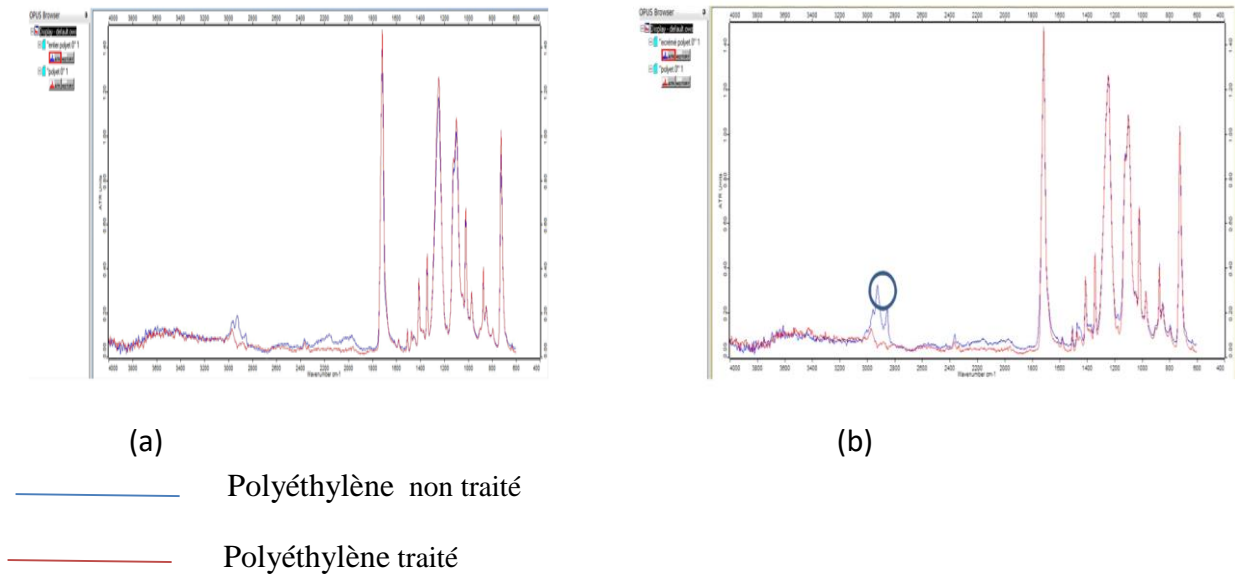
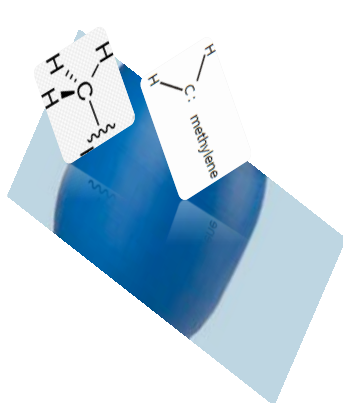
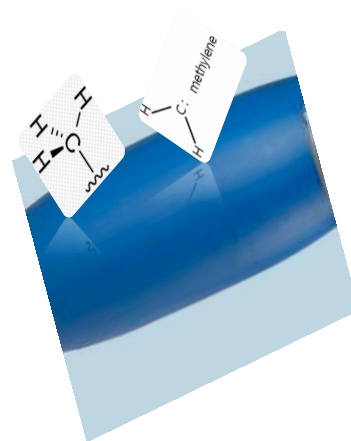


Figure 40: Spectre infrarouge du polyéthylène avant et après traitement par le lait écrémée (a) et entier (b).

Support		Hydrophobicite	Bande caracteristique infrarouge
polyéthylène	Entier	plus Hydrophobe	✓ C-H des groupements méthyle (-CH <sub>3</sub> ) et méthylène (-CH <sub>2</sub> ).
	Ecrémée	hydrophobe	



Entier



Écrémée

Figure 41: Relation entre la physicochimie et la chimie de la surface du polyéthylène

Pour le dernier support le polyéthylène, la comparaison des surfaces non traitée avec celui traité soit par le lait UHT entier ou écrémé, révèle dans la première partie du spectre des vibrations d'élongation, asymétriques à  $2955\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  et à  $2872\text{ cm}^{-1}$  et  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Ces vibrations qui sont caractéristiques de la matière grasse, sont attribuées aux liaisons C-H des groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>) et méthylène (-CH<sub>2</sub>).

#### IV. Discussion

Dans l'industrie, en particulier l'industrie laitière, il est admis que l'adhésion microbienne est affectée par des molécules organiques et inorganiques qui pourraient former un film de conditionnement et modifier les caractéristiques physico-chimiques du support (Chmielewski and Frank 2003)(Lorite et al. 2011). Ces films sont composés de molécules d'origine laitière, dont les plus notables sont les protéines, les graisses et les hydrates de carbone [Mitteliman et al., 1998]. Ainsi, de nombreux travaux [Fletcher 1996] (Fard 2010) (Chmielewski and Frank 2003)(Eileen B. Somers and Amy C. Lee Wong 2004) ont affirmé qu'une fois que les composés moléculaires organiques sont en contact avec les supports soumis à l'adhésion microbienne, leurs caractéristiques physico-chimiques sont modifiées par l'adsorption et la fixation (par des liaisons à faible énergie) de ces composés chimiques.

Nos résultats ont montré un changement très significatif dans l'hydrophobicité des supports étudiés (verre, polystyrène, polyéthylène, inox 316l, et inox 304). A la lumière de nos résultats, nous avons noté une inversion du caractère hydrophile de l'acier inoxydable 316L et le verre vers un caractère hydrophobe, et aussi, une inversion du caractère hydrophobe du support inox 304 et du polystyrène traitées par le lait écrémé vers un caractère hydrophile. Ceci est probablement dû à l'adsorption de  $\beta$ -Lactoglobulines sur les surfaces étudiées. En effet, dans la littérature, il est largement rapporté que le lait modifie les propriétés de surface (Bower et al. 1996)(Dat et al. 2010)(Rubio et al. 2002)(Szlavik et al. 2012). (Yang et al. 1991) ont rapporté que l'adsorption de  $\beta$ -Lactoglobulines du lait rend une surface hydrophile plus hydrophobe et une surface hydrophobe plus hydrophile. Cette protéine a une plus grande réactivité que les caséines pour la formation de liaisons covalentes disulfure et non disulfure (Grewal et al. 2017), probablement en raison de leur dénaturation, suite au traitement des surfaces avec du lait UHT. La dénaturation entraîne l'exposition des régions hydrophobes, de groupes thiol libres et de résidus d'acides aminés de préférence tels que la lysine, l'asparagine et la glutamine, qui sont ensuite impliqués dans la lactosylation et la liaison des via-caséines déshydroalanines (Andrews, 1975) (Donato & Guyomarc'h, 2009) (Henle, Schwarzenbolz, & Klostermeyer, 1996) (Holland, et al., 2011).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Le caractère donneur des surfaces étudiées diminue après leurs traitements avec du lait UHT entier, mais après le traitement de la surface avec le lait UHT écrémé ce caractère augmente sauf pour le verre et l'acier inoxydable 316L. (Rubio et al. 2002) ont trouvé que le caractère d'électrons des surfaces en acier inoxydable et du chrome change également après l'adsorption du sérum-albumine bovine. En outre, il a été signalé que le contact entre le lait homogénéisé et la surface du verre rend la surface de ce dernier plus donneuse d'électrons et moins hydrophile (Szlavik et al. 2012).

La formation d'un film conditionnant peut donc entraîner des modifications importantes des propriétés de surface des matériaux. En 2008, Jullien et ses collaborateurs ont soumis des aciers inoxydables à des cycles d'encrassement/nettoyage avec des conditions rencontrées dans les IAA. Les auteurs ont mis en évidence que l'énergie de surface des aciers, soumis à une alternance de contact avec des aliments (lait/jus de viande) puis des détergents, évoluait avec le nombre de cycles et était affectée par le produit alimentaire utilisé (Jullien et al., 2008).

L'établissement de ce film précédant l'étape de l'adhésion microbienne proprement dite, les modifications des propriétés physico-chimiques des surfaces des matériaux induisent l'affectation de l'aptitude de biocontamination, voire leur facilité au nettoyage (Errera et al., 2007 ; Jullien et al., 2008 ; Inde et Carballo, 2000)). En présence de molécules nutritives, ce film pourrait aussi servir de réservoir nutritionnel et « d'anti- stress » pour les germes contaminants, leur permettant ainsi de conserver une vie tout aussi active que prolifique (rown et al, 2014).

les analyses des surfaces (inox, polystyrène, polyéthylène et le verre ) traitées par le lait UHT, par spectroscopie IR, ont montré la présence d'un film organique. Les mêmes résultats ont été montrés par (Rubio et al. 2002).

Les travaux rapportés dans la littérature indiquent clairement que la nature du matériau affecte les cinétiques de contamination (Silva et al. 2008), la distribution des cellules adhérentes (Senechal et al., 2004) et la formation des biofilms (Eileen B. Somers and Amy C. Lee Wong 2004). Ainsi la facilité de l'encrassement semble très affectée par les conditions environnementales, mais aussi par le microorganisme. Par exemple, Marouani- Gadri et ses collaborateurs (Marouani- Gadri *et al.*, 2009), ont montré que dans la plupart des conditions testées dans leur étude, l'acier inoxydable (généralement reconnu comme un support très hygiénique) et un polyuréthane utilisé pour les tapis convoyeurs avaient un comportement similaire en termes de contamination par des biofilms de *E. coli* O157:H7. Les différences observées entre les matériaux peuvent être induites par la nature chimique du matériau, mais surtout par leurs propriétés physico- chimiques.

## V. Conclusions :

L'étude des caractères physicochimiques de 5 surfaces solides (verre, acier inoxydable 304, acier inoxydable 316l, polystyrène, et le polyéthylène), par l'angle de contact, montre que le traitement par 2 types du lait UHT (écrémé et entier) modifie leurs propriétés physico-chimiques :

- une inversion du caractère hydrophile de l'acier inoxydable 316L et le verre vers un caractère hydrophobe
- une inversion du caractère hydrophobe du support inox 304 et du polystyrène traité par le lait écrémé vers un caractère hydrophile
- Le caractère donneur des surfaces étudiées diminue après leurs traitements avec du lait UHT entier, mais après le traitement de la surface avec le lait UHT écrémé ce caractère augmente sauf pour le verre et l'acier inoxydable 316l.

L'analyse, par spectroscopie infrarouge, après le conditionnement de ces surfaces solides par le lait, a montré la formation d'un film dont la nature des molécules diffèrent:

- des bandes caractérisées : aux liaisons C-H des groupements méthyle (-CH<sub>3</sub>), méthylène (-CH<sub>2</sub>), la réactivité de la liaison C=O de la fonction ester, et les liaisons C-O-C C-O-P, P-O-P des oligo et polysaccharides.

Plusieurs éléments sont à l'origine de la modification physicochimiques des surfaces étudiées, tel que les phospholipides, les caséines et le lactose.

Par conséquent, cette étude pourrait être utilisée pour développer des stratégies de contrôle de l'hygiène des surfaces des équipements, en particulier dans l'industrie laitière, et pour rationaliser les protocoles de nettoyage et de désinfection.

### *CHAPITRE III :*

## *Effet du conditionnement par le lait sur l'adhésion prédictive de Staphylococcus aureus sur les propriétés physicochimiques des surfaces solides*

### **I. Introduction**

La qualité microbiologique des denrées alimentaires est un enjeu important sur le plan de la santé publique que sur le plan économique (**Desenclos et al., 2002**). En effet la bio-contamination des aliments



par des micro-organismes pathogènes peut être à l'origine des toxi-infections alimentaires (TIA) susceptibles d'être plus ou moins sévères. Chaque année, en France, 70000 cas d'infection sont recensés (thorns, 2000, todd, 1997). Comme autres bactéries pathogènes, *Staphylococcus aureus* possède également la capacité d'adhérer sur une grande variété de supports, dont parmi eux se trouvent les surfaces utilisées pour les procédés agroalimentaires (hood et zottola, 1997). Ces derniers sont soumis à des sévères exigences en matière d'hygiène afin de lutter contre toute prolifération indésirable des micro-organismes (bactérie et moisissure).

Bien que les mécanismes fondamentaux qui régissent l'adhésion microbienne soient encore mal compris et n'aient donc pas été complètement définis, il est admis que les propriétés physico-chimiques de la surface microbienne et celles des supports sont des facteurs déterminants de l'adhésion initiale (Van Oss et al., 1986 ; Bellon-Fontaine et al., 1990; Bos et al., 1999 ; Gallardo Moreno et al., 2002 ; Bayoudh et al., 2006). De ce fait, plusieurs modèles théoriques ont été proposés pour prédire le phénomène de l'adhésion des particules colloïdales aux surfaces dont l'approche de DLVO étendue développée par Van Oss. Cette approche considère trois types d'interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion initiale : les interactions de Van der Waals, les interactions acido-basiques et les interactions électrostatiques. On utilise dans cette approche, l'énergie totale de l'adhésion des bactéries sur les différents supports étudiés ainsi que ses composantes acide-bases (AB) et Lifshitz -van der Waals (LW) sont calculées par les équations issues du modèle de Van Oss (Van Oss ,1994)

Dans ce chapitre, on a essayé de prédire l'adhésion de 6 souches de *Staphylococcus aureus*, isolées du lait cru, et cultivées dans 3 types de milieu de culture, sur des supports communément utilisés dans les industries agroalimentaires (le verre, l'acier inoxydable 304, l'acier inoxydable 316l, le polyéthylène et le polystyrène). D'autre part, on a essayé de comprendre l'effet du conditionnement par le lait UHT sur l'adhésion prédictive de *Staphylococcus aureus* sur des supports solides.

## **II. Effet du milieu de culture sur l'adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru sur les surfaces solides selon l'approche DLVO étendue :**

Dans cette étude, les souches de *Staphylococcus aureus* sont cultivées dans trois milieux de culture différents : le milieu LB, le lait entier et le lait écrémé pour bien se rapprocher aux conditions utilisées dans les industries laitières. La prédiction de l'adhésion des 6 souches est effectuée sur 5 supports : le verre, l'acier inoxydable 304, l'acier inoxydable 316l, le polyéthylène et le polystyrène. Les résultats de l'adhésion prédictive sont présentés dans les figures 37, 38 et 39.

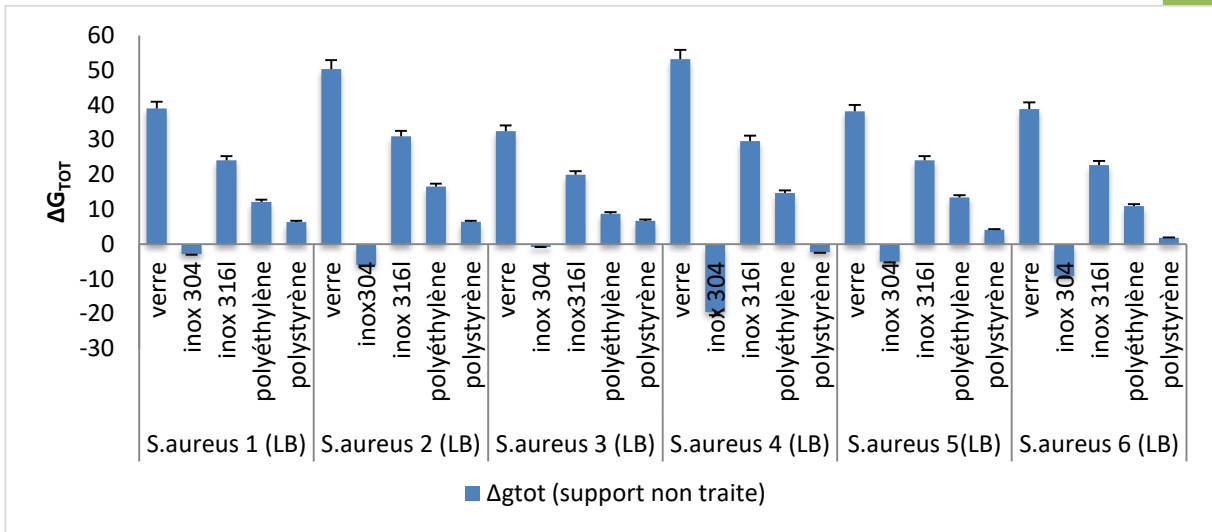


Figure 42: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports.

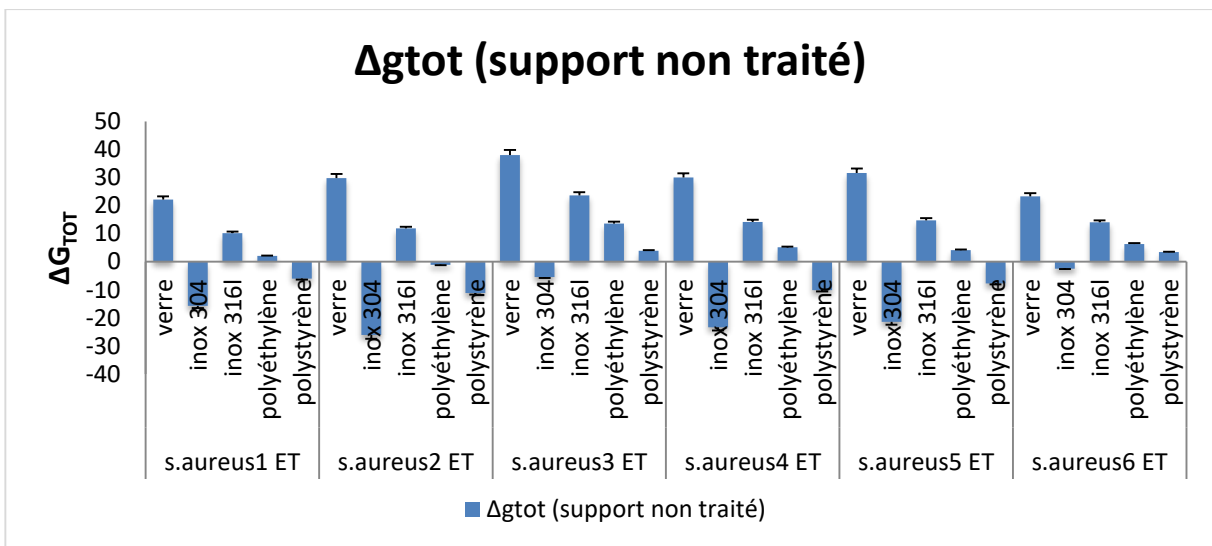
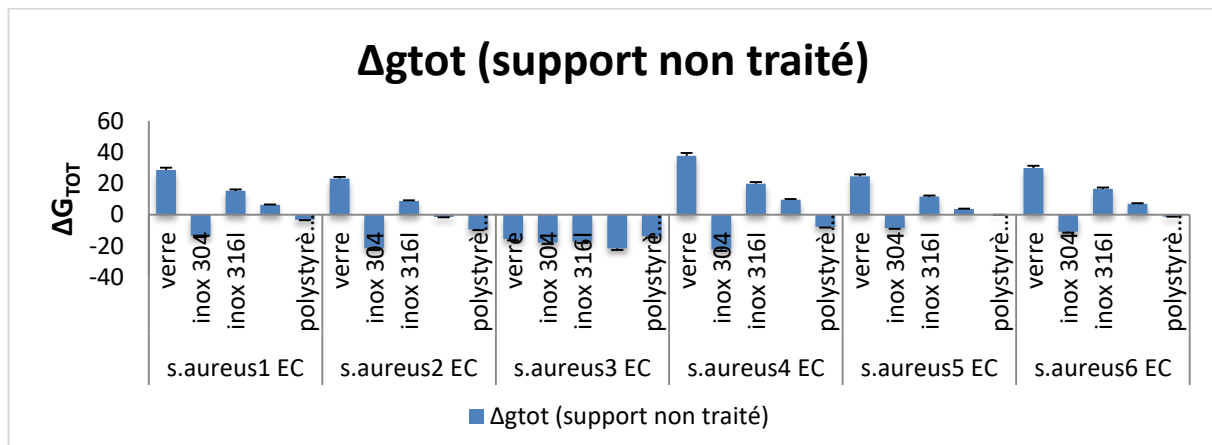


Figure 43: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait entier sur les 5 supports



**Figure 44: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait écrémé sur les 5 supports**

D’après l’approche DLVO étendue, l’adhésion des cellules bactériennes n’est pas énergétiquement favorisée que lorsque  $\Delta G_{TOT}$  est négative (Busscher 1984). On considère que l’adhésion théorique des *Staphylococcus aureus* isolées du lait cru, sur les différents supports étudiés est défavorable si  $\Delta G_{TOT}$  est positive ( $\Delta G_{TOT} > 0$ ) et favorable si  $\Delta G_{TOT}$  est négative ( $\Delta G_{TOT} < 0$ ).

Les résultats de l’adhésion prédictive des 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports montrent que l’adhésion est défavorable pour toutes les souches sur tous les supports sauf sur l’inox 304 (fig 37). Lorsque ces mêmes souches sont cultivées dans le lait UHT entier, en plus de l’inox 304, l’adhésion devient aussi favorable sur le polystyrène sauf pour la souche *S. aureus* 6 (fig. 38). Dans le cas de la culture des souches dans le lait UHT écrémé, la souche *S. aureus* 3 présente une adhésion favorable pour tous les supports (fig. 39).

### III. Effet du conditionnement des supports par le lait UHT entier

Les résultats du conditionnement des supports par le lait UHT entier ont montré que l’adhésion théorique des souches de *Staphylococcus aureus* cultivée dans le LB reste toujours défavorable sur le polystyrène et le verre. Par contre, pour l’acier inoxydable 316l, l’acier inoxydable 304 et le polyéthylène, l’adhésion est favorable pour les souches *S. aureus* 3, *S. aureus* 4 et *S. aureus* 6 (fig 40).

Lorsque ces mêmes souches sont cultivées dans le lait UHT entier, l’adhésion théorique devient favorable sur la majorité des supports étudiés. Pour le polystyrène, seul la souche *S. aureus* 2 présente une adhésion favorable. L’adhésion sur le verre reste défavorable pour les souches *S. aureus* 3 et *S. aureus* 6 (fig 41).

Après culture des souches dans le lait écrémé, l’adhésion prédictive des souches *S. aureus* 3 et *S. aureus* 6 est défavorable sur tous les supports. L’inox 304 présente une adhésion prédictive défavorable à l’inverse des résultats obtenus après culture des souches dans le milieu LB et le lait UHT entier (fig 42)

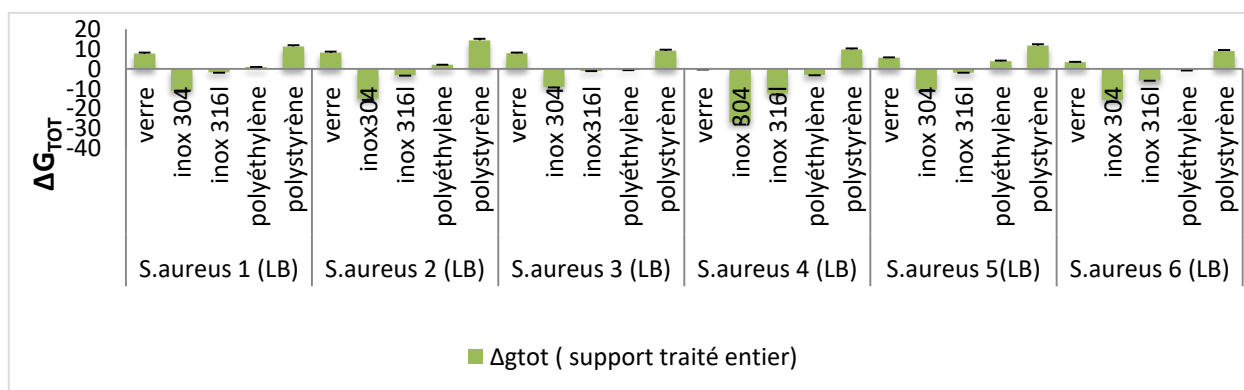


Figure 45: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports traités par le lait entier

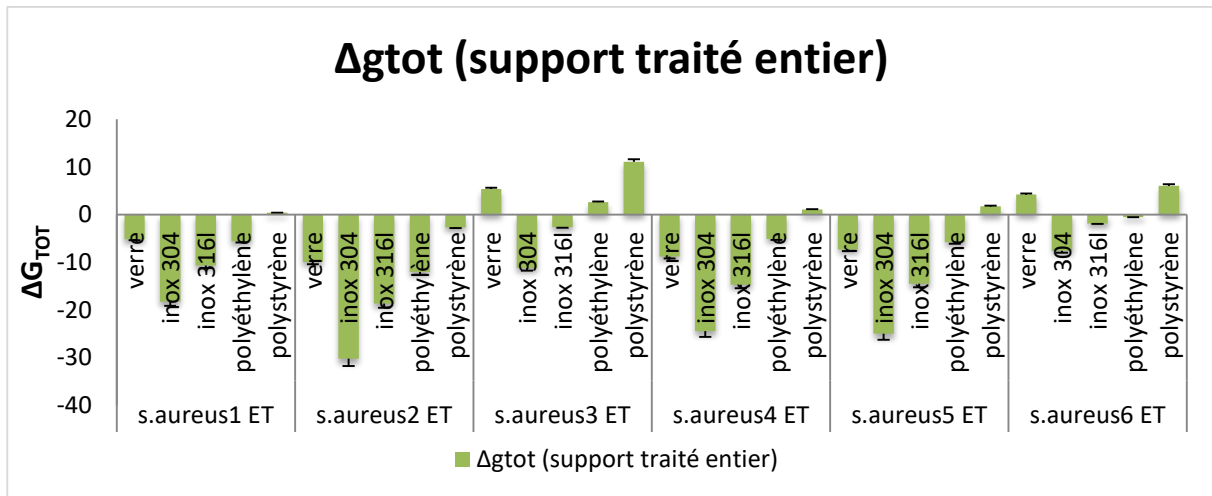


Figure 46: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait entier sur les 5 supports traités par le lait entier

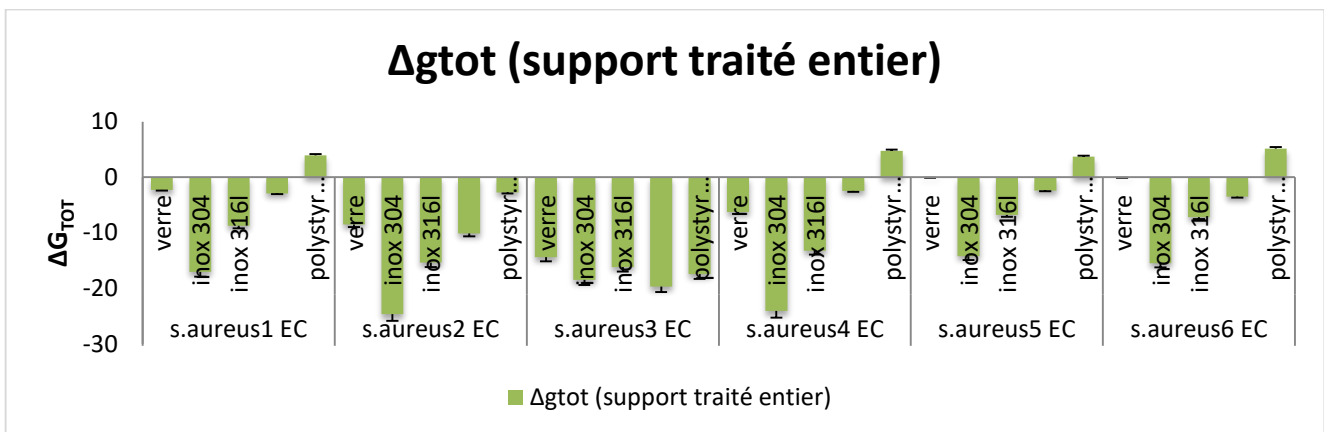


Figure 47 : Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait écrémé sur les 5 supports traités par le lait entier

#### IV. Effet du conditionnement des supports par le lait UHT écrémé

Les résultats du conditionnement des supports par le lait écrémé ont montré que l’adhésion théorique des souches de *Staphylococcus aureus*, cultivée dans le milieu LB, reste toujours défavorable pour tous les supports étudiés (fig 43). Lorsque ces mêmes souches sont cultivées dans le lait UHT entier, l’adhésion théorique des souches reste défavorable sur la majorité des supports étudiés. D’autre part, l’adhésion est favorable sur le verre, l’inox 316l, et le polyéthylène pour les souches *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *S. aureus* 4, et *S. aureus* 5 (Fig 44).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Après culture des souches dans le lait écrémé, l'adhésion prédictive est favorable pour la majorité des supports étudiés sauf le polystyrène pour les souches *S. aureus* 1, *S. aureus* 4, *S. aureus* 5, et *S. aureus* 6 qui présente une adhésion prédictive défavorable (fig 45).

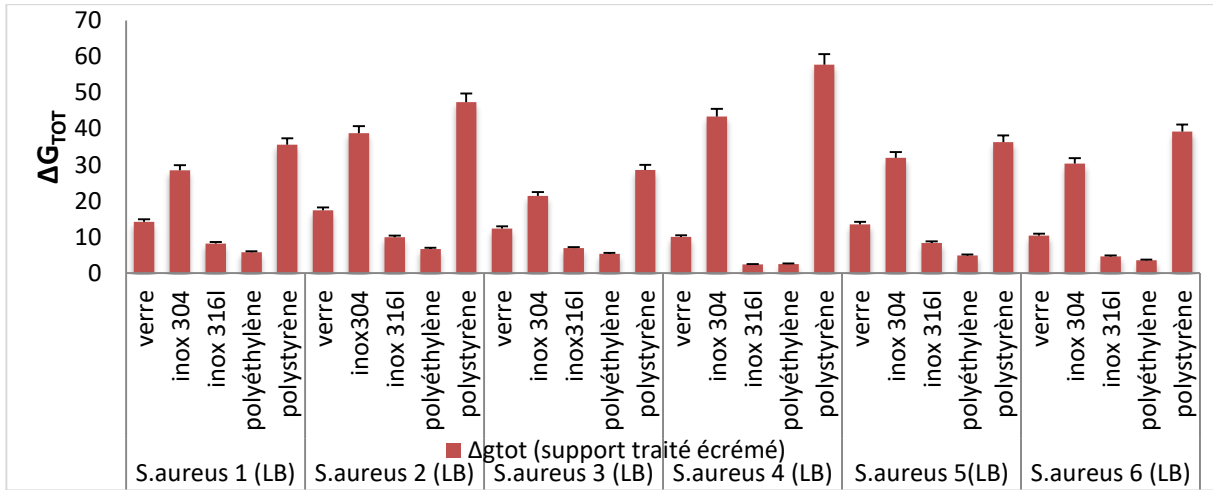


Figure 48: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le milieu LB sur les 5 supports traités par le lait écrémé.

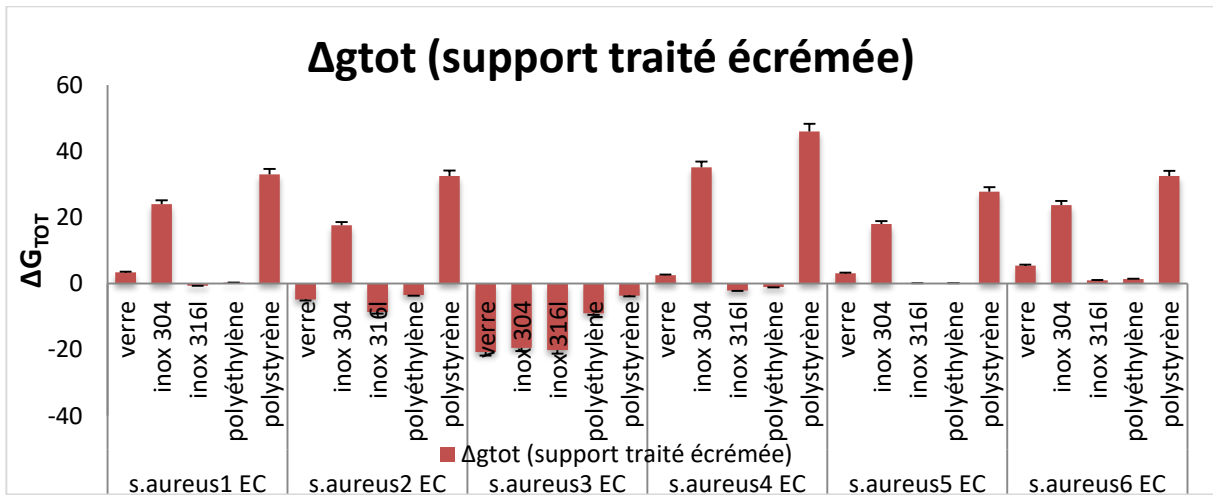
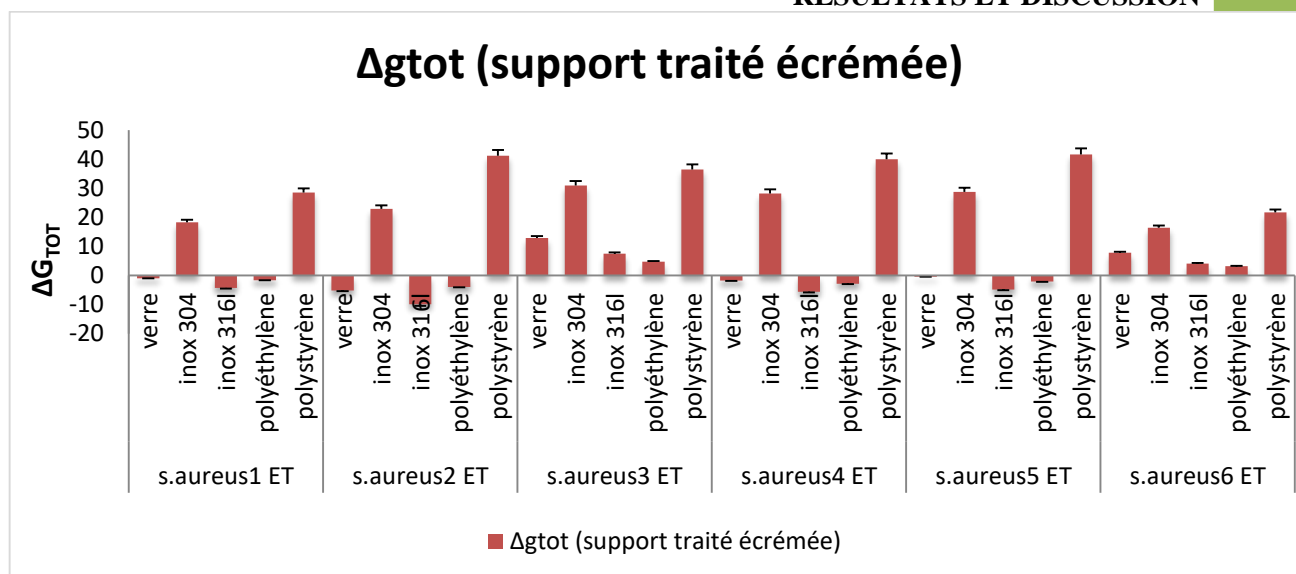


Figure 49: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait écrémé sur les 5 supports traités par le lait écrémée



**Figure 50: Adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait entier sur les 5 supports traités par le lait écrémé**

## V. Discussion

Le lait est un exemple d'un milieu hétérogène, c'est un mélange complexe de nombreux types de protéines, de graisses, de minéraux et de micro-organismes endogènes. Dans l'environnement de la filière alimentaire, il est admis que l'adhésion microbienne est généralement précédée par l'adsorption de molécules organiques et inorganiques formant un film de conditionnement. Ce dernier modifie les propriétés physico-chimiques de la surface du substrat (Chmielewski & Frank, 2003 ; Lorite et al., 2011). L'utilisation d'un modèle théorique pour la prédiction de l'adhésion bactérienne aux différents supports peut constituer un outil d'aide pour comprendre l'effet du conditionnement, et plus spécifiquement par le lait UHT sur l'adhésion prédictive de *Staphylococcus aureus* sur des supports solides.

Les résultats de l'effet du milieu de culture sur l'adhésion prédictive de 6 souches de *Staphylococcus aureus*, isolées du lait cru, sur les supports étudiés, ont montré que l'adhésion des souches cultivées dans le milieu LB est défavorable sur tous les supports, à l'exception de l'inox 304, où l'adhésion est toujours favorable quel que soit le milieu de culture. Ceci pourrait être lié au caractère hydrophobe de ce support (voir chapitre 2). Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux antérieurs, qui ont démontré une adhésion accrue des cellules végétatives bactériennes sur des matériaux hydrophobes (Rosenberg & Kjelleberg, 1986).

Lorsque les souches de *Staphylococcus aureus* sont cultivées dans le lait UHT, l'adhésion prédictive devient aussi favorable pour toutes les souches sur la surface du polystyrène sauf les souches *S.aureus* 3 et *S.aureus* 6 cultivées dans le lait UHT entier. La souche *S.aureus* 3 cultivée dans le lait UHT écrémé, présente une adhésion favorable pour tous les supports. Par ailleurs, les résultats relatifs au calcul des énergies libres d'adhésion  $\Delta G_{tot}$  (Annexe 3 et 4) montrent qu'une valeur positive de la composante acide-base ( $\Delta GAB$ )

implique une adhésion défavorable ou faible sur le verre et les aciers inoxydables étudiés (304,316l). Ceci est en accord avec les résultats d'Elabed qui a rapporté que la variabilité de l'énergie totale de l'adhésion entre les différentes essences de bois est essentiellement due à la composante acide-base (El Abed, 2012, El abed S., 2011).

Le conditionnement des surfaces étudiées par le lait UHT (écrémé, entier), a modifié l'adhésion prédictive des 6 souches de *S.aureus* cultivées dans les trois types de milieux de culture. Ce conditionnement a rendu l'adhésion favorable pour la majorité des supports traités, selon les souches et la nature du support étudiés. Cela est en contradiction avec les résultats trouvés par Barnes qui a signalé le rôle du lait ou des composants du lait dans l'inhibition de l'adhésion des bactéries (Barnes et al. (1999). Le type de lait utilisé influence aussi l'énergie totale ( $\Delta G_{tot}$ ), des 6 souches de *S.aureus* sur les surfaces. En effet, les supports traités par le lait entier favorisent d'avantage l'adhésion prédictive que ceux traités par le lait écrémé. Ceci pourrait être lié à la présence de la matière grasse.

Les études réalisées sur l'effet des composants du lait sur l'adhésion étaient axées sur l'effet des protéines du lactosérum (Peng, Tsai, & Chou, 2001). Ils ont indiqué que ses composants pouvaient réduire ou augmenter l'adhésion. Les résultats obtenus ici montrent que le composant gras pourrait également influencer l'adhésion des bactéries sur des surfaces inertes.

## **VI. Conclusion :**

L'adhésion prédictive de 6 souches de *S.aureus* sur la surface de l'inox 316l, l'inox 304, le polyéthylène, le polystyrène, et le verre dépend de milieu de culture et le film de conditionnement. Une compréhension de l'effet de la matière grasse sur ces supports communément utilisé dans l'environnement de la transformation alimentaire est essentielle, afin de trouver des moyens de prévenir de la contamination et d'élaborer des stratégies de lutte. Ainsi, le composant gras doit être considéré comme un facteur important qui pourrait affecter l'adhésion des *Staphylococcus aureus* et qui nécessite une étude plus approfondie afin de comprendre son rôle dans l'adhésion. L'utilisation du modèle théorique pour la prédiction de l'adhésion bactérienne aux différents supports couramment utilisés dans l'industrie laitière peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour la sélection des matériaux peu propice à la colonisation microbienne, afin de prévenir toutes sources de contamination et/ou d'altération du produit finis.

*CHAPITRE IV :*  
*Influence de conditionnement par le lait sur l'adhésion  
expérimentale de Staphylococcus aureus sur des  
supports solides*



## I. Introduction :

Chaque année, la contamination microbienne coûte plusieurs millions de dollars à l'industrie alimentaire, liée à des pertes importantes de produits qui ne répondent pas aux attentes des consommateurs : des produits dégradés qui contiennent un nombre inacceptable de contaminants tant en termes de dégradation que de pathogénicité (Hussain & Dawson, 2013 ; Mead, 2004).

Dans l'industrie laitière, la bio-adhésion pose de sérieux problèmes tels que l'impédance du flux de chaleur à travers les surfaces en acier (par exemple les zones de refroidissement et de chauffage), l'augmentation de la résistance au frottement du liquide sur la surface, ainsi que l'augmentation du taux de corrosion des surfaces entraînant des pertes d'énergie (Teh, Flint, Brooks, & Knight, 2015).


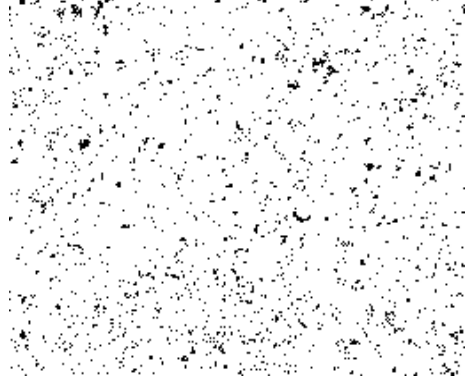
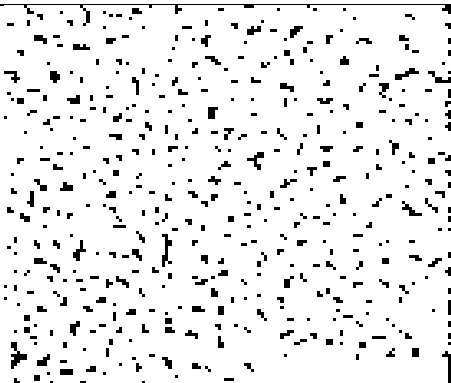
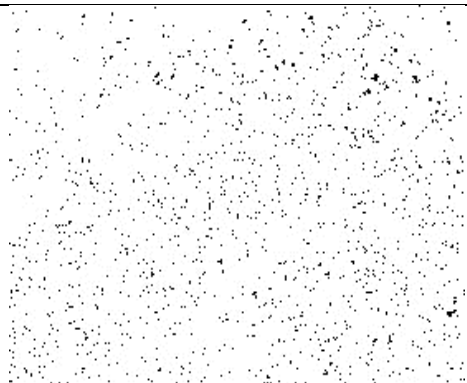

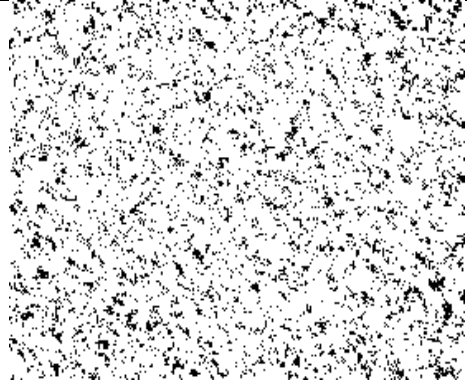
De nombreuses études ont montré que l'encrassement est provoqué par le dépôt de composantes laitières, principalement des protéines et des minéraux, sur la surface de la membrane, en particulier lors de la filtration des liquides laitiers (James et al. 2003). En effet, une fois qu'une surface de matériau est exposée à un milieu aqueux contenant des nutriments, ses propriétés interfaciales sont souvent modifiées par le fluide environnant grâce à l'adsorption de composés organiques ((Chmielewski and Frank 2003)(Fard 2010)(Sheng et al. 2008)(Eileen B. Somers and Amy C. Lee Wong 2004). Plusieurs auteurs ont étudié le phénomène d'adhésion dans le but de le comprendre, de l'expliquer et par conséquent de le moduler. La compréhension de ce phénomène nécessite l'étude de tous les éléments qui interviennent dans ce phénomène. Des auteurs (van Loosdrecht et al. 1987)(Dickson and Koohmaraie 1989)(Hamadi et al. 2005)(Hamadi et al. 2012) ont étudié les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire pour expliquer ce phénomène et d'autres se sont intéressés aux propriétés physico-chimiques de la surface du substrat (Boulangé-Petermann et al. 1997)(Ong et al. 1999). L'étude des caractéristiques du milieu environnant a aussi pris une grande attention (Stanley 1983)(Jana et al. 2000)(Gallardo-Moreno et al. 2002)(Hamadi et al. 2004).

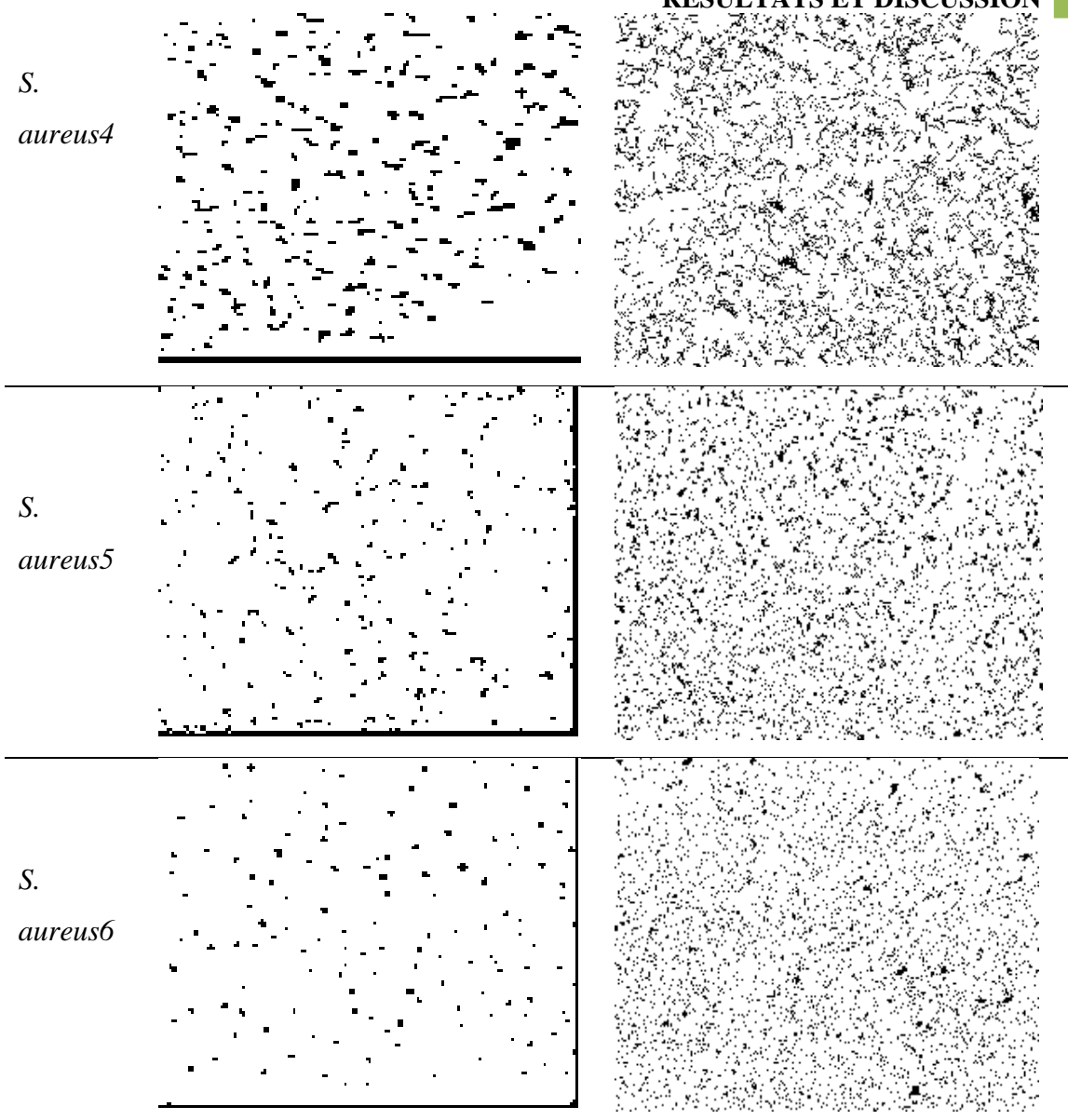
Pour une meilleure compréhension de la biocontamination dans l'industrie laitière, il est très important d'étudier la modification des propriétés physico-chimiques des surfaces, par la présence de composants du lait, et proposer des solutions pour éradiquer, voir éviter cette contamination. L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet du conditionnement par le lait UHT sur l'adhésion expérimentale des *Staphylococcus aureus*, isolée de lait cru et cultivées dans le lait UHT, sur le polystyrène et le verre. Pour avoir des résultats plus réalistes que le milieu de laboratoire, les essais de l'adhésion sont réalisés sur le support traité par le même type de lait qui a servi comme milieu de culture pour les souches.

**II. Effet de la nature du milieu de culture sur l'adhésion des souches de *Staphylococcus aureus* sur le verre et le polystyrène :**

**Le verre**

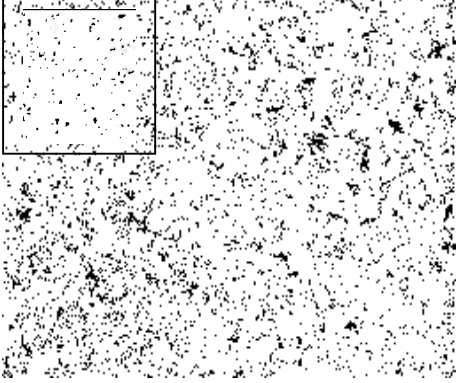
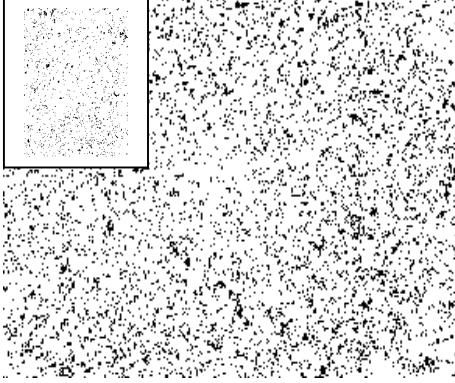
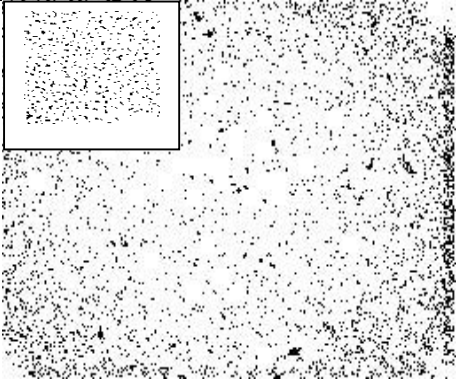
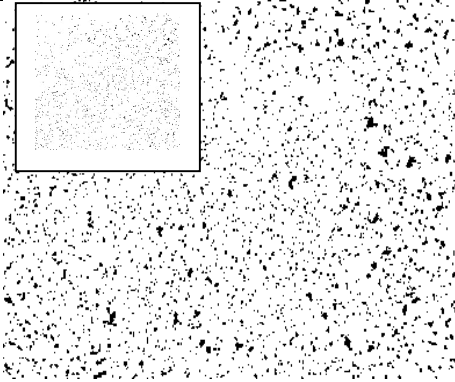
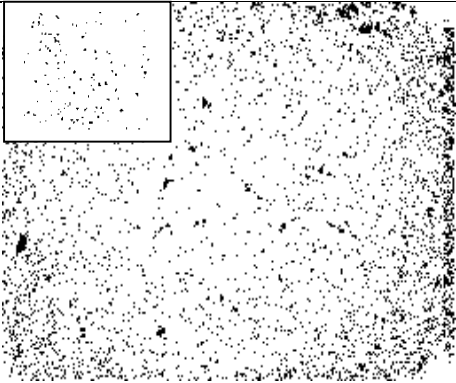
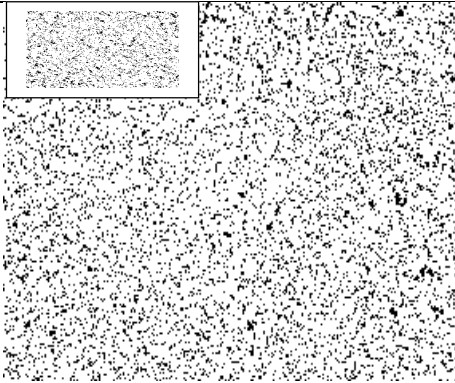
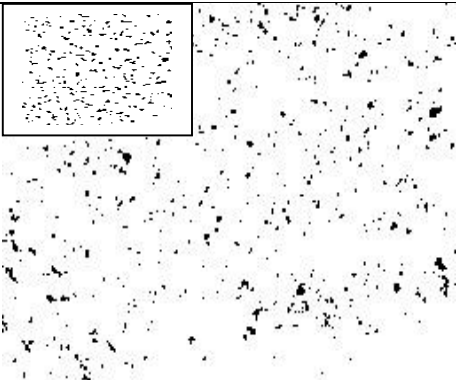
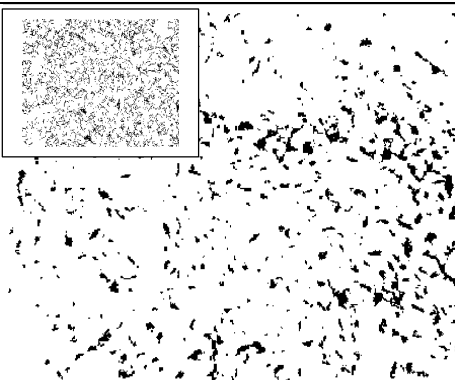
Les résultats de ces essais sont présentés dans les figures 46, 47

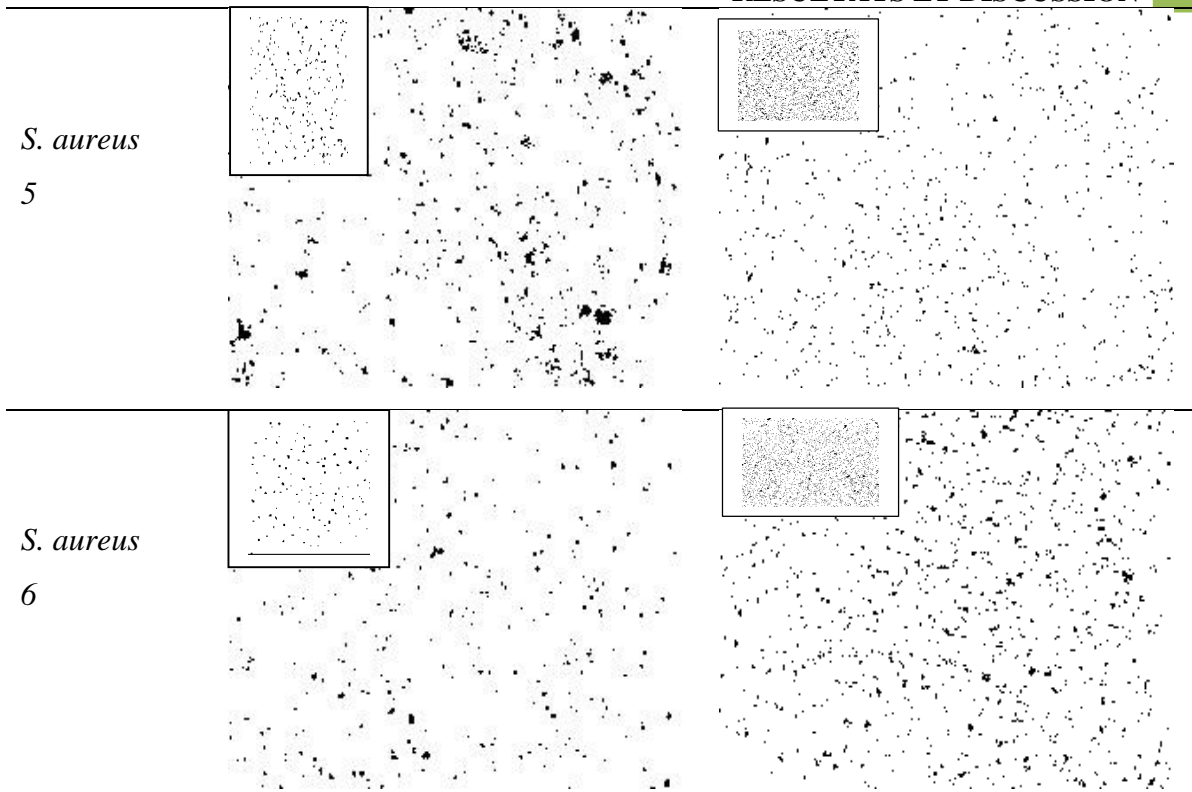
Strains	L'adhésion de <i>S.aureus</i> cultivée dans le lait entier sur le verre	L'adhésion de <i>S.aureus</i> cultivée dans le lait écrémé sur le verre
<i>S. aureus</i> 1		
<i>S. aureus</i> 2		
<i>S. aureus</i> 3		



**Figure 51: Observation microscopique des cellules de *staphylococcus aureus* cultivées dans le lait UHT entier et écrémé adhérees sur le verre non traité (Gx400)**

Sur la base des traitements des observations d'adhésion, une analyse des résultats obtenus, on constate que l'adhésion microbienne des souches de *S.aureus* varie largement en fonction du temps. En effet, le traitement de la surface du verre avec le lait écrémé favorise l'adhésion

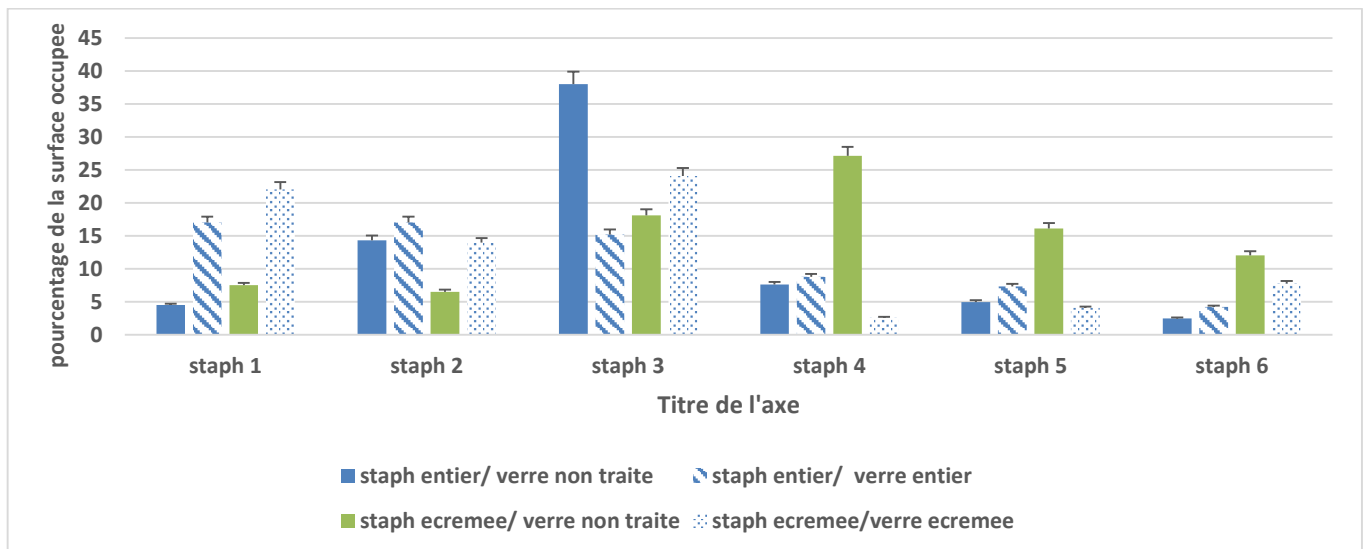
	L'adhésion de <i>S.aureus</i> cultivée dans le lait entier sur le verre traité par le même type du lait	L'adhésion de <i>S.aureus</i> cultivée dans le lait écrémé sur le verre traité par le même type du lait
<i>S. aureus</i> 1		
<i>S. aureus</i> 2		
<i>S. aureus</i> 3		
<i>S. aureus</i> 4		



**Figure 52: Observation microscopique des cellules de *Staphylococcus aureus* cultivées dans le lait UHT entier et écrémé et adhérentes sur le verre traité par le même type du lait (Gx400)**

Sur la base des traitements des observations d'adhésion, on constate que l'adhésion du staphylococcus aureus traitées par le même type du lait traitant la surface du verre, diminue en fonction du temps.

Le traitement des images par MATLAB nous a permis d'obtenir les pourcentages des surfaces occupées par les cellules (fig 48).



**Figure 53: Influence de conditionnement par le lait sur l'adhésion expérimentale de *Staphylococcus aureus* sur le verre**

Nous avons évalué le risque de bio contamination de deux situations différentes de verre traité avec du lait écrémé et du lait entier pendant 3h. Les résultats de l'adhésion des six souches de *S. aureus* cultivées dans le lait sur du verre non traité et traité montrent des différences en termes de degré de fixation des bactéries sur ce support.

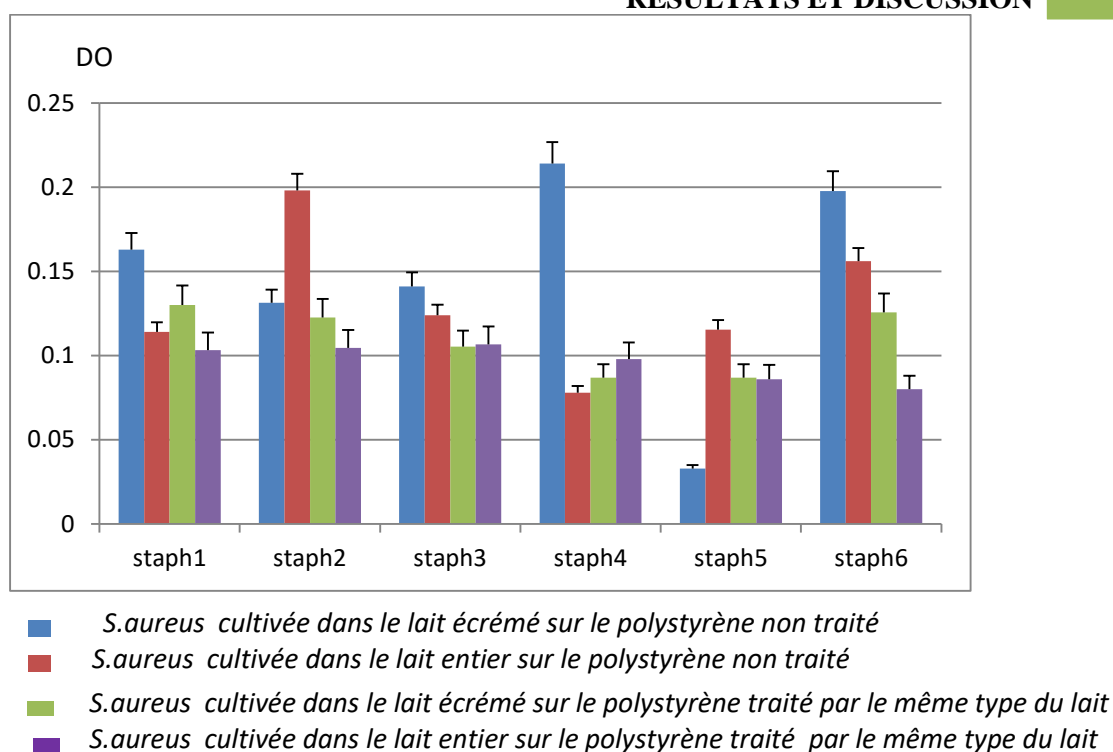
L'adhésion des six souches de *S. aureus* sur le verre non traité montre une bonne adhérence de toutes les souches (figures 46 et 48). Par la suite, Lorsque ces souches sont cultivées dans le lait écrémé, l'adhérence était élevée, avec des pourcentages de la surface occupée respectivement de 7,33 %, 7,11 %, 19,21 %, 26,09 %, 17,07 % et 11,54 %. Cependant, lorsqu'elles sont cultivées dans le lait entier, elles ont montré une adhérence moins importante, sauf la souche 2 (4,59%, 13,12 %, 2,77%, 8,5%, 4,95% et 2,89% (figure 47 et 48).

Dans le cas des surfaces en verre traitées avec du lait UHT, il faut noter que les bactéries n'adhèrent pas de la même manière que dans le cas des surfaces non traitées. Le pourcentage de surface occupée a augmenté pour les souches 1,2 et 3, et a diminué pour les souches 4,5 et 6. En outre, à l'exception de la souche 2, les souches cultivées dans le lait écrémé (pourcentage de surface occupée de 5% à 25 %), montrent toujours une adhérence plus importante que celles cultivées dans le lait entier (/SO de 3% à 17,5 %) (fig 47 et 48).

### **Le polystyrène**

Les résultats de ces essais sont présentés la figure 49





**Figure 54: Adhésion de six souches de *Staphylococcus aureus* cultivées dans deux types de lait sur le polystyrène non traité et traité**

D’après ces résultats, Les six souches de *Staphylococcus aureus* montrent une adhésion importante sur le polystyrène, notamment pour les souches cultivées dans le lait UHT entier (fig 41 et 42).

Le traitement des surfaces du polystyrène par les deux types du lait UHT (entier et écrémé), induit une diminution de l’adhésion pour les souches cultivées dans le lait entier.

### III. Discussion

Durant cette étude on a réalisé des tests d’adhésion de *Staphylococcus aureus* sur le verre et le polystyrène, non traités et traités par deux types de lait UHT (entier et écrémé), différents par leurs teneurs en matière grasse. Ces deux types de lait sont, utilisés comme milieux de culture. Ces conditions devraient nous donner des résultats plus réalistes que le milieu de laboratoire pour évaluer la fonction et l’influence de la composition des lipides dans le risque de contamination.

L’adhésion des six souches de *S.aureus* sur les deux supports non traité est forte. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d’autres auteurs (Hamadi et al. 2005b)(Herrera et al. 2007)(Oulahal et al. 2008).

Ces auteurs ont rapporté que l’espèce *Staphylococcus aureus* préfère adhérer sur des surfaces non traitées comme l’acier inoxydable. De plus, on a déjà montré que le verre ainsi que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* ont un caractère hydrophile (chapitre II), des études précédentes informent sur le caractère hydrophile de la surface du verre non traité (Hamadi et al. 2014) (Hamadi et al. 2009a). Les

## RESULTATS ET DISCUSSION

bases de la chimie affirment qu'une entité hydrophile s'attire naturellement vers une autre hydrophile et vice versa, ceci explique la forte adhésion de *Staphylococcus aureus* sur le verre non traité.

Le conditionnement par le lait UHT a modifié le comportement adhésif des six souches étudiées. Ces résultats sont en accord avec celles rapportées par (Barnes et al. 1999) qui ont observé que le pré conditionnement de la surface de l'acier inoxydable avec du lait ou des protéines individuelles du lait réduisait l'adhésion de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Serratia marcescens* à l'acier inoxydable après 2 h d'incubation.

Ainsi dans ce travail, le traitement du verre par le lait UHT a rendu les surfaces hydrophobes (chapitre 2). Ceci pourrait expliquer la diminution de l'adhésion des trois souches (4,5et6), mais pas l'augmentation des trois autres souches (1,2et3). Aussi sur le polystyrène non traité (hydrophobes). Des travaux précédents (McEldowney and Fletcher 1986)(Pratt-Terpstra et al. 1988) ont rapporté que l'hydrophobicité ne peut pas expliquer systématiquement les résultats de l'adhésion microbienne sur un support, et que les interactions acides–bases jouent un rôle très important dans le phénomène d'adhésion (Henriques et al. 2004)(Hamadi et al. 2005a)(Hamadi et al. 2008). Suivant ces affirmations, l'adhésion de *S. aureus* sur le verre traité peut être due aux interactions acide-base. D'après (van Oss 1993), les protéines peuvent être adsorbées sur une surface très hydrophile, tel que le verre, même si les interactions électrostatiques sont répulsives ou insuffisamment attractives grâce aux interactions acido-basiques entre le fort caractère donneur d'électrons des protéines et le faible caractère accepteur d'électrons du verre. En se basant sur l'approche de van Oss (1993), nous pouvons déduire que l'adhésion de *S. aureus* au supports traités par le lait UHT (hydrophobes), peut-être dû, au moins en partie, aux interactions acide–bases entre la surface bactérienne qui possède un caractère donneur d'électrons bien exprimé et les supports qui sont faiblement accepteur d'électrons.

La topographie de la surface est fortement discutée aussi comme l'un des très forts paramètres influençant l'adhésion microbienne sur une surface (Boulangé-Petermann et al. 1997)(Barnes et al. 1999)(Flint et al. 1997)(Kawai et al., 2000 Helbert et al., 2003 Mei et al., 2011). Le traitement des supports par du lait UHT (entier, écrémé) a augmenté fortement son caractère hydrophobe(chapitre II), et d'après Kouider et al., (2010), une augmentation de la rugosité provoque l'augmentation de l'hydrophobicité du support, alors sûrement les constituants du lait ( surtout les protéines et la matière grasse) ont été adsorbés à la surface du polystyrène et augmente la rugosité de la surface et par conséquence renforce le caractère hydrophobe des supports, cela peut expliquer pourquoi l'adhésion sur le polystyrène a diminué après son traitement avec du lait UHT. Des travaux précédents (Jamaa et al. 2009) rapportent que les propriétés physiques et chimiques de la surface change avec l'augmentation de la rugosité, et affirment aussi que la diminution de l'adhésion est causée par l'augmentation de la rugosité de la surface.



L'adhésion bactérienne peut diminuer ou augmenter avec l'augmentation de l'énergie des surfaces des substrats. Ce facteur dépend en grande partie des propriétés physique-chimiques de la bactérie, des substrats, et de la solution aqueuse.

#### **IV. Conclusion :**

Le phénomène d'adhésion est variable et dépend des conditions environnantes. Les résultats de ce chapitre, nous ont permis de constater que l'influence de traitement par le lait UHT, sur l'adhésion des *S.aureus* sur le verre et le polystyrène est fortement conditionnée par la nature de milieu de culture des bactéries ce qui peut intervenir favorablement ou défavorablement dans le phénomène d'adhésion microbienne.

L'adhésion microbienne des six souches de *S.aureus* étudiées sur les supports non traitée dépend des propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire et de la nature de milieu de culture utilisée (lait UHT).

Le comportement adhésif des six souches de *S.aureus* sur deux supports traitée par deux types du lait UHT ne peut être expliqué totalement par l'hydrophobicité, et dépendrait du caractère donneur/accepteur d'électron et de la rugosité.

L'approche théorique n'a pas pu totalement expliquer le phénomène d'adhésion expérimentale des six souches de *S.aureus* sur les deux supports (verre et polystyrène) traités par le lait UHT. D'autres interactions pourraient intervenir dans le processus d'adhésion et qui ne sont pas prises en compte dans l'approche théorique.

Nos résultats ont montré que le verre a la capacité de fixer plus de cellules bactérienne que le polystyrène, ça signifie que pour les industries agroalimentaire laitiers ayant le problème de la formation des biofilms due à *S. aureus*, l'utilisation de polystyrène est plus hygiénique et moins risquée que l'utilisation du verre.

*Chapitre V :*  
*Effet du temps de conditionnement par deux types*  
*de lait UHT sur La cinétique de l'adhésion de S.*  
*aureus sur la surface du verre*

## I. Introduction :

Le développement des biofilms microbiens sur les surfaces solides pose de nombreux problèmes dans le secteur industriel, médical, environnemental et agroalimentaire. Dans ce dernier, la présence des biofilms sur la chaîne alimentaire peut également conduire à la contamination des denrées engendrant des problèmes sanitaires très importants. Ces problèmes sont liés au fait que la formation d'un biofilm constitue une stratégie de survie étonnamment efficace conférant aux microorganismes la capacité de résister aux différents stress environnementaux tels que les traitements de nettoyage et de désinfection.

Dans l'industrie laitière, la surface des matériaux en contact avec le lait ou avec les résidus de lait pourrait changer les propriétés physico-chimiques de cette surface et par conséquent influencer l'adhésion bactérienne qui est l'étape clé de la formation des biofilms.

Dans le but de garantir l'hygiène des surfaces, la prise en compte de l'état « biofilm » est donc nécessaire. Cela passe par une meilleure compréhension de l'implication de ces structures dans les phénomènes de résistance aux traitements de la surface.

Dans la stratégie de bloquer et de défavoriser la formation de biofilm, notre travail dans ce chapitre a fixé comme objectifs :

- L'étude de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques en fonction du temps de conditionnement du verre par deux types de lait UHT (entier, écrémé).
- L'étude de la cinétique de l'adhésion de *S.aureus* au support du verre traitée par le lait UHT écrémé ou entier.

## II. Effet du temps de traitement par deux types de lait UHT sur les propriétés physicochimiques de la surface du verre :

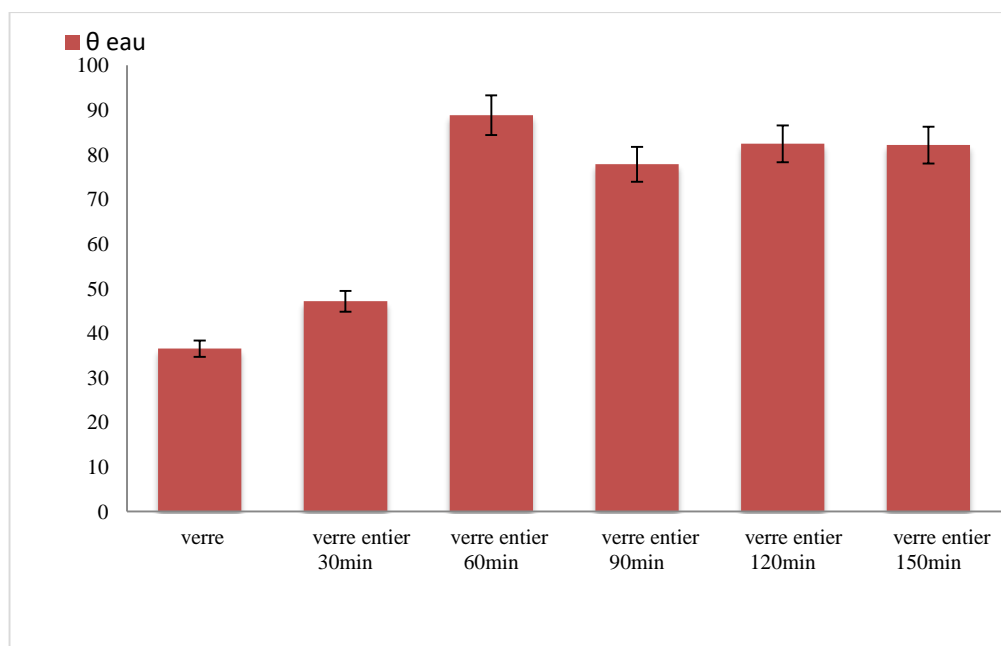
Les mesures de l'angle de contact ont été effectuées à l'aide d'un goniomètre (Instruments GBX, France). Les valeurs de tension superficielle ont été mesurées après traitement des échantillons avec deux types de lait UHT (entier, écrémé) à 25°C. Les résultats sont présentés dans le tableau 12 :

**1. Effet du temps de traitement par le lait entier :**

Tableau 12: Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ), d'accepteurs d'électron ( $\gamma^+$ ) et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ )s du verre traité par lait entier en fonction du temps.

	Contact angles (°)			Surface tension: components and paramètres (mJ/m <sup>2</sup> )			$\Delta G_{iwi}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
	$\theta$ Diodométhane	$\theta$ Formamide	$\theta$ water	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	
<b>temoin</b>	46,4	45,8	36,5	36,3	0	54	<b>42,7</b>
<b>30 min</b>	30	58,5	47,1	44,2	1,8	53,3	<b>25,4</b>
<b>1h</b>	24,7	51,5	88,8	46,3	0,4	0,2	<b>-90,3</b>
<b>1h30</b>	52,2	41,2	77,8	33	4,2	1,9	<b>-46,2</b>
<b>2h</b>	28,1	72,7	82,4	45	2,3	12	<b>-30,7</b>
<b>2h30</b>	21,2	45,9	82,1	47,4	0,5	1,3	<b>-77,6</b>

**a. L'hydrophobicité :**



**Figure 55: Effet du temps de traitement sur hydrophobicité qualitative ( $\theta$  eau) de la surface du verre traitée par le lait UHT entier.**

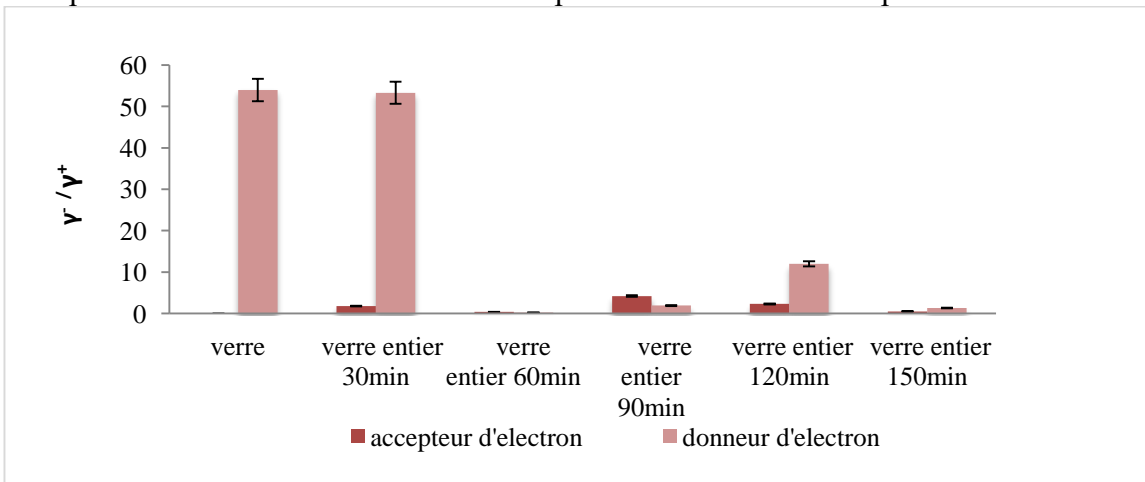


**Figure 56: effet du temps de traitement sur l’hydrophobicité quantitative du verre traité par le lait UHT entier.**

En Considérant les résultats de l’angle de contact de l’eau, le verre à un caractère qualitativement et quantitativement hydrophile ( $\theta_{\text{eau}} = 36.5$  ;  $\Delta G_{iwi} = 42.7 \text{ mJ.m}^{-2}$ ). Après 30 min de contact avec le lait UHT entier, le verre reste hydrophile ( $\theta_{\text{eau}} = 47,1$  ;  $\Delta G_{iwi} = 25,4 \text{ mJ.m}^{-2}$ ). En prolongeant le temps de contact, la surface du verre devient hydrophobe ( $\theta_{\text{eau}} > 77$  ;  $\Delta G_{iwi} < 0$ ).

**b. caractère donneur/accepteur d’électron**

La figure 52 présente les résultats de l’effet du temps de traitement du verre par le lait UHT entier



**Figure 57: Effet du temps de traitement sur le caractère donneur-accepteur d’électron du verre traité par le lait entier.**

Le verre présente un caractère donneur d’électrons élevé ( $54 \text{ mJ/m}^2$ ) et un caractère accepteur d’électrons nul. Après 30min de traitement le caractère accepteur d’électron a augmenté ( $1,9 \text{ mJ/m}^2$ ). A

partir de 60 min de traitement, le caractère donneur d'électron diminue (presque nul après 150min) et le caractère accepteur d'électron augmente.

**5. Effet du temps de traitement par le lait écrémé :**

Tableau 13: L'Angle de contact par rapport aux différents solvants, composantes de Van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), composantes donneurs d'électrons ( $\gamma^-$ ), d'accepteurs d'électrons ( $\gamma^+$ ) et l'énergie libre de la surface ( $\Delta G_{iwi}$ )s du verre traiter par lait écrémé en fonction du temps.

Souches	Contact angles (°)			Surface components and paramètres (Mj/m <sup>2</sup> )			tension: $\Delta G_{iwi}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
	$\theta$ Diiométhane	$\theta$ Formamide	$\theta$ Water	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	
témoin	46,4	45,8	36,5	36,3	0	54	42,7
30 min	54,7	59	81,6	31,6	0,8	4,8	-49,1
1h	42	54,1	77,7	38,6	0,3	5,9	-51,8
1h30	34,4	54,2	79	42,3	0,1	5,1	-59,4
2h	49,5	49	71,8	34,5	1,2	8,6	-36,3
2h30	29,6	70,5	76,5	44,44	2,2	17,9	-19,7

**a. hydrophobicité**

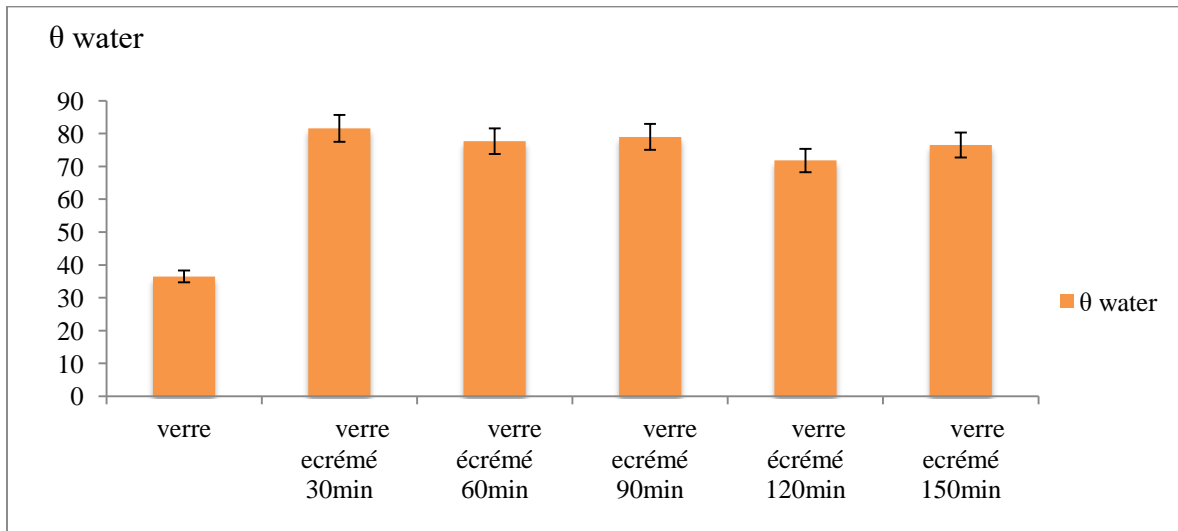
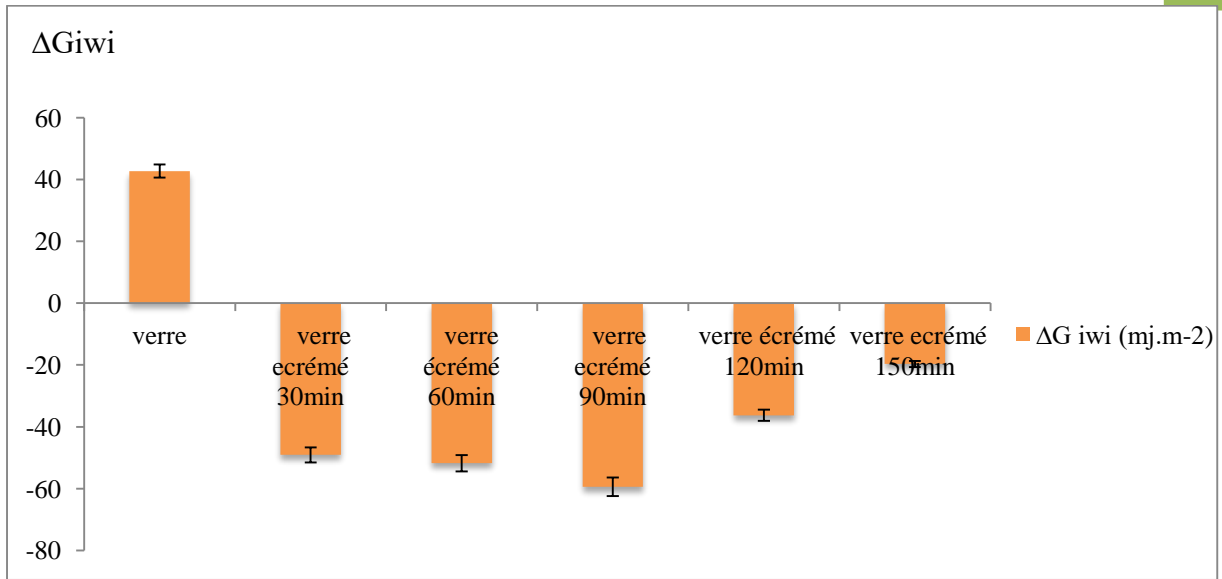


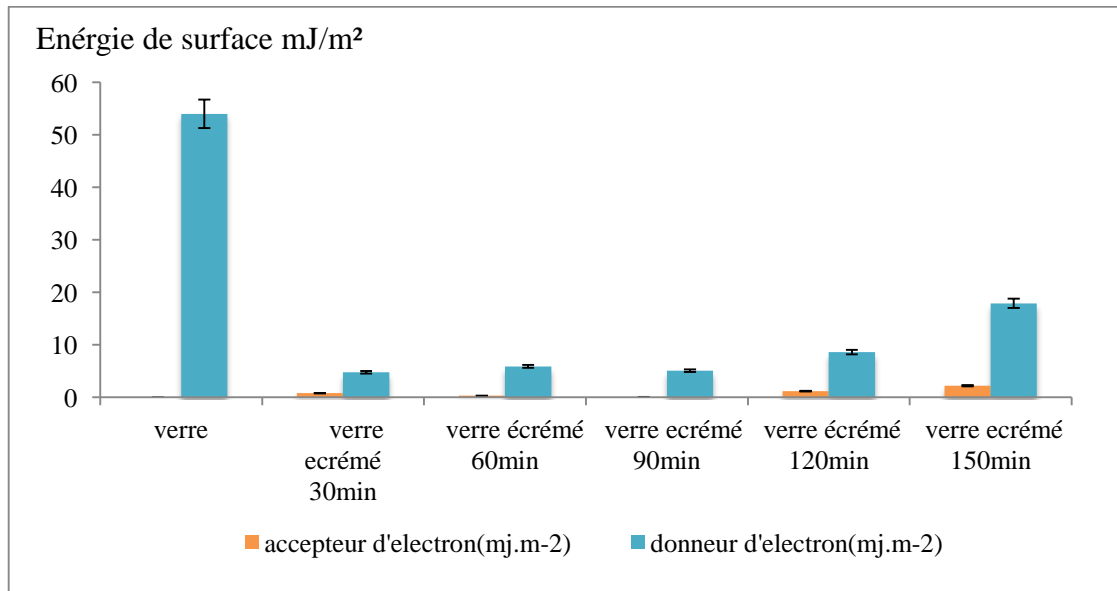
Figure 58: Effet du temps de traitement de l'hydrophobicité du verre traité par lait UHT écrémé selon l'approche qualitative.



**Figure 59: Effet du temps de traitement sur l'hydrophobicité quantitative du verre traité par le lait UHT écrémé.**

La surface du verre devient quantitativement et qualitativement hydrophobe à partir de 30min de traitement par le lait UHT écrémé ( $\theta_{eau} > 71$  ;  $\Delta G_{iwi} = < 0$ ).

**b. caractère donneur/accepteur d'électron**



**Figure 60: Effet du temps de traitement sur le caractère donneur-accepteurs d'électron du verre traite par le lait écrémé**

D'après les résultats présentés, On observe qu'après 30 min de contact avec le lait UHT écrémé ; le caractère donneur d'électron de la surface du verre diminue et le caractère accepteur d'électron augmente.

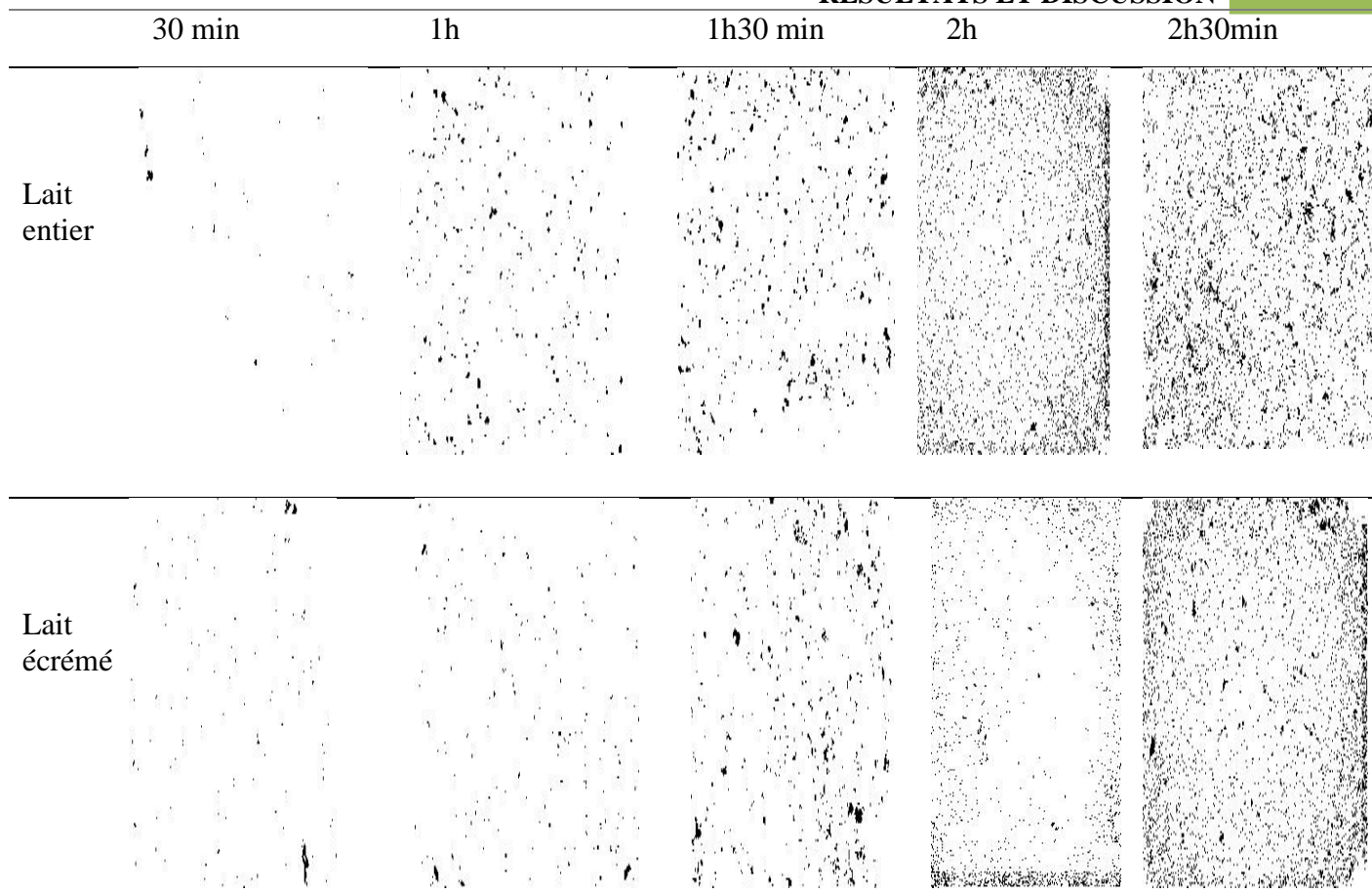
## 6. Discussion :

Les valeurs de tension superficielle ont été mesurées, après traitement du verre avec deux types de lait UHT (entier et écrémé). Les résultats obtenus montrent un changement important des propriétés physicochimiques quel que soit le type du lait, le verre change son caractère hydrophile en hydrophobe après 60 min de contact avec le lait entier et 30 min de contact avec le lait UHT écrémé. Le degré de changement dépend de type du lait qui sera plus rapide avec le lait écrémé. Des variations importantes dans le caractère donneur d'électron ont été détectées. En effet, après le contact du verre avec les deux types du lait UHT, le caractère donneur d'électron diminue et celui accepteur d'électron légèrement augmente. Ces changements dépendent du type de lait ; ils sont plus importants lorsque le verre est traité par le lait entier. Ceci pourrait être expliqué par la quantité de composants gras contenus dans le lait, le donneur d'électron et l'accepteur d'électron augmente et diminue respectivement avec la diminution de quantité de composant gras. Les modifications observées sur les propriétés du verre après traitement avec les deux types du lait UHT (entier et écrémé) seraient dûes aux composants du lait y compris des protéines et des graisses adsorbées sur ce substrat (Rosmaninho et al. 2007). Par ailleurs, Rubio et al. (Rubio et al. 2002) ont montré que les modifications de la structure les protéines adsorbées sur la surface. Ainsi que la variation dans le niveau des propriétés physico-chimiques, pourrait être liée au type de composant adsorbé à la surface et de la cinétique. Les résultats montrent aussi que l'hydrophobicité de la surface du verre a changée en fonction du temps de traitement par les deux types de lait UHT. On pourrait déduire qu'il y a une relation proportionnelle entre la quantité de matière grasse du lait et les caractéristiques physicochimiques du verre traité.

### **III. Effet du temps de traitement de verres par deux types du lait UHT sur l'adhésion de *Staphylococcus aureus* cultivée dans le lait UHT (entier et écrémé) :**

Les tests de l'adhésion de la souche 3 cultivée dans un type du lait UHT (entier ou écrémé) sont réalisés sur le verre traité par le même type du lait. Le temps de contact des cellules bactériennes avec le support est le même que celui du traitement du support.





**Figure 61: Effet du temps de traitement du verre par deux types de lait UHT sur l'adhésion de *S. aureus* cultivée dans le lait UHT (entier et écrémé) Images traitées par MATLAB G\*10.**

Le nombre de cellules qui adhèrent au verre traité par le lait UHT (entier et écrémé) augmente progressivement en fonction du temps.

### 1. Discussions :

L'adhésion microbienne sur un substrat est souvent considérée comme le résultat des interactions physico-chimiques entre le substrat et la cellule microbienne. Ces interactions comprennent les interactions électrostatiques, les interactions de van der Waals et les interactions acide-base (donneur d'électrons, accepteur d'électrons). Nombreux travaux ont montré que l'hydrophobicité et le caractère donneur-accepteur d'électrons peuvent expliquer le phénomène d'adhésion selon l'approche thermodynamique ; les bactéries hydrophobes adhèrent d'avantage que les bactéries hydrophiles et elles ont tendance à adhérer préférentiellement sur un substrat hydrophobe, alors que les cellules hydrophiles ont tendance à adhérer sur un substrat hydrophile. Dans ce contexte plusieurs études montrent la capacité de *S. aureus* (hydrophile et un caractère donneur d'électron important) à adhérer facilement sur le verre (hydrophile et un caractère

## RESULTATS ET DISCUSSION

d'accepteur d'électron faible), c'est la combinaison des interactions acido-basique et les interactions hydrophiles-hydrophiles qui serait à l'origine de cette l'adhésion (Hamadi et al. 2005b)(Herrera et al. 2007) Marques et al ,2007 (Oulahal et al. 2008). Le rôle de l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électron paraissent, dans notre cas, ne pas être responsables de l'adhésion de *S. aureus* au verre traité par les deux types de lait (entier et écrémé) pour les temps de contacts (30 min jusqu'à 2h30min). Des travaux précédents (McEldowney and Fletcher 1986)(Pratt-Terpstra et al. 1988) ont rapporté que l'hydrophobicité ne peut pas expliquer systématiquement les résultats de l'adhésion microbienne sur un support et que les interactions acides-bases jouent un rôle très important dans le phénomène d'adhésion (Henriques et al. 2004) (Hamadi et al. 2005b) (Hamadi et al. 2008). (van Oss 1993) a rapporté que les protéines peuvent être adsorbées sur des surfaces très hydrophiles tel que le verre même si les interactions répulsives (électrostatiques) ou insuffisamment attractives (hydrophobe) grâce aux interactions acido-basique entre forte caractère donneur d'électron des protéines et faible caractère d'accepteur d'électron du verre. Suite au processus d'adhésion les bactéries peuvent proliférer pour former des biofilms qui deviennent de plus en plus épais en fonction du temps chose qui est bien prouvé par l'augmentation du nombre des cellules adhérentes à 2h30min d'adhésion en comparaison avec celui de 30 min. Donc autre facteur important dans le phénomène d'adhésion est le temps de contact des cellules bactériennes avec la surface comme le montre les résultats obtenus. La prévision de cette adhésion permet de nous informer sur le potentielle de contamination du verre en contact avec les deux types de lait. Certains travaux (Teixeira et al, 2005) sont basés sur la prévision théorique pour proposer des solutions aux problèmes de bio-contamination.

### IV.Conclusion :

Le temps de conditionnement du verre par le lait UHT entier ou écrémé influence ses caractéristiques physico – chimiques.

Le lait écrémé modifie l'hydrophobicité et le caractère donneur /accepteur d'électron de la surface du verre après juste 30 min de contact. Par contre le lait entier nécessite 60 min de contact pour que les caractéristiques physico – chimiques de la surface changent.

La cinétique de l'adhésion de *S.aureus* sur le verre traité par le lait UHT montre que le taux des cellules adhérentes augment avec le temps de contact et le temps de conditionnement. Ceci pourrait constituer un outil de maîtrise pour prévoir un programme convenable de nettoyage et désinfection, connaissant le temps nécessaire pour une contamination maximale dans les conditions industrielles.

## Conclusion générale

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons proposé un outil de simulation permettant de prédire les conséquences d'une primo-contamination de l'environnement et d'optimiser les mesures de maîtrise d'un procédé. Nous avons appuyé nos hypothèses par une étude bibliographique approfondie des différents phénomènes susceptibles de favoriser la dispersion d'une contamination dans l'industrie laitière. De plus, nous avons, au préalable, tenter de décrire la réalité industrielle en matière de contamination des produits et de l'environnement.

De la revue bibliographique a émergé la nécessité de tenir compte la particularité d'un milieu solide, telles que les surfaces de l'environnement industriel ou celles des produits en cours de production. Dans ce travail nous avons commencé par isoler six souches de *S.aureus* à partir du lait cru. Ces souches sont cultivées dans trois types de milieu de culture (LB, le lait UHT entier et écrémé) pour la suite des expériences. Ensuite nous avons déterminé, par la méthode de l'angle de contact les propriétés physico-chimiques (l'hydrophobicité, le caractère donneur d'électrons ( $\gamma^-$ ) et le caractère accepteur d'électrons ( $\gamma^+$ )) de la surface des bactéries isolées, et celles de 5 supports inertes couramment utilisés dans l'industrie laitière ; le verre, le polystyrène, le polyéthylène et les aciers inoxydables 304 et 316L. Nous avons, aussi, mis le point sur l'effet de conditionnement des surfaces étudiées par le lait UHT (entier, écrémé) sur les caractères physico-chimique de ces surfaces. La spectroscopie infrarouge nous a permis d'illustrer la nature moléculaire du film conditionnant. En fin nous avons étudié le comportement adhésif prédictif des six souches de *S.aureus* aux supports étudiés traités et non traités par le lait UHT (entier, crème) .le verre a été choisi comme support pour étudier la cinétique d'adhésion expérimentale de *Staphylococcus aureus* avant et après traitement.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons trouvé que les six souches de *S.aureus* ont un caractère relativement hydrophile quel que soit le milieu de culture, à l'exception de la souche numéro 3 qui présente un caractère hydrophobe lorsqu'elle est cultivée dans le lait UHT entier et crème.

Les résultats montrent, aussi, que les 5 supports inertes étudiés présentent des propriétés physico-chimiques de surface différentes et que le traitement par le lait UHT (écrémé et entier) modifie considérablement ces propriétés physico-chimiques :

- une inversion du caractère hydrophile de l'acier inoxydable 316L et du verre vers un caractère hydrophobe des 2 supports après traitement par les deux types de lait,
- le caractère hydrophobe des supports inox 304 et polystyrène traités par le lait écrémé devient hydrophile,
- le polyéthylène présente un caractère hydrophobe avant et après traitement par les deux laits.

## CONCLUSION GENERALE

Les surfaces étudiées présentent un caractère donneur d'électron important. Ce caractère diminue pour tous les supports traités par le lait UHT entier et pour le verre et l'acier inoxydable

316l traités par le lait UHT écrémé. Par contre, il augmente pour le polyéthylène, l'inox 304 et le polystyrène traité par le lait UHT écrémé. Le caractère accepteur d'électron faible pour tous les supports non traités, augmente après leur traitement par le lait UHT. L'analyse, par spectroscopie infrarouge, après le conditionnement des surfaces solides par le lait, a montré la formation d'un film, dont la nature des molécules est diversifiée et qui devrait être à l'origine de la modification des caractères physicochimiques des surfaces étudiées.

L'utilisation du modèle théorique pour la prédiction de l'adhésion bactérienne aux différents supports peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour la sélection des matériaux peu propice à la colonisation microbienne, afin de prévenir toutes sources de contamination et/ou d'altération du produit fini. Cette étude, a montré que l'adhésion prédictive dépend du milieu de culture et du film conditionnant. Ainsi les 6 souches de *S.aureus* cultivées dans le milieu LB le lait UHT entier et écrémé montrent une adhésion prédictive défavorable sur tous les supports non traités sauf sur l'inox 304. Le traitement des supports par le lait UHT entier a inversé l'adhésion prédictive, elle devient favorable pour la majorité des supports, par contre, le traitement par le lait UHT écrémé n'a pas beaucoup d'influence sur cette adhésion.

L'étude de l'adhésion expérimentale des six souches de *S.aureus* sur le support du verre et du polystyrène montre une dissemblance très claire entre le comportement adhésif des bactéries sur les deux supports ; les souches adhèrent plus sur le verre que sur le polystyrène.

Le comportement adhésif des six souches de *S.aureus* sur deux supports traités par deux types de lait UHT ne peut être expliqué totalement par l'hydrophobicité, et dépendrait du caractère donneur/accepteur d'électrons et de la rugosité. L'approche théorique n'a pas pu totalement expliquer le phénomène d'adhésion expérimentale des six souches de *S.aureus* sur les deux supports (verre et polystyrène) traités par le lait UHT. D'autres interactions pourraient intervenir dans le processus d'adhésion et qui ne sont pas prises en compte dans l'approche théorique. Cela signifie que pour les industries agroalimentaires laitières ayant le problème de la formation des biofilms due à *S. aureus*, l'utilisation de polystyrène est plus hygiénique et moins risquée que l'utilisation du verre.

Enfin, l'étude de l'effet du temps de conditionnement par deux types de lait UHT sur le comportement adhésif de *S. aureus* sur la surface du verre, a montré que le temps de conditionnement du support par le lait UHT entier ou écrémé influence considérablement les caractéristiques physico – chimiques. Le lait écrémé modifie l'hydrophobicité et le caractère donneur /accepteur d'électrons de la surface du verre après juste 30 min de contact. Par contre le lait entier nécessite 60 min de contact pour que les changements au niveau des caractéristiques physico – chimiques de la surface seront considérés.

## CONCLUSION GENERALE

La cinétique de l'adhésion de *S.aureus* sur le verre traité par le lait UHT montre que le taux des cellules adhérees augment avec le temps de contact et le temps de conditionnement. Ceci pourrait aider à développer des outils de maîtrise pour prévoir un programme convenable de nettoyage et désinfection, en connaissant le temps nécessaire pour une contamination maximale dans les conditions industrielles.

Enfin, le travail réalisé permet de dresser des conclusions importantes venant enrichir les connaissances actuelles, sur le phénomène de l'adhésion des souches de l'environnement industriel sur les supports utilisés en contact des aliments en agro- industrie.

Les résultats obtenus doivent contribuer à maîtriser la dynamique de biocontamination en milieu industriel alimentaire et ce pour pouvoir, développer des procédés de prévention de ces biocontamination et aussi pour rationaliser les procédures de nettoyage et désinfection.

## **PERSPECTIVE :**

- ✚ Compléter l'étude par le MEB pour les supports opaques (Inox 316l et 304)
- ✚ Etudier la caractérisation des supports traités par les produits de nettoyage et afin de déterminer tous les changements au niveau de la structure de surfaces.
- ✚ Etudier l'adhésion expérimentale sur les différents supports préalablement traités par les produits de nettoyage, et dans des forces ioniques différentes
- ✚ Elargir l'étude des outils de caractérisation des charges électrostatiques .
- ✚ Etudier la formation des biofilms pluri-microbiens à la surface des supports solides.
- ✚ Evaluer l'efficacité des produits de nettoyage sur la formation des biofilms pluri-microbiens.



## Référence :

- Alais C (1985) *Ciencia de la leche. Principios de técnicas lecheras.*
- Asther M, Bellon-Fontaine M -N, Capdevila C, Corrieu G (1990) A thermodynamic model to predict *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 adhesion to various solid carriers in relation to lignin peroxidase production. *Biotechnol Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.260350505>
- Balabin RM, Smirnov S V. (2011) Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. *Talanta.* <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.026>
- Barbano DM, Sherbon JW (1984) Cheddar Cheese Yields in New York. *J Dairy Sci.* [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81517-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81517-9)
- Barnes LM, Lo MF, Adams MR, Chamberlain AHL (1999) Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.65.10.4543-4548.1999>
- Bellon-Fontaine MN, Mozes N, van der Mei HC, Sjollem J, Cerf O, Rouxhet PG, Busscher HJ (1990) A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophys.* <https://doi.org/10.1007/BF02989805>
- Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)
- Bohinc K, Dražić G, Abram A, Jevšnik M, Jeršek B, Nipič D, Kurinčič M, Raspor P (2016) Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *Int J Adhes Adhes.* <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.01.008>
- Bos R, Van Der Mei HC, Busscher HJ (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Bos R, Van Der Mei HC, Gold J, Busscher HJ (2000) Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00298-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00298-6)
- Boulangé-Petermann L, Rault J, Bellon-Fontaine MN (1997) Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling.* <https://doi.org/10.1080/08927019709378331>
- Bower CK, McGuire J, Daeschel MA (1996) The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends Food Sci. Technol.*
- Briandet R, Meylheuc T, Maher C, Bellon-Fontaine MN (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl Environ Microbiol*
- Busscher HJ, Bellon-Fontaine MN, Mozes N, van der Mei HC, Sjollem J, Léonard AJ, Rouxhet PG, Cerf O (1990) An interlaboratory comparison of physico-chemical methods for studying the surface properties of microorganisms - application to *Streptococcus thermophilus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *J Microbiol Methods.* [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(90\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0167-7012(90)90020-7)
- Busscher HJ, Weerkamp AH (1987) Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Lett.* [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90062-0)
- Busscher HJ, Weerkamp AH, van Der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol*
- Chmielewski RAN, Frank JF (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- Dalibart M, Servant L (1992) Spectroscopie dans l ' infrarouge. *Tech l'Ingénieur, Trait Anal Caractérisation*

- Dat NM, Hamanaka D, Tanaka F, Uchino T (2010) Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk solutions at different pH values and its effect on bacterial adherence. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.012>
- De Lourdes Mendes Finete V, Gouvêa MM, De Carvalho Marques FF, Netto ADP (2013) Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? *Food Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.046>
- Delmas G, Gallay A, Le Querrec F, Haeghebaert S, Espie E, Delarocque-Astagenau E, Weill FX, Hubert B, Bouvet P, De Valk H, Vaillant V, Desenclos JC (2004) E3-2 Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1987 et 2002 : impact des mesures de contrôle et de prévention. *Rev Epidemiol Sante Publique*. [https://doi.org/10.1016/s0398-7620\(04\)99206-1](https://doi.org/10.1016/s0398-7620(04)99206-1)
- Derjaguin B, Landau L (1993) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog Surf Sci*. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(93\)90013-L](https://doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L)
- Dickson JS, Koochmaraie M (1989) Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/aem.55.4.832-836.1989>
- Drewnowski A (2005) Concept of a nutritious food: Toward a nutrient density score. *Am. J. Clin. Nutr*.
- Eileen B. Somers, Amy C. Lee Wong (2004) Efficacy of Two Cleaning and Sanitizing Combinations on *Listeria monocytogenes* Biofilms Formed at Low Temperature on a Variety of Materials in the Presence of Ready-to-Eat Meat Residue. *J Food Prot*
- Etzion Y, Linker R, Cogan U, Shmulevich I (2004) Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *J Dairy Sci*. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0)
- Fang J, Kelarakis A, Wang D, Giannelis EP, Finlay JA, Callow ME, Callow JA (2010) Fouling release nanostructured coatings based on PDMS-polyurea segmented copolymers. *Polymer (Guildf)*. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.04.024>
- Fard PS (2010) Production and purification of biosurfactants and study of their influence on surface properties of stainless steel and Teflon. PhD thesis, Univ Lille 1
- Ferrand M, Huquet B, Barbey S, Barillet F, Faucon F, Larroque H, Leray O, Trommenschlager JM, Brochard M (2011) Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression. *Chemom Intell Lab Syst*. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.05.004>
- Fletcher LS (1988) Recent developments in contact conductance heat transfer. *J Heat Transfer*. <https://doi.org/10.1115/1.3250610>
- Flint SH, Bremer PJ, Brooks JD (1997) Biofilms in dairy manufacturing plant - Description, current concerns and methods of control. *Biofouling*. <https://doi.org/10.1080/08927019709378321>
- Frank JF, Chmielewski R (2001) Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. *J Food Prot*. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.8.1178>
- Gallardo-Moreno AM, González-Martín ML, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, Gómez-García AC (2002) Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5784-5787.2002>
- García-Risco MR, Ramos M, López-Fandiño R (1999) Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. *J Sci Food Agric*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990701\)79:9<1171::AID-JSFA344>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990701)79:9<1171::AID-JSFA344>3.0.CO;2-0)
- Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci*. 18:1049–1056
- Grewal MK, Chandrapala J, Donkor O, Apostolopoulos V, Vasiljevic T (2017) Electrophoretic characterization of protein interactions suggesting limited feasibility of accelerated shelf-life testing



- of ultra-high temperature milk. *J Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11278>
- Hamadi F, Asserne F, Elabed S, Bensouda S, Mabrouki M, Latrache H (2014) Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control.* <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.006>
- Hamadi F, Latrache H (2008) Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.03.010>
- Hamadi F, Latrache H, El Ghmari A, Ellouali M, Mabrouki M, Kouider N (2004) Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ann Microbiol*
- Hamadi F, Latrache H, Elghmari A (2005a) Determination of *Escherichia coli* Negative Charge Concentration From XPS Data and Its Variation with pH. *J Surf Anal*
- Hamadi F, Latrache H, Mabrouki M, Elghmari A, Outzourhit A, Ellouali M, Chtaini A (2005b) Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *J Adhes Sci Technol.* <https://doi.org/10.1163/1568561053066891>
- Hamadi F, Latrache H, Mallouki B, Mliji E, El Ghmari A, Mabrouki M, Bengourram J, Ellouali M (2008) Adhesion of *Escherichia coli* to glass under different pH. *J Pure Appl Microbiol*
- Hamadi F, Latrache H, Mliji E (2009a) Adhésion de *staphylococcus aureus* au verre et au t flon Résumé Abstract : 3:1–16
- Hamadi F, Latrache H, Zekraoui M, Ellouali M, Bengourram J (2009b) Effect of pH on surface energy of glass and Teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. *Mater Sci Eng C.* <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.023>
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R (2004) Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.012>
- Herrera JJR, Cabo ML, 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 Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.001>
- Hood SK, Zottola EA (1997) Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol.* [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00071-8)
- Husmark U, Rønner U (1992) The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of bacillus spores. *Biofouling.* <https://doi.org/10.1080/08927019209378253>
- Husmark U, Rønner U (1993) Adhesion of bacillus cereus spores to different solid surfaces: Cleaned or conditioned with various food agents. *Biofouling.* <https://doi.org/10.1080/08927019309386243>
-  n n FA, Garrigues S, De La Guardia M (2004) Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Anal Chim Acta.* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.014>
- Jamaa B, Hamadi F, Mabrouki M (2009) Relationship between roughness and physicochemical properties of glass surface and theoretical adhesion of bacterial cells RELATIONSHIP BETWEEN ROUGHNESS AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF GLASS SURFACE
- James BJ, Jing Y, Chen XD (2003) Membrane fouling during filtration of milk - A microstructural study. *J Food Eng.* [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00066-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00066-9)
- Jana TK, Srivastava AK, Csery K, Arora DK (2000) Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Can J Microbiol.* <https://doi.org/10.1139/w99-104>
- Khalil F, Franzmann E, Ramcke J, Dakischew O, Lips KS, Reinhardt A, Heisig P, Maison W (2014) Biomimetic PEG-catecholates for stable antifouling coatings on metal surfaces: Applications on TiO<sub>2</sub> and stainless steel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.022>

- Krishnan S, Weinman CJ, Ober CK (2008) Advances in polymers for anti-biofouling surfaces. *J Mater Chem*. <https://doi.org/10.1039/b801491d>
- L'agriculture O des NU pour l'alimentation et (1995) Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine - Laites d'animaux laitiers. In: *FAO Aliment. Nutr.*
- Langsrud S, Sidhu MS, Heir E, Holck AL (2003) Bacterial disinfectant resistance - A challenge for the food industry. In: *International Biodeterioration and Biodegradation*
- Larsen HD, Huda A, Eriksen NHR, Jensen NE (2000) Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet Microbiol*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00232-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00232-7)
- Leclerc J, Martinage A, Moschetto Y, Biserte G (1969) A Comparative Study of Histone Fractions FS(a)1 and F2(a)2. *Eur J Biochem*. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00768.x>
- Liu G, Bakker GL, Li S, Vreeburg JHG, Verberk JQJC, Medema GJ, Liu WT, Van Dijk JC (2014) Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: An integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environ Sci Technol*. <https://doi.org/10.1021/es5009467>
- Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA (2011) The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.066>
- M.T. S (2008) Dairy cattle systems in Morocco as affected by structural adjustment policies. In: *Mediterranean livestock production: uncertainties and opportunities*
- Mafu AA, Roy D, Goulet J, Magny P (1990) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot*. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-53.9.742>
- Marshall KC (1986) Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci*.
- MARSHALL KC, STOUT R, MITCHELL R (1971) Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *J Gen Microbiol*. <https://doi.org/10.1099/00221287-68-3-337>
- MAUBOIS JL, MOCQUOT G, THAPON JL, HUMILIER M-C, CHOPIN A, GOUDEDRANCHE H, DUPAS C, BLANC-PATIN E, PIOT M, FAUQUANT J (1971) Préparation de fromage à partir de " pré-fromage liquide " obtenu par ultrafiltration du lait. *Lait*. <https://doi.org/10.1051/lait:197150825>
- McEldowney S, Fletcher M (1986) Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/aem.52.3.460-465.1986>
- Merghni A, Nejma M Ben, Dallel I, Tobji S, Amor A Ben, Janel S, Lafont F, Aouni M, Mastouri M (2015) High potential of adhesion to biotic and abiotic surfaces by opportunistic *Staphylococcus aureus* strains isolated from orthodontic appliances. *Microb Pathog*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.009>
- Mérian T, Goddard JM (2012) Advances in nonfouling materials: Perspectives for the food industry. *J. Agric. Food Chem*.
- Mitsui T, Kasezawa N, Goda T (2007) Milk consumption does not affect body mass index but may have an unfavorable effect on serum total cholesterol in Japanese adults. *Nutr Res*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.05.006>
- Molena E, Credi C, De Marco C, Levi M, Turri S, Simeone G (2014) Protein antifouling and fouling-release in perfluoropolyether surfaces. *Appl Surf Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.211>
- Mozes N, Léonard AJ, Rouxhet PG (1988) On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *BBA - Biomembr*. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90495-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90495-6)
- Mozes N, Marchal F, Hermesse MP, Van Haecht JL, Reuliaux L, Leonard AJ, Rouxhet PG (1987) Immobilization of microorganisms by adhesion: Interplay of electrostatic and nonelectrostatic

- interactions. *Biotechnol Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.260300315>
- Neumann AW, Good RJ, Hope CJ, Sejpal M (1974) An equation-of-state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles. *J Colloid Interface Sci.* [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(74\)90365-8](https://doi.org/10.1016/0021-9797(74)90365-8)
- Nwankire CE, Ardhaoui M, Dowling DP (2009) The effect of plasma-polymerised silicon hydride-rich polyhydrogenmethylsiloxane on the adhesion of silicone elastomers. *Polym Int.* <https://doi.org/10.1002/pi.2620>
- Oldani V, Del Negro R, Bianchi CL, Suriano R, Turri S, Pirola C, Sacchi B (2015) Surface properties and anti-fouling assessment of coatings obtained from perfluoropolyethers and ceramic oxides nanopowders deposited on stainless steel. *J Fluor Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2015.08.019>
- Oliveira K, Oliveira T, Teixeira P, Azeredo J, Henriques M, Oliveira R (2006) Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella enteritidis* serotypes to materials used in kitchens. *J Food Prot.* <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.10.2352>
- Oliveira R, Azeredo J, Teixeira P, Fonseca A (2001) The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. *Bioline*
- Ong YL, Razatos A, Georgiou G, Sharma MM (1999) Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir.* <https://doi.org/10.1021/la981104e>
- Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P (2008) Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control.* <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.006>
- Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.1725-1731.1997>
- Plommet M, Bosseray N, Lantier F, Bernard F, Pardon P, Rodolakis A (1987) Simultaneous vaccination by three living attenuated strains of *Brucella*, *Salmonella* and *Chlamydia* in mice. *Vaccine.* [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(87\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(87)90005-3)
- Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ (1988) On a relation between interfacial free energy-dependent and noninterfacial free energy-dependent adherence of oral streptococci to solid substrata. *Curr Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/BF01568537>
- Ragesh P, Anand Ganesh V, Nair S V., Nair AS (2014) A review on “self-cleaning and multifunctional materials.” *J. Mater. Chem. A*
- Rogalski A (2012) History of infrared detectors. *Opto-electronics Rev.* <https://doi.org/10.2478/s11772-012-0037-7>
- Rogalski A (2002) Infrared detectors: An overview. *Infrared Phys Technol.* [https://doi.org/10.1016/S1350-4495\(02\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S1350-4495(02)00140-8)
- Rosmaninho R, Santos O, Nylander T, Paulsson M, Beuf M, Benezech T, Yiantsios S, Andritsos N, Karabelas A, Rizzo G, Müller-Steinhagen H, Melo LF (2007) Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling - Evaluation of fouling by milk components. *J Food Eng.* <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.09.008>
- Rubio C, Costa D, Bellon-Fontaine MN, Relkin P, Pradier CM, Marcus P (2002) Characterization of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the *Pseudomonas fragi* K1 adhesion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00242-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00242-9)
- Sheng XX, Ting YP, Pehkonen SO (2008) The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *J Colloid Interface Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.038>
- Silva S, Teixeira P, Oliveira R, Azeredo J (2008) Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J Food Prot.* <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1379>

- Simões M, Pereira MO, Vieira MJ (2005) Validation of respirometry as a short-term method to assess the efficacy of biocides. *Biofouling*. <https://doi.org/10.1080/08927010500066982>
- Simões M, Simões LC, Machado I, Pereira MO, Vieira MJ (2006) Control of flow-generated biofilms with surfactants: Evidence of resistance and recovery. In: *Food and Bioproducts Processing*
- Sjollema J, Van Der Mei HC, Uyen HMW, Busscher HJ (1990) The Influence of Collector and Bacterial Cell Surface Properties on the Deposition of Oral Streptococci in a Parallel Plate Flow Cell. *J Adhes Sci Technol*. <https://doi.org/10.1163/156856190X00658>
- Snieder M, Hansen WG (1997) Crystal Effect on Penetration Depth in Attenuated Total Reflectance Fourier-transform Infrared Study of Human Skin. In: *Progress in Fourier Transform Spectroscopy*
- Stanley PM (1983) Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can J Microbiol*. <https://doi.org/10.1139/m83-230>
- Steijns JM (2008) Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix? *Int. Dairy J*.
- Steijns JM (2001) Milk ingredients as nutraceuticals. *Int J Dairy Technol*. <https://doi.org/10.1046/j.1364-727x.2001.00019.x>
- Szlavik J, Paiva DS, Mørk N, van den Berg F, Verran J, Whitehead K, Knøchel S, Nielsen DS (2012) Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. *Int J Food Microbiol*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.006>
- Teixeira P, Oliveira R (1999) Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *J Adhes Sci Technol*. <https://doi.org/10.1163/156856199X00190>
- Teixeira P, Silva S, Araújo F, Azeredo J, Oliveira R (2007) Bacterial Adhesion to Food Contacting Surfaces. *Commun Curr Res Educ Top Trends Appl Microbiol*
- Ti (1988) Fabrication du fromage fondu. *Tech l'Ingénieur*
- Van der Mei HC, Brokke P, Dankert J, Feijen J, Rouxhet PG, Busscher HJ (1989) Physicochemical surface properties of nonencapsulated and encapsulated coagulase-negative staphylococci. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/aem.55.11.2806-2814.1989>
- van der Mei HC, Busscher HJ (1997) The use of X-ray photoelectron spectroscopy for the study of oral streptococcal cell surfaces. *Adv Dent Res*. <https://doi.org/10.1177/08959374970110040301>
- Van der Mei HC, De Vries J, Busscher HJ (1993) Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy streptococci. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4305-4312.1993>
- van der Mei HC, Genet MJ, Weerkamp AH, Rouxhet PG, Busscher HJ (1989) A comparison between the elemental surface compositions and electrokinetic properties of oral streptococci with and without adsorbed salivary constituents. *Arch Oral Biol*. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(89\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(89)90146-5)
- van der Mei HC, van de Belt-Gritter B, Busscher HJ (1995) Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(95\)01225-8](https://doi.org/10.1016/0927-7765(95)01225-8)
- van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol*
- van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJB (1989) Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb Ecol*. <https://doi.org/10.1007/BF02025589>
- van Oss CJ (1995) Hydrophobicity of biosurfaces - Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(95\)01217-7](https://doi.org/10.1016/0927-7765(95)01217-7)
- van Oss CJ (1993) Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp*.
- van Oss CJ (1997) Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(97\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(97)80099-4)
- van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ (1988) Interfacial Lifshitz—van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem Rev*. <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>

- Van Oss CJ, Giese RF (1995) The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays Clay Miner.* <https://doi.org/10.1346/CCMN.1995.0430411>
- Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986) The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J Colloid Interface Sci.* [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90041-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90041-X)
- van Pelt AWJ, Weerkamp AH, Uyen MHWJC, Busscher HJ, de Jong HP, Arends J (1985) Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.49.5.1270-1275.1985>
- Vanhaecke E, Remon JP, Moors M, Raes F, De Rudder D, Van Peteghem A (1990) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: Role of cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.56.3.788-795.1990>
- Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, Rees CED, Waites WM (2000) Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl Environ Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.860-863.2000>
- Ward CA, Neumann AW (1974) On the surface thermodynamics of a two-component liquid-vapor-ideal solid system. *J Colloid Interface Sci.* [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(74\)90364-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(74)90364-6)
- Whitehead KA, Colligon JS, Verran J (2004) The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. In: *International Biodeterioration and Biodegradation*
- Yan YY, Gao N, Barthlott W (2011) Mimicking natural superhydrophobic surfaces and grasping the wetting process: A review on recent progress in preparing superhydrophobic surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.*
- Yang J, McGuire J, Kolbe E (1991) Use of the equilibrium contact angle as an index of contact surface cleanliness. *J Food Prot.* <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.11.879>
- (1999) Infrared spectral interpretation: a systematic approach. *Choice Rev Online.* <https://doi.org/10.5860/choice.36-5697>