

HAGE Mayssane

Master Nutrition et Sciences des Aliments

Spécialité Qualité et Sécurité Alimentaires

Année universitaire 2017-2018

Mémoire de fin d'étude intitulé :

**FORMATION DES BIOFILMS BACTERIENS SUR LES MATERIAUX AU CONTACT DES
ALIMENTS : ACTIONS PREVENTIVES ET ERADICATRICES**

Date de la soutenance: Vendredi 21 Septembre 2018 -17h00

Membres du jury: Directeur du mémoire: M. ABDALLAH Marwan
Responsable de spécialité: M. HUBERT Hervé
3ème membre de jury

Université de Lille
Faculté Ingénierie et Management de la Santé - ILIS
42 rue Ambroise Paré
59120 LOOS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes profonds remerciements à M. ABDALLAH Marwan, mon encadrant de stage et directeur de mémoire, de m'avoir accueilli comme stagiaire au sein de l'institut de recherche agronomique INRA et pour sa disponibilité, son aide précieuse et la sympathie qu'il m'a témoigné tout au long de ce stage.

J'adresse mes sincères remerciements à M. DELAPLACE Guillaume, M. JAMA Charafeddine et M. CHIHIB Noureddine, pour leurs conseils avisés et leur disponibilité tout au long de ce stage.

Je souhaite remercier également M. HUBERT Hervé, responsable du Master Recherche, Mme LANIER Caroline, responsable du Master Nutrition, sciences des aliments, qualité et sécurité alimentaires ainsi que l'ensemble des professeurs pour le temps qu'ils nous ont consacré et l'aide qu'ils nous ont apporté pendant cette année d'enseignement.

Je remercie, par avance, les membres de mon jury, M. ABDALLAH Marwan, M. HUBERT Hervé et mon 3^{ème} membre du jury pour l'intérêt qu'ils porteront à la lecture de ce mémoire et leur présence à ma soutenance de stage.

Je tiens enfin à remercier Beatrice CROCCO pour la bonne humeur qu'elle apportait au quotidien, Oussama KHELISSA pour sa sympathie ainsi que toute l'équipe du laboratoire PIHM et UMET pour leur accueil et leur collaboration.

SOMMAIRE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Généralités sur les toxi-infections alimentaires TIAC	7
II. Généralités sur les biofilms bactériens	8
1. Historique	8
2. Définition du biofilm	8
3. Etapes de formation des biofilms	9
4. Secteurs affectés par la formation des biofilms	10
5. Effet des conditions environnementales sur la formation de biofilms dans les secteurs alimentaires	11
6. Lutter contre les biofilms	11
a) L'éradication des biofilms	12
b) Les stratégies de prévention de la formation de biofilms	13
OBJECTIFS DU STAGE	17
MATERIELS ET METHODES	18
I. Souches bactériennes, matériels et produits chimiques	19
II. Cultures, précultures, et préparation des coupons et systèmes	19
III. Standardisation des supports et de réacteur d'installation de biofilms	20
IV. Procédures expérimentales pour la prévention de la formation de biofilms par voie passive	20
1. Revêtement des coupons par plasma froid micro-onde	20
V. Procédures expérimentales pour la prévention de la formation de biofilms par voie active	21
1. Revêtements par chimie classique sur acier inoxydable	23
a) Revêtement de polydopamine sur les coupons d'acier inoxydable 304 L : SS-Dopa	23
b) Immobilisation de la Glutaraldéhyde sur les coupons de polydopamine (SS-Dopa-Glu)	24
c) Immobilisation de poly(éthylèneimine) sur les coupons de SS-Dopa-Glu (SS-Dopa-Glu-PEI1 et SS-Dopa-Glu-PEI2)	24
d) Immobilisation de la Nisine sur les coupons de SS-Dopa-Glu : SS-Dopa-Glu-Nis	24
e) Immobilisation directe de la Nisine sur les coupons de SS-Dopa: SS-Dopa-Nis	25
f) Immobilisation de la Nisine sur les coupons de SS-Dopa en utilisant l'acide succinique comme bras espaceur: SS-Dopa-AS-Nis	25
2. Essais antibactériens qualitatifs des coupons sur un tapis bactérien	25

3.	Essais antimicrobiens quantitatifs sur les différents types de coupons revêtus _____	26
4.	Essais d'adhésion sur les différents types de coupons revêtus _____	26
5.	Caractérisation des surfaces _____	27
a)	Mesure de l'angle de contact _____	27
b)	Spectroscopie infrarouge _____	28
c)	Mesure de la rugosité de la surface par Alpha-step profilomètre _____	29
d)	Microscopie électronique à balayage (MEB) _____	30
VI.	Protocoles pour la stratégie d'éradication des biofilms _____	31
1.	Préparation de la suspension d'adhésion et installation de biofilms _____	31
2.	Essai antibiofilm par l'action d'agents antimicrobiens _____	31
VII.	Etude de la composition de la matrice du biofilm de <i>Salmonella enterica</i> suivant la température 32	
a)	Protocole de récupération de la matrice extracellulaire _____	32
b)	Dosage des sucres totaux de la matrice extracellulaire _____	32
c)	Dosage des protéines totales de la matrice extracellulaire _____	33
	RESULTATS OBTENUS _____	34
I.	Prévention de formation de biofilm _____	34
II.	Prévention de formation de biofilm par voie passive _____	34
1.	Dépôts à base de TMDS en fonction du débit du gaz plasmagène et de l'oxygène O ₂ _____	35
2.	Test d'adhésion bactérienne sur coupons TMDS _____	36
3.	Caractérisation des propriétés de surface de revêtements plasma à base de TMDS _____	37
a)	Angle de contact sur les revêtements à base de TMDS _____	37
b)	Spectre infrarouge sur les revêtements à base de TMDS _____	38
1.	Etude de la morphologie des dépôts _____	40
a)	Etude de la rugosité des dépôts par profilométrie _____	40
b)	Microscopie électronique à balayage des revêtements TMDS _____	41
III.	Prévention de formation de biofilms par voie active _____	43
1.	Fonctionnalisation de l'acier inoxydable par des molécules présentant une activité antimicrobienne potentielle _____	43
2.	Résultats concernant les revêtements avec les molécules PEI 1 et PEI 2 _____	43
a)	Essais d'adhésion bactérienne _____	43
b)	Essais antibactériens (Challenge test) _____	44
c)	Caractérisation des propriétés de surface de revêtements de PEI 1 et PEI 2 _____	45
i.	Angle de contact _____	45

ii.	Spectre infrarouge	46
iii.	Rugosité	47
iv.	Microscopie électronique à balayage	48
3.	Résultats concernant les revêtements avec la Nisine	49
a)	Essai d'adhésion bactérienne	49
b)	Essais antibactériens (Challenge tests)	50
i.	Efficacité des surfaces SS-Dopa-Nis après 3, 5 et 24 h de contact	50
ii.	Efficacité des surfaces SS-Dopa-Glu-Nis après 3, 5 et 24 h de contact	51
c)	Caractérisation des surfaces modifiées avec la Nisine	52
i.	Angle de contact	52
ii.	Spectre infrarouge	52
iii.	Rugosité	53
iv.	Microscopie électronique à balayage	54
4.	Optimisation du dépôt de la Nisine	54
a)	Essai d'adhésion bactérienne	55
b)	Essais antibactériens (Challenge test)	56
c)	Caractérisation du dépôt	56
i.	Angle de contact	56
ii.	Spectre infrarouge	57
iii.	Rugosité	58
iv.	Microscopie électronique à balayage	59
IV.	Eradication des biofilms	59
1.	Effet de la température sur la structuration des bactéries en biofilm et la résistance au traitement désinfectants/détergents	60
2.	Effet de la température sur les constituants principaux de la matrice extracellulaire	61
	DISCUSSION DES RESULTATS	63

LISTE DES ABREVIATIONS

IAA : Industrie agroalimentaire

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

CNR : Centre national de référence

OMS : l'organisation mondiale de la santé

PEG: Poly ethylene glycol

TMDS: 1, 1, 3, 3-Tetramethyldisiloxane

SS: Stainless Steel – Acier inoxydable

TSB: Tryptone Soy Broth

TSA: Tryptone Soy Agar

BSA : Sérum albumine bovin

PEI 1 : Poly (ethyleneimine) 50% de masse molaire $M \approx 1300$ par LS

PEI 2 : Poly (ethyleneimine) 50% de masse molaire $M \approx 750000$ par LS

EDC : N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide $\geq 97\%$

NHS: N-Hydroxysuccinimide 98%

AO: Acridine orange

FTIR: Fourier Transform InfraRed spectroscopy

ATR: Attenuated Total Reflectance (réflectance totale atténuée)

IR: Spectre Infrarouge

Ra : Rugosité moyenne

Rq : Rugosité quadratique

MEB : Microscopie électronique à balayage

AQ ; BAC : Ammonium quaternaire

P1 : Désinfectant de surface concentré

InVS : Institut de Veille Sanitaire

I. Généralités sur les toxi-infections alimentaires TIAC

La contamination des surfaces et des installations par des microorganismes dans les secteurs alimentaires constitue un véritable problème de santé publique. Dans les écosystèmes naturels ou industriels, plus de 99,9% des microorganismes vivent attachés aux surfaces et l'état planctonique peut être considéré comme une exception. Ces microorganismes attachés forment une structure spécifique et complexe, appelée biofilm. Ce biofilm constitue un réservoir de bactéries viables à l'origine d'une variété des épisodes de toxi-infections alimentaires [1]. Selon l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'apparition d'au moins 2 cas d'une symptomatologie similaire, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Les TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire (DO). Leur signalement permet de prendre des mesures rapides dans le cas de restauration collective. En France, la surveillance des TIAC est assurée par l'Institut de veille sanitaire (InVS) via la DO et les données provenant du Centre national de référence (CNR).

Le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2016 montre que 1455 TIAC ont été déclarées en France, affectant 13997 personnes, dont 634 (5 %) ont été hospitalisées et 3 sont décédées. Par rapport à 2015, le nombre de TIAC est en légère augmentation (+4,7%). L'agent pathogène le plus fréquemment confirmé était *Salmonella* avec 35 % des TIAC suivis par *Bacillus cereus* (13%) et *Staphylococcus aureus* (7 %) [2]. En Europe, le rapport de l'estimation de la charge mondiale des maladies d'origine alimentaire (Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases) de l'organisation mondiale de la santé (OMS) indique que plus de 23 millions d'Européens tombent malades chaque année après avoir consommés des aliments contaminés, et 5000 décèdent à la suite de ces infections [3]. Au niveau mondial, jusqu'à 600 millions de personnes, soit près de 1 personne sur 10, tombent malades après avoir consommé des aliments contaminés chaque année. Ces maladies provoquent 420000 décès, dont 125000 chez les enfants âgés de moins de 5 ans. En plus des pertes de vies humaines, les infections d'origine alimentaire provoquent une morbidité importante et des pertes économiques assez conséquentes. A titre

d'exemple, il a été signalé que le coût annuel d'infections d'origine alimentaire aux États-Unis est de l'ordre 77,7 milliards de dollars [1].

II. Généralités sur les biofilms bactériens

1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à Antoni Van Leeuwenhoek en 1683 qui observa la présence des communautés de microorganismes à la surface de ses propres dents. En 1932, Henerici observa des communautés bactériennes lors de son expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il a prouvé l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous forme planctonique, mais plutôt organisées sous forme de communautés sessiles fixées sur une surface. Ensuite Zobell en 1943 montra que, dans le milieu marin, la quantité de bactéries fixées sur un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide. Suite à cela, Jones en 1969, travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, confirma non seulement les agrégats mono ou poly-microbiens, mais aussi l'existence d'une matrice polysidique. Par la suite, Characklis en 1973 démontra que des dépôts microbiens installés dans des conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent résistants aux désinfectants. De plus, Costerton et son équipe en 1978 ont proposé la théorie des biofilms en suggérant que c'est le mode de vie naturel adopté pour la plupart des microorganismes.

2. Définition du biofilm

La définition d'un biofilm a beaucoup évolué depuis sa découverte et les chercheurs sont toujours en désaccord sur certains points, mais la définition de Donlan et Costerton reste la définition communément admise [4]. En effet, ces auteurs définissent le biofilm comme une communauté de microorganismes, adhérant à une surface et entre eux. Cette adhésion est marquée par une sécrétion d'une matrice extracellulaire douée de propriétés adhésive et protectrice. En générale, les biofilms sont composés majoritairement d'eau, de microorganismes de différentes espèces, et d'une matrice extracellulaire composé d'exopolysaccharides (40 à 95% de son poids sec), d'acides nucléiques (1 à 10%), des lipides (1 à 40%), des protéines (1 à 60%) et des ions sous formes libres ou liés [5].

3. Etapes de formation des biofilms

La formation du biofilm est un processus complexe caractérisé par une succession d'étapes. L'adsorption, ou l'adhésion réversible, des bactéries, sur les surfaces abiotiques, constitue la première et l'indispensable étape de la formation du biofilm (Figure 1) [1, 6]. Cette phase est considérée comme une étape réversible et semble être facilitée par de nombreuses interactions non covalentes [7]. En effet, l'adhésion bactérienne est déclenchée, lorsque les micro-organismes arrivent à la surface à une certaine distance (entre 2 à 50 nm), par l'intermédiaire des forces non covalentes, comme les interactions de Van der Waals, acide-base et électrostatiques [7]. La force résultante de ces interactions permet une adsorption bactérienne sur le support. A ce stade, les bactéries vont se fixer par la suite aux surfaces d'une manière irréversible. Cette étape est considérée comme dynamique dans la mesure où elle nécessite une activité métabolique. Des structures membranaires, telles que les fimbriae, flagelle, pili, etc..., semblent jouer un rôle principal dans cette adhésion irréversible [8, 9]. Par exemple, il a été rapporté que les bactéries mobiles détectent la traînée de leurs flagelles sur la surface [10]. Ceci déclenche un signal induisant l'expression de gènes impliqués dans la formation du biofilm, et réprime la biosynthèse de la flagelle. Ensuite, la colonisation de la surface se fait grâce à la multiplication des microorganismes qui vont former des microcolonies, des macrocolonies tout en sécrétant une matrice extracellulaire pour former un biofilm mature proprement dit [11]. L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement ou la dispersion des cellules bactériennes qui peuvent ainsi coloniser de nouvelles surfaces. Ainsi, le détachement et la dispersion de cellules bactériennes d'un biofilm jouent un rôle important dans la dissémination de bactéries et dans la propagation de l'infection [1].

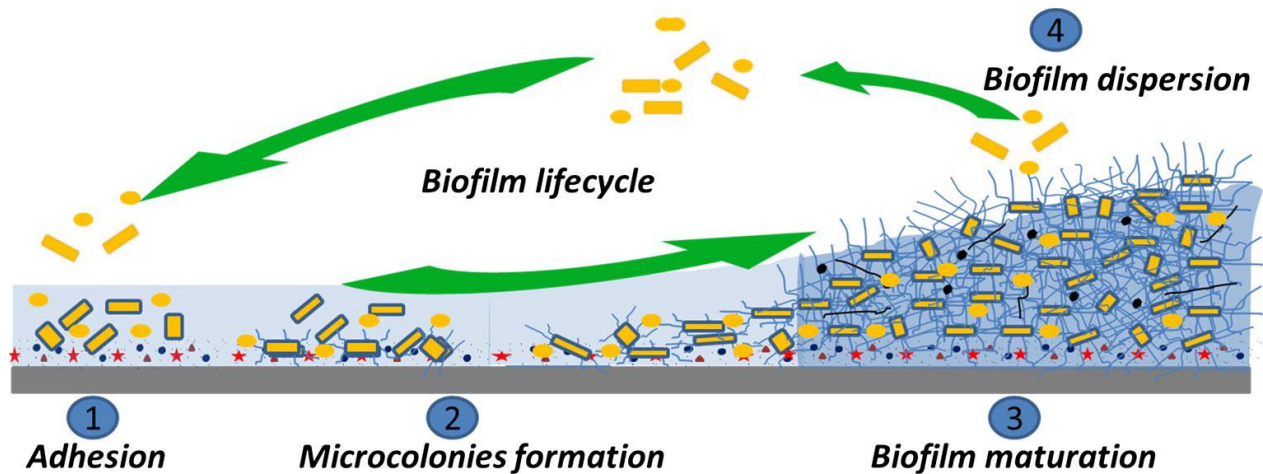


Figure 1: Différentes étapes de formation du biofilm

4. Secteurs affectés par la formation des biofilms

Dans les écosystèmes naturels ou artificiels, si les conditions environnementales sont appropriées, les biofilms peuvent se former sur tout type de surfaces abiotiques, comme le verre, le plastique, le caoutchouc et l'acier inoxydable [1]. Le développement non désiré de biofilms engendre de nombreux problèmes économiques et sanitaires. L'industrie agro-alimentaire n'est pas à l'abri de cette problématique. En effet, ces biofilms sont présents dans les laiteries, brasseries, sucreries, salaisonneries, etc. La présence de biofilm dans ces industries constitue un problème relatif à la qualité et la sécurité des produits alimentaires. En milieu hospitalier, les biofilms ont une importance particulière car ils sont impliqués dans un large éventail d'infections chez l'homme. Environ 60 % des infections nosocomiales, dans les pays dits développés, sont dues à des biofilms [12]. Par ailleurs, les biofilms posent aussi un véritable problème dans les canalisations et tout particulièrement dans les réseaux d'alimentation en eau potable. En effet, plusieurs épidémies étaient liées à la contamination de l'eau potable par des agents pathogènes [13]. De plus, ces biofilms ont des effets néfastes sur la qualité de l'eau, pouvant entraîner à des infections d'origine hydrique, la bio-corrosion, et l'augmentation des coûts de maintenance du réseau de distribution [14]. Les biofilms causent également de graves problèmes dans de nombreuses industries, telles que la production de papier, le pétrole, les centrales nucléaires et les industries marines [1, 15]. En effet, ces biofilms ont un impact important sur la détérioration et la défaillance des équipements dans ces industries.

5. Effet des conditions environnementales sur la formation de biofilms dans les secteurs alimentaires

Les bactéries présentes dans les écosystèmes naturels et industriels sont constamment exposées aux différentes conditions environnementales. De plus, le milieu alimentaire constitue un milieu favorable pour le développement et la croissance de biofilms sur les surfaces. Il est généralement admis que la formation d'un biofilm est sous le contrôle de plusieurs signaux environnementaux. Les bactéries peuvent détecter ces signaux de l'environnement et déclencher les réseaux de régulation afin de moduler la formation de biofilm [1, 10]. Des conditions environnementales, rencontrées dans le secteur alimentaire, telles que les changements de la température, la disponibilité des nutriments, la teneur en oxygène, le pH et le type de surface, jouent un rôle principal dans la formation de biofilms sur les supports abiotiques. Par exemple, il a été rapporté que la température d'installation de biofilm, le pH et le type de support présentent un effet significatif sur la formation du biofilm et sur la résistance aux agents biocides [16-18]. Une autre étude montre que *P. aeruginosa* détecte les signaux environnementaux par un récepteur, une histidine kinase, couplé à un régulateur de réponse, comme le LadS, le RetS, et le GacS qui induisent l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse d'exopolysaccharides (alginate, Psl et Pel). Par ailleurs, la molécule de signalisation intracellulaire, c-di-GMP, a également été identifiée comme un régulateur central de gènes contrôlant la formation de biofilm. De plus, différentes études ont montré que les conditions environnementales présentent un effet considérable sur la régulation de c-di-GMP et sur la résistance de biofilms aux agents biocides [1, 19] [1, 19]. Par ailleurs, la rugosité de surface est considérée comme un facteur essentiel affectant la formation de biofilms. En effet, différentes études ont montrées une forte corrélation entre la rugosité de surface et la formation de biofilms [1]. La rugosité de surfaces est influencée par la présence des crevasses, des fissures et des irrégularités qui donnent asile aux microorganismes et favorise l'adhésion des bactéries et la formation des biofilms.

6. Lutter contre les biofilms

La formation de biofilms constitue une source de contamination critique dans l'industrie alimentaire. Dans certains cas, les biofilms sont responsables de graves contaminations des produits finis provoquant des graves intoxications alimentaires et des pertes économiques

considérables. À cet égard, plusieurs stratégies ont été proposées pour contrôler la formation de biofilms dans les secteurs affectés. Ces stratégies peuvent être classées en deux groupes principaux. La première vise à éradiquer d'une manière efficace les biofilms formés en utilisant des agents antimicrobiens, des forces physiques, des enzymes, des phages, etc. La deuxième a pour objectif d'inhiber l'adhésion bactérienne, la première étape de la formation du biofilm, via, les modifications des propriétés de surfaces des supports par des revêtements antiadhésifs (inhibition passive) ou, et antimicrobiens (inhibition active) (Figure 2).

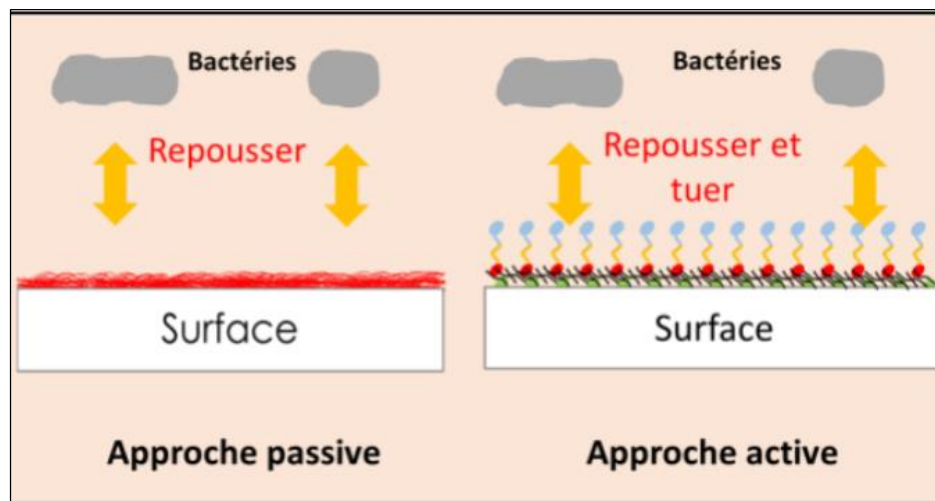


Figure 2: Inhibition de la formation de biofilms par une fonctionnalisation passive ou active

a) L'éradication des biofilms

Le traitement de biofilms par des détergents/désinfectants présente une alternative assez intéressante pour les surfaces complexes et sensibles aux traitements thermiques (stérilisation). Les produits détergents/désinfectants sont des agents chimiques utilisés pour éliminer et inactiver pratiquement tous micro-organismes pathogènes (Centers for Disease Control and Prévention, USA). Cependant, l'élimination des biofilms est une opération difficile, car les cellules structurées en biofilm sont protégées contre les agents biocides. En effet, leur résistance est 10 à 1000 fois plus importante que les bactéries planctoniques. La résistance des biofilms semble être multifactorielle et dépendante de plusieurs paramètres. Il a été reporté que la présence du glycocalyx (matrice extracellulaire) constitue une barrière empêchant la pénétration d'antibactériens en profondeurs du biofilm, par des interactions covalentes, dégradation d'antimicrobiens, etc. Par exemple, l'alginate, un exo-polysaccharide anionique produit par

Pseudomonas aeruginosa, a été étudié pour sa capacité à piéger des agents antimicrobiens cationiques [20]. Cependant, d'autres auteurs ont mis en avant l'implication de la résistance intrinsèque de la bactérie, liée aux changements phénotypiques induits lors de la formation du biofilm. De plus, ces auteurs rapportent que la matrice extracellulaire ne joue qu'un rôle mineur [21]. Par ailleurs, la formation des biofilms et la composition de la matrice extracellulaire sont influencées par les conditions environnementales, comme la disponibilité des éléments nutritifs, le pH, la température, l'humidité, l'oxygène et le type de support [1]. Ainsi, ces conditions pourraient influencer la réponse de ces biofilms vis-à-vis des stress environnementaux et des attaques biocides. Par ailleurs, des nombreux mécanismes de résistance de biofilm aux agents biocides restent méconnus. C'est le cas de l'implication des pompes à efflux, notamment chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il a été démontré que les bactéries possèdent des protéines membranaires, appelées pompe à efflux. Ces structures permettent par exemple l'exportation d'antibiotiques et d'autres biocides comme les ammoniums quaternaires [22]. Le principe de résistance est lié donc au fait que ces pompes à efflux permettent de garantir une sortie plus rapide de l'antibactériens que son entrée. Par conséquent, la concentration intracellulaire en antibactériens demeure à un niveau faible, ceci permet donc de garantir la survie de la cellule bactérienne.

b) Les stratégies de prévention de la formation de biofilms

Le passage des microorganismes de l'état planctonique à l'état sessile (attaché), ou l'adhésion bactérienne (étape 1 dans le processus de la formation du biofilm), constitue la phase critique et précoce de la formation d'un biofilm sur les surfaces des dispositifs médicaux et alimentaires. Il est généralement admis que cette étape est fortement influencée par de nombreux facteurs liés au milieu environnant des microorganismes et des surfaces abiotiques. Pour prévenir et empêcher les interactions spécifiques et non-spécifiques entre les microorganismes et les surfaces solides, il est nécessaire d'agir au niveau des surfaces abiotiques, en modifiant leurs propriétés de surface (rugosité, énergie de surface, charge, nature chimique), afin de les rendre antiadhésives. En effet, il n'est pas possible d'agir sur les caractéristiques du milieu environnant ou sur les propriétés de surface des microorganismes. Parmi les stratégies proposées pour empêcher la formation de biofilm est l'approche passive. Celle-ci consiste à modifier les

caractéristiques morphologiques des surfaces telles que la rugosité et la topographie. La littérature indique que plus la rugosité est élevée plus la colonisation de la surface par les microorganismes est importante [1]. En effet, une surface rugueuse présente une surface de contact élevée entre le matériau et son environnement. De plus, les irrégularités présentes sur les matériaux constituent des endroits favorables à l'adhésion et la croissance bactérienne, car elles sont moins soumises aux forces de cisaillement dues aux opérations de nettoyage. Si l'utilisation de matériaux lisses semble réduire l'adhésion bactérienne de certaines bactéries, d'autres peuvent encore se fixer même sur les substrats les plus lisses et former des biofilms [1, 16].

Une autre approche pour réduire la formation des biofilms consiste à modifier la chimie des surfaces abiotiques par le greffage ou les revêtements hydrophobes ou hydrophiles, c'est l'approche active. Cependant, les études concernant l'efficacité de ces revêtements montrent des résultats qui semblent être contradictoires concernant l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms. Par exemple, l'utilisation de revêtements hydrophobes (faible énergie de surface) sur les aciers inoxydables ou sur le verre a montré une réduction de l'adhérence de certaines bactéries et favorisé l'adhésion des autres bactéries. Le polyéthylène glycol (PEG) est largement étudié pour contrôler l'encrassement protéique sur les matériaux. Les résultats montrent que la prévention de l'adsorption protéique est satisfaisante. Cependant, son efficacité pour limiter l'adhésion bactérienne est controversée [23]. De plus, le PEG a tendance à s'oxyder en présence d'oxygène avec comme conséquence la perte de ses propriétés antiadhésives et limite son application dans le secteur hospitalier/alimentaire. Plus récemment, des revêtements associant des polymères biocompatibles, des zwitterions, ont été étudiés pour leurs propriétés de résistance à l'encrassement organique [24]. L'hypothèse la plus probable derrière une telle activité est que les zwitterions se lient fortement à l'eau, créant une couche d'hydratation empêchant les matières organiques d'adhérer à la surface. Par ailleurs, le revêtement de surfaces abiotiques par des polymères plasmas à partir des précurseurs organosiliciés semble avoir sa place dans le domaine d'anti-encrassement et anti-adhésion bactérienne. Le revêtement par plasma est une technique de dépôt d'un polymère à la surface d'un substrat. Cette technique est également connue sous les sigles PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). Le plasma, appelé aussi le

quatrième état de la matière, représente un ensemble d'atomes ou de molécules en partie ionisé ou en totalité. Ce plasma est un gaz ionisé, souvent composé d'ions, d'électrons, radicaux et des molécules neutres. L'ensemble reste électriquement neutre. Il se forme lorsque l'énergie du milieu devient très élevée. Le gaz à ioniser, O₂, N₂, Ar, etc., est injecté dans une enceinte sous vide partiel ou à pression atmosphérique. Le plasma est ensuite généré par l'action d'une décharge électrique dans le gaz (radiofréquence ou microonde), qui a pour rôle de transférer de l'énergie à ce gaz pour l'exciter et l'ioniser. Dans le cas de revêtements par polymérisation plasma, les monomères, qui se présentent initialement sous une forme liquide ou gazeuse, sont injectés seul ou avec un autre gaz dans une chambre située dans la décharge ou en post décharge. En effet, ces monomères sont activés par le plasma pour se polymériser sur les surfaces. Des études récentes ont montré que les revêtements, couramment utilisés pour des applications anticorrosion, sur l'acier inoxydable par des polymères organosiliciés, à partir du précurseur organosilicié liquide le Triméthylsilane (TMS), ont montré des activités antibiofilms prometteuses [25]. Le revêtement à base de TMS par plasma sur des surfaces en acier inoxydable ou en titane réduit de façon efficace la formation de biofilm de *S. aureus*. Ceci ouvre une nouvelle voie à investiguer dans ce domaine. Il faut noter que si l'efficacité de ces revêtements organosiliciés est indéniable, des études approfondies sont nécessaires sur ce revêtement plasma pour optimiser ses performances et les adapter à une application médicale et alimentaire.

Par ailleurs, une solution consistant à empêcher l'adhésion des agents pathogènes sur les surfaces des équipements médicaux et alimentaires est d'exposer ces pathogènes à des molécules antibactériennes afin de les tuer et d'empêcher leur croissance. De nombreux efforts ont été faits pour empêcher l'adhésion microbienne et la formation de biofilms par des approches actives. Ces approches sont basées sur l'immobilisation covalente des agents antimicrobiens sur les surfaces abiotiques ou l'adsorption des antimicrobiens avec un relargage contrôlé. Les critères de choix et de sélection de l'agent antibactérien doivent inclure plusieurs paramètres essentiels pour protéger la santé du patient et du consommateur. La Nisine (Figure 3) semble avoir des propriétés antibactériennes intéressantes [26, 27]. C'est un peptide antibactérien polycyclique de 34 résidus acide aminé. Elle est utilisée comme additif alimentaire (conservateur) sous le numéro E234. Elle contient des acides aminés inusuels tels que la lanthionine (Lan), la méthyl-lanthionine

OBJECTIFS DU STAGE

Pour prévenir les infections alimentaires liées à la formation de biofilms, ce travail de recherche, pluridisciplinaire, est à l'interface de la microbiologie, de la biochimie, des sciences des matériaux et des traitements de surface, a pour objectifs :

- d'élaborer et d'éco-concevoir des traitements de surface de l'acier afin de le rendre fonctionnel avec une activité anti-adhésion et, ou anti-biofilm, par une approche passive ou active (Figure 2). Les modifications de propriétés de surfaces ont fait appel à des techniques de pointe utilisant le Plasma froid et la voie chimique/biochimique.
- de comprendre les mécanismes de formation des biofilms installés dans des conditions environnementales rencontrées dans le secteur alimentaire. Ceci est dans le but de mettre au point des traitements capables d'éliminer complètement les biofilms dans les conditions réelles.

MATERIELS ET METHODES

Pour faciliter la lecture du rapport et la compréhension des stratégies/méthodes utilisées, la figure 4 représente le schéma qui illustre les grandes démarches suivies dans l'élaboration des expériences.

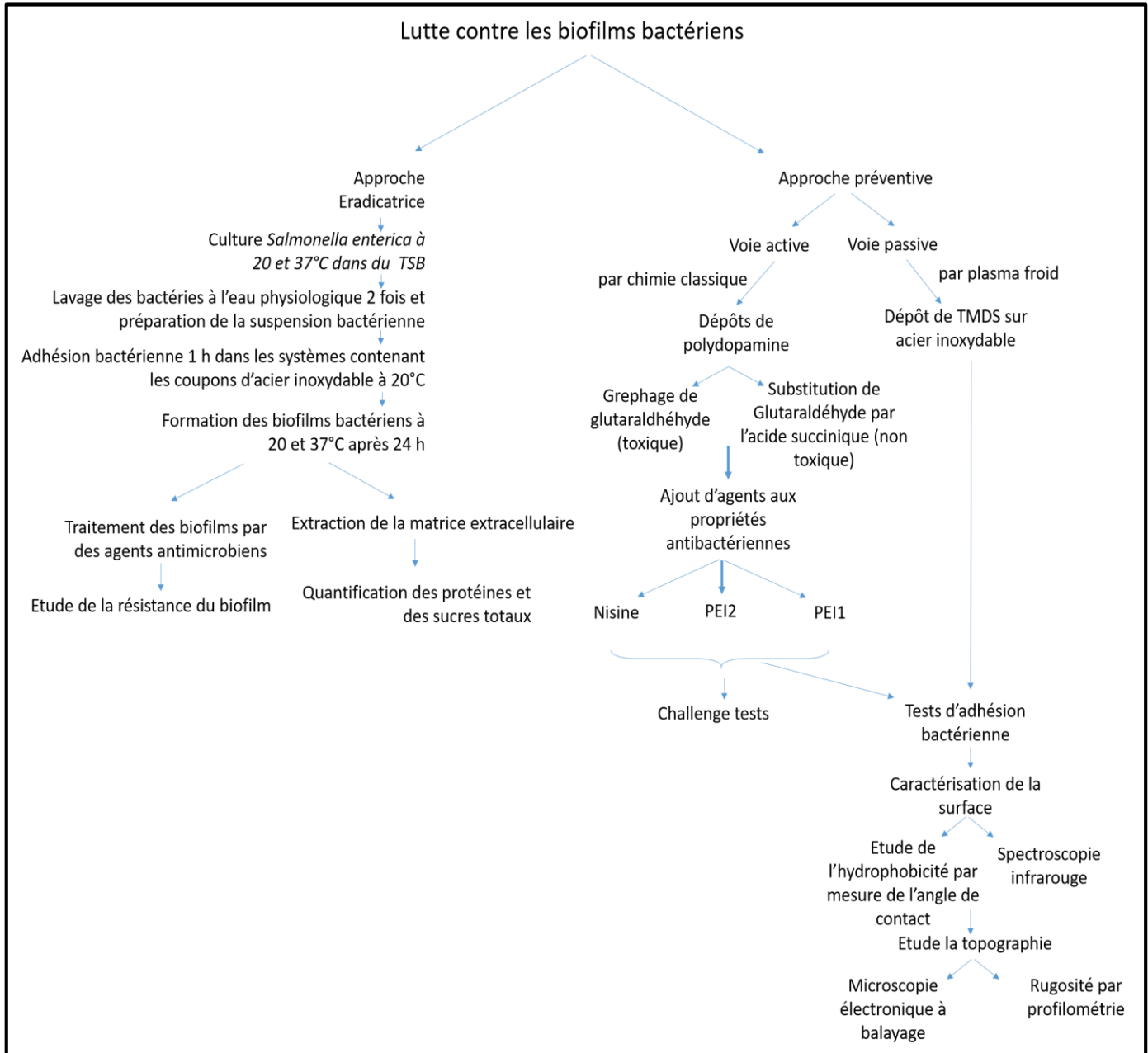


Figure 4 : Grandes démarches suivies dans l'élaboration des expériences

I. Souches bactériennes, matériels et produits chimiques

Les souches bactériennes retenues pour ces expériences sont *Salmonella enterica* CIP 8297 (CRBIP, France) et *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 (LM/NCTC, Royaume-Uni). Les supports utilisés pour l'installation des biofilms et des revêtements sont les coupons d'acier inoxydable 304L (SS) (Equinox, France). Pour les observations microscopiques les bactéries sont marquées à l'acridine orange (Sigma Aldrich, France). Le Tryptone Soy Broth est utilisé pour les précultures et cultures bactériennes (TSB ; Biokar, France). Le Tryptone Soy Agar utilisé pour le dénombrement des bactéries (TSA ; Biokar, France). Le Tryptone Sel est utilisé pour diluer les suspensions bactériennes (TS ; Biokar, France). Les produits chimiques utilisés sont l'Ethanol pour le nettoyage des coupons ; les produits utilisés pour les revêtements sont la dopamine hypochloride, la Glutaraldéhyde 25%, le Poly(éthylèneimine) 50% de masse molaire $M \approx 1300$ par LS (PEI 1), le Poly(éthylèneimine) 50% de masse molaire $M \approx 750000$ par LS (PEI 2), le N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide $\geq 97\%$ (EDC), le N-Hydroxysuccinimide 98% (NHS), l'acide succinique, Tris-Base, Tampon phosphate et l'hydroxyde de sodium (Sigma Aldrich, France). La Nisine a été donnée par Danisco (Beaminster Dorset, Royaume-Uni). Pour le dosage des protéines et du glucose dans la matrice des biofilms de *Salmonella enterica* les produits utilisés sont le phénol (Sigma Aldrich, France), l'acide sulfurique (Sigma Aldrich, France), le sérum albumine bovin (BSA) (Sigma Aldrich, France), le réactif de Bradford (VWR, France).

II. Cultures, précultures, et préparation des coupons et systèmes

Afin de réaliser les précultures bactériennes, 100 μ l d'un cryotube contenant la souche bactérienne stockée à -20°C dans du glycérol (40%) sont inoculés dans un tube contenant 5 ml de Tryptone Soy Broth (TSB). Ces tubes sont incubés à 20°C pendant 48 heures ou à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, les cultures bactériennes sont réalisées en ensemençant 50 ml du Tryptone Soy Broth (TSB) par 100 μ l de la préculture bactérienne respective réalisée préalablement. La culture bactérienne est réalisée dans des Erlenmeyers et incubée à 20°C ou 37°C sous une agitation de 160 rpm. Après le temps de culture nécessaire pour atteindre la fin de la phase exponentielle, les cultures sont arrêtées et les suspensions bactériennes sont prêtes à être utilisées.

III. Standardisation des supports et de réacteur d'installation de biofilms

Les coupons sont nettoyés à l'éthanol afin d'éliminer toute trace de colle provenant de l'adhésif de protection. Ensuite les coupons sont rincés à l'eau déminéralisée stérile et placés dans des boîtes de pétri stériles. Pour l'installation des biofilms, les coupons sont insérés dans les systèmes d'installation des biofilms et l'ensemble est stérilisé à l'autoclave.

IV. Procédures expérimentales pour la prévention de la formation de biofilms par voie passive

1. Revêtement des coupons par plasma froid micro-onde

Dans le but de réaliser des revêtements antiadhésifs par plasma froid micro-onde sur les coupons d'acier inoxydable, le monomère 1,1,3,3-Tetramethyldisiloxane (TMDS) a été choisi. Dans un premier temps, les coupons d'acier inoxydables nettoyés à l'éthanol sont installés dans le réacteur plasma sur le porte-substrat et le vide est lancé pour atteindre une pression de l'ordre de 3×10^{-2} mbar. Ensuite le débit, du gaz plasmagène, d'azote est réglé à l'aide du régulateur de débit massique (3 ou 4,3 SLM). Une fois ce débit réglé, le générateur est mis en marche et la puissance est réglée à 1000 W pour créer le plasma. Cette étape permettra l'activation de la surface. Après 5 min d'activation, le mélange monomère TMDS (3 sccm) et d'oxygène (0,0, 0,01, 0,025 ou 0,05 SLM) est envoyé en poste décharge pendant 5 minutes. Cette étape permettra la formation d'un dépôt à base de TMDS sur la surface des coupons d'acier inoxydable.

Tableau 1 : Débit de TMDS, N2, O2

	TMDS (sccm)	N2 (SLM)	O2 (SLM)
T	0	0	0
1	3	4,3	0,05
2	3	4,3	0,025
3	3	4,3	0,01
4	3	4,3	0
5	3	3	0,05
6	3	3	0,025
7	3	3	0,01
8	3	3	0

La modification du débit du gaz plasmagène ainsi que la concentration d'oxygène envoyée en poste décharge permet la croissance des revêtements sur les surfaces avec des propriétés différentes. Enfin, les coupons revêtus sont récupérés après avoir remis le réacteur à pression atmosphérique. Le tableau 1 montre les différents débits de N₂ / TMDS / O₂ utilisés pour l'élaboration de ces échantillons.

V. Procédures expérimentales pour la prévention de la formation de biofilms par voie active

Pour greffer sur le matériau des molécules antiadhésives, il est nécessaire d'avoir des groupements réactifs disponibles en surface de celui-ci. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une immobilisation covalente était préférable pour obtenir une interaction forte et éviter le relargage des molécules. Ainsi, la dopamine a été utilisée pour créer des revêtements riches en groupements amines. En condition basique, la dopamine s'oxyde au contact de l'oxygène sous forme de quinone et forme un réseau réticulé de polydopamine (Figure 5). Ensuite, les molécules bioactives sont immobilisées par différentes approches sur la surface par des liaisons covalentes avec ou sans l'aide des bras espaceurs (Figure 6). Dans cette étude, la Glutaraldéhyde ou l'acide Succinique sont utilisées comme bras espaceurs. L'utilisation d'un dialdéhyde permet d'éviter l'activation par EDC ou NHS des fonctions acides. En effet, le premier groupement aldéhyde réagit avec un groupement NH₂ de la polydopamine et l'autre groupement aldéhyde réagit avec un groupement NH₂ de la molécule greffer. En absence de Glutaraldéhyde ou dans le cas d'utilisation de l'acide succinique, le greffage covalent des molécules antibactériennes suppose la formation d'une liaison amide entre l'espaceur et la molécule. L'activation des fonctions acides carboxyliques de la molécule à immobiliser ou du bras espaceur est réalisée avec le NHS (N-HydroxySuccinimide). Le réactif de couplage, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), est ajouté au mélange pour former un intermédiaire acide très réactif. Ces acides activés, sous la forme d'esters, peuvent réagir avec des amines pour former des liaisons amides.

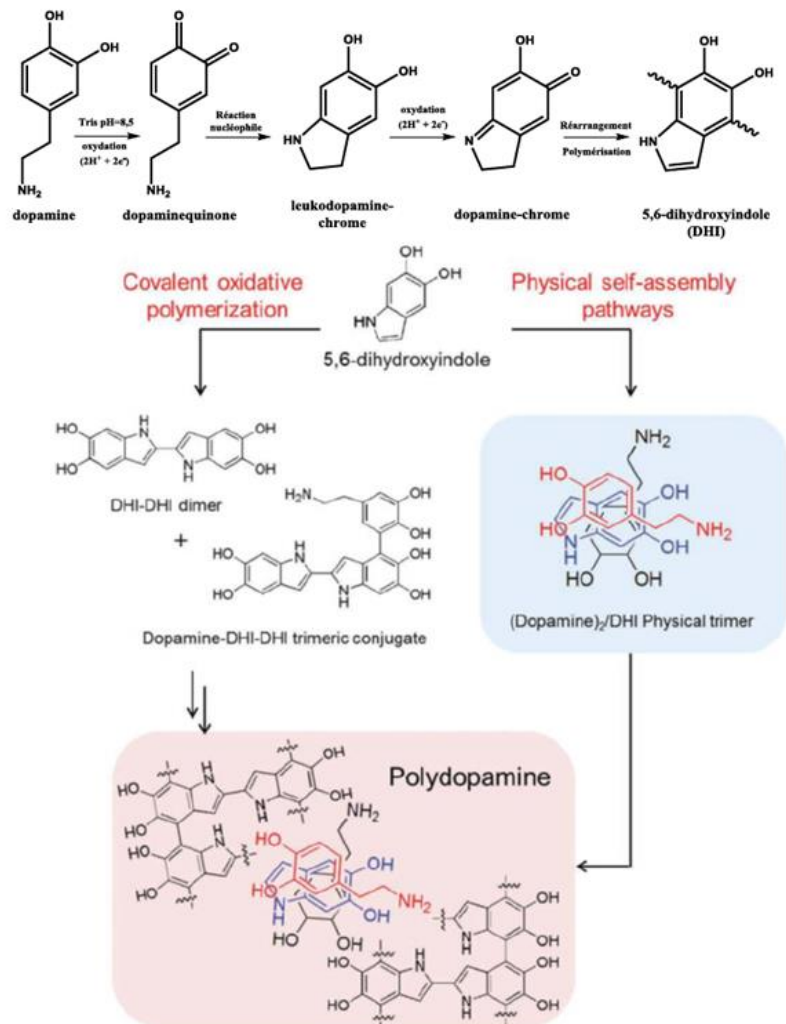


Figure 5: Mécanismes de polymérisation de la polydopamine

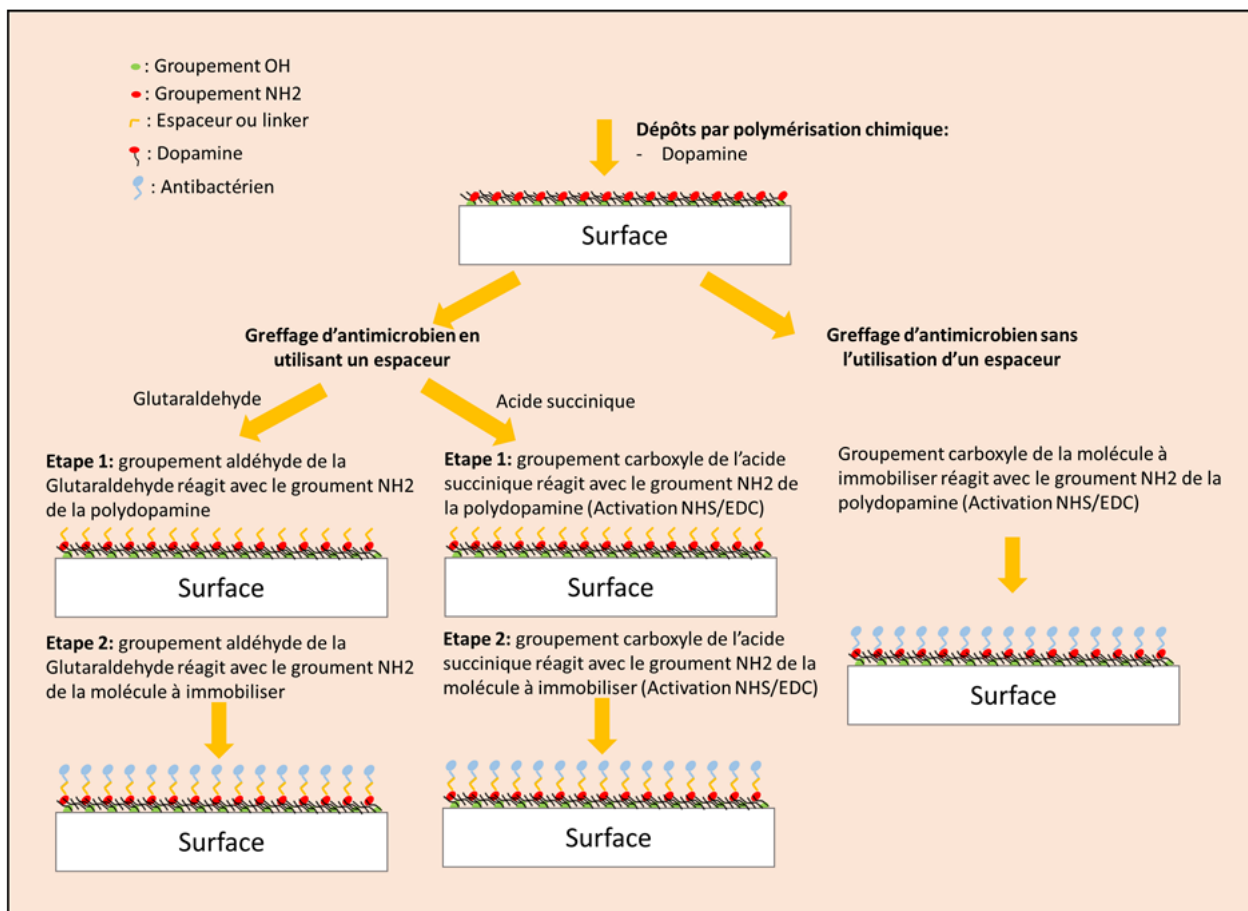


Figure 6: Fonctionnalisation de l'acier inoxydable

1. Revêtements par chimie classique sur acier inoxydable

a) Revêtement de polydopamine sur les coupons d'acier inoxydable 304 L : SS-Dopa

La dopamine hypochloride est dissoute dans une solution de tampon Tris-Base (10 mM) de façon à obtenir une concentration 2 mg/ml. Le pH de cette solution est rectifié à 8.5 par l'ajout d'hydroxyde de sodium NaOH (2M). Ensuite, 20 ml de cette solution sont versées dans une boîte de pétri contenant deux coupons nettoyés à l'éthanol. Cette boîte est incubée à 20°C pendant 24 heures sous agitation à 160 rpm. Cette agitation continue permet une polymérisation homogène de la dopamine et de prévenir le dépôt de plaques indésirables sur ces coupons. Après 24 heures d'incubation, les coupons sont rincés à l'eau déminéralisée stérile. En effet, la solution de dopamine est retirée de la boîte de pétri et les deux coupons sont placés à l'aide d'une pince stérile dans une nouvelle boîte de pétri propre contenant 20 ml d'eau déminéralisée stérile. Des mouvements circulaires sont réalisés pour rincer les coupons et éliminer les résidus de

polydopamine faiblement liés à la surface des coupons. Ce lavage a été réalisé 4 fois. Une fois que les lavages terminés, les coupons sont récupérés, séchés et placés dans une nouvelle boîte qui est ensuite fermée par du parafilm.

b) Immobilisation de la Glutaraldéhyde sur les coupons de polydopamine (SS-Dopa-Glu)

La Glutaraldéhyde, utilisé comme bras espaceur, est diluée dans de l'eau déminéralisée stérile à 3 %. 20 ml de cette solution sont versés dans la boîte contenant deux coupons SS-Dopa. Cette boîte est fermée par du parafilm et incubée à 20°C sous agitation pendant 24 heures. Après 24 heures d'incubation, les coupons sont rincés à l'eau déminéralisée stérile 4 fois selon les processus de lavage décrit ci-dessus. Enfin les coupons sont récupérés dans des boîtes de pétri, séchés et les boîtes fermées par du parafilm.

c) Immobilisation de poly(éthylèneimine) sur les coupons de SS-Dopa-Glu (SS-Dopa-Glu-PEI1 et SS-Dopa-Glu-PEI2)

Deux types de Poly(éthylèneimine) sont utilisés pour l'obtention de ces revêtements. Une solution de PEI 1 et une solution de PEI 2, chacune à une concentration de 3%, ont été préparées dans l'eau déminéralisée stérile. Chaque solution est vigoureusement homogénéisée au vortex. Ensuite, 20 ml de chaque solution sont versés dans des boîtes contenant les coupons SS-Dopa-Glu. Les boîtes sont fermées avec du parafilm et incubées à 20°C pendant 24 heures sous agitation. Après ces 24 heures, les coupons sont rincés à l'eau déminéralisée stérile 4 fois suivant le même protocole décrit ci-dessus. Enfin, les coupons sont récupérés dans des boîtes de pétri, séchés et les boîtes sont fermées par du parafilm.

d) Immobilisation de la Nisine sur les coupons de SS-Dopa-Glu : SS-Dopa-Glu-Nis

La Nisine est dissoute dans de l'acide chlorhydrique de 0,01 M (10 mg de Nisine dans 1 ml HCL 0.01 M). La Nisine étant insoluble dans l'eau, la dissolution de la Nisine dans l'HCL a été faite délicatement afin d'éviter la formation d'une mousse. Ensuite, la solution est diluée dans un tampon phosphate filtré (pH =6.2) afin d'obtenir une concentration de 1 mg/ml. Le pH est ensuite neutralisé jusqu'à 7 par l'ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH 2M). Ensuite, 20 ml cette sont versés sur les deux coupons SS-Dopa-Glu lavés. Les boîtes de pétri sont fermées par du parafilm et incubées pendant 24 heures sous agitation à 20°C. Après 24 heures, les coupons sont rincés et récupérés dans des nouvelles boîtes stériles.

e) Immobilisation directe de la Nisine sur les coupons de SS-Dopa: SS-Dopa-Nis

La solution de la Nisine a été préparée à une concentration 1mg/ml en suivant le protocole décrit ci-dessus. L'EDC et le NHS sont dissouts dans le tampon phosphate pH=6.2 et ajoutés à la solution de Nisine préparée (1mg/ml). La concentration finale d'EDC et du NHS est de 0,02 M et 0,01 M, respectivement. Pour immobiliser la Nisine, 20 ml de la solution sont directement versés dans une boîte de pétri contenant 2 coupons SS-Dopa. L'ensemble est incubé pendant 3 heures à 20°C sous agitation. Après 3 heures d'incubation, les coupons sont lavés 4 fois avec l'eau déminéralisée selon le protocole de lavage décrit ci-dessus.

f) Immobilisation de la Nisine sur les coupons de SS-Dopa en utilisant l'acide succinique comme bras espaceur: SS-Dopa-AS-Nis

Une solution contenant 3% d'acide succinique (AS), 0,02 M d'EDC et 0,01 de NHS a été préparé dans un tampon phosphate (pH=6.2 ; 10 mM). Le pH de la solution est ensuite ajusté à 4.3 par ajout d'hydroxyde de sodium NaOH 2M. Ensuite, 19.5 ml de cette solution sont versés dans une boîte de pétri contenant les coupons de SS-Dopa. La boîte est fermée par du parafilm et incubée à 20°C sous agitation pendant 3 heures. Après 3 heures, 0.5 ml de la solution contenant 20 mg de Nisine est versé dans la boîte de pétri et l'ensemble est incubé à nouveau pendant 24 heures à 20°C sous agitation. Après 24 heures, les coupons sont rincés 4 fois suivant le protocole de rinçage précédent.

2. Essais antibactériens qualitatifs des coupons sur un tapis bactérien

Pour les essais antimicrobiens, une suspension de l'ordre de 10^8 CFU/ml est préparée dans l'eau physiologique. Celle-ci correspond à une densité optique de 0.1 et à une longueur d'onde de 620 nm. Ensuite, 5 ml d'une solution bactérienne de *Listeria monocytogenes* de l'ordre de 10^6 CFU/ml sont versés sur chaque boîte de pétri contenant de la gélose TSA solide et stérile. Après 15 minutes d'attente, le surnageant de cette solution est enlevé. Ensuite, chaque coupon a été mis en contact avec le tapis bactérien déposé sur la gélose et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures. Après 24 heures d'incubation, une efficacité antibactérienne est observée par l'absence de croissance bactérienne au-dessus du coupon.

3. Essais antimicrobiens quantitatifs sur les différents types de coupons revêtus

Les challenge tests ou les tests d'épreuve microbiologique réalisés consistent à confronter les suspensions des bactéries pathogènes, tel que *Salmonella enterica* et *Listeria monocytogenes*, aux différents types de coupons revêtus. L'objectif de ces essais est d'évaluer l'activité antimicrobienne de ces revêtements. Les coupons d'acier inoxydable 304L non-revêtus sont utilisés comme des contrôles négatifs.

Le protocole suivi pour ces challenge tests a été élaboré en s'appuyant sur la norme ISO 22196 intitulée : « Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces ». [28]. En bref, une solution bactérienne de concentration de l'ordre de 10^5 CFU/ml a été préparé dans du Tryptone Soy Broth (TSB) dilué (1/100). 500 µl de cette solution bactérienne sont déposés sur la surface du coupon à tester pendant 3, 5 et 24 h. Après incubation, les 500 µl de solution bactérienne ainsi que le coupon sont récupérés et placés dans un récipient stérile contenant 9.5 ml de tryptone sel (9.5 g/l) stérile. Afin de décrocher les cellules, le récipient est vortexé pour 15 secondes, soniqué dans un bain à sonication pendant 5 minutes et vortexé à nouveau pendant 15 secondes. Ensuite, une dilution en série est effectuée pour cette suspension et les bactéries sont dénombrées par la technique de dénombrement dans la masse. En bref, 1 ml de chaque tube de dilution est ajouté au centre d'une boîte de pétri stérile et 20 ml de gélose Tryptone Soy Agar (TSA) liquide (45°C) sont ajoutés. Après homogénéisation du mélange gélose-suspension dans les boîtes de pétri et la solidification de la gélose, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'analyse de la mortalité bactérienne a été réalisée en comparant le nombre de colonies formés sur la gélose nutritive TSA correspondants aux coupons revêtus par rapport à celui correspondant aux coupons témoins.

4. Essais d'adhésion sur les différents types de coupons revêtus

Les tests d'adhésion bactérienne permettent de quantifier le nombre de bactéries qui ont adhérees à la surface des coupons étudiés après une heure d'incubation de la suspension bactérienne à température ambiante. L'objectif de ces tests est d'évaluer l'efficacité antiadhésive des coupons revêtus. Les souches retenues pour ces tests sont *Salmonella enterica* et *Listeria monocytogenes*. Les coupons d'acier inoxydables 304L non revêtus sont les contrôles négatifs.

Pour les essais d'adhésion, une suspension de l'ordre de 10^8 CFU/ml est préparée dans l'eau physiologique. Celle-ci correspond à une densité optique de 0.1 à une longueur d'onde de 620 nm. Afin de disperser les cellules bactériennes, les suspensions bactériennes sont soniquées pendant 5 minutes dans un bain à sonication (37 KHZ) puis vortexée. Ensuite, cette suspension est diluée à 10^7 CFU/ml. Dans des systèmes stériles contenant les coupons revêtus, 5 ml de cette suspension bactérienne sont ajoutés et l'ensemble est incubé pendant 1 heure à température ambiante. Au bout d'une heure, le volume déposé est prélevé avec précaution à l'aide d'une pipette. Ensuite, le coupon est récupéré et rincé avec 20 ml d'eau physiologique stérile pour éliminer les bactéries non adhérentes ou faiblement adhérentes.

Ensuite, 2 ml d'acridine orange (AO) 0.01% sont déposés sur le coupon afin de marquer les bactéries adhérentes. Au bout de 10 minutes d'incubation à l'obscurité, l'AO est prélevé et le coupon est rincé avec 2 ml d'eau physiologique stérile afin d'éliminer l'excès d'AO. Les coupons sont séchés à l'obscurité sous poste de sécurité microbiologique. Finalement, les coupons sont observés au microscope à épifluorescence au grossissement 100x. 25 à 30 photos des champs microscopiques sont prises et les bactéries sont dénombrées. Les résultats sont présentés par le nombre moyen des bactéries adhérentes par champ microscopique.

5. Caractérisation des surfaces

Après chaque étape de fonctionnalisation, les revêtements ont été analysés par différentes techniques de caractérisation. La mesure de l'angle de contact a été utilisée afin de déterminer la mouillabilité des revêtements et déterminer le caractère hydrophile/hydrophobe. Les analyses infrarouges ont été utilisées afin de d'étudier la nature chimique des groupements présents sur la surface. La microscopie à balayage électronique et la profilométrie ont été utilisées pour analyser la topographie et l'homogénéité des revêtements déposés.

a) *Mesure de l'angle de contact*

L'angle de contact d'un liquide sur un solide est l'angle formé par la surface du solide avec la tangente à la surface liquide au bord de la goutte. Sa valeur d'équilibre se calcule par la loi de Young-Dupré.

Les mesures d'angle de contact de l'eau avec la surface des coupons d'acier inoxydable nu et revêtu ont été obtenues par le goniomètre Digidrop DGD-ASE (GBX) (Figure 7). En bref, une gouttelette d'eau déminéralisée (5 μ l) a été déposée sur la surface du coupon à étudier et l'angle de contact a été déterminé en utilisant le logiciel Windrop ++. Au moins cinq gouttes ont été déposées. Les résultats présentent la moyenne de trois expériences indépendantes.



Figure 7: Goniomètre pour mesure de l'angle de contact

b) Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Cette technique de diagnostic permet de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans les molécules du dépôt présent sur les coupons à étudier. Elle est employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition et la nature chimique du dépôt sur les surfaces traitées. L'instrument ATR (NICOLET iS50 ABX FT-IR - Thermo-SCIENTIFIC) (Figure 9) a été utilisé en appliquant le revêtement à tester contre le cristal (Figure 8). Le spectre infrarouge d'adsorption de longueur d'onde allant de 400-4000 cm^{-1} apparaît ensuite sur un écran relié à cet instrument par le logiciel OMNIC.

Cette machine fonctionne en mesurant les modifications survenant dans un faisceau infrarouge reflété en interne lorsque le faisceau entre en contact avec un échantillon. Un faisceau infrarouge est dirigé vers un cristal optiquement dense avec un indice de réfraction élevé à un certain angle. Cette réflectance interne crée une onde évanescente qui s'étend au-delà de la surface du cristal et à l'intérieur de l'échantillon qui est en contact avec le cristal. Dans les régions du spectre IR où l'échantillon absorbe de l'énergie, l'onde évanescente est atténuée. Le faisceau atténué revient au cristal, puis quitte l'extrémité opposée du cristal et est dirigé vers le détecteur

dans le spectromètre IR. Le détecteur enregistre le faisceau IR atténué sous forme d'un signal d'interférogramme, qui peut ensuite être utilisé pour générer un spectre IR.

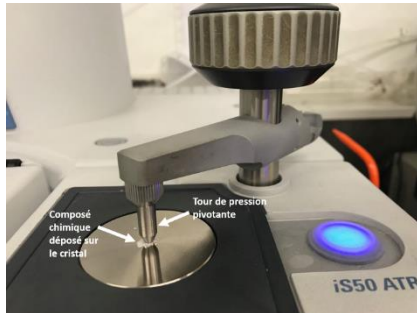


Figure 8: Tour de pression pivotante de l'instrument ATR - NICOLET iS50 ABX FT-IR - Thermo-SCIENTIFIC



Figure 9: L'instrument ATR (NICOLET iS50 ABX FT-IR - Thermo-SCIENTIFIC

Ensuite, pour l'analyse des coupons revêtus bien séchés par réflectance spéculaire véritable, le coupon d'acier inoxydable non modifié est utilisé comme un blanc (background). Cette technique de mesure de surface fonctionne sur le principe de l'efficacité réflective. Ce principe stipule que chaque échantillon a un indice de réfraction qui varie avec la fréquence de la lumière à laquelle il est exposé. Au lieu d'examiner l'énergie qui passe à travers l'échantillon, la réflectance spéculaire véritable mesure l'énergie qui est réfléchiée par la surface d'un échantillon, c'est-à-dire son indice de réfraction. En examinant les bandes de fréquence parmi lesquelles le taux de modification de l'indice de réfraction est élevé, les utilisateurs peuvent faire des suppositions concernant l'absorbance de l'échantillon.

c) Mesure de la rugosité de la surface par Alpha-step profilomètre

La rugosité des revêtements a été étudiée à l'aide du profilomètre de surface Alpha-step IQ (Kla Tencor, Milpitas, Californie). Les échantillons ont été balayés sur une longueur de 1 mm avec une vitesse de balayage de 20 $\mu\text{m/s}$, un taux d'échantillonnage de 50 Hz. Chaque échantillon a été scanné sur 3 endroits. L'acier inoxydable non modifié a été utilisé comme contrôle. La rugosité moyenne (R_a), la rugosité moyenne quadratique (R_q) ont été prises en compte.

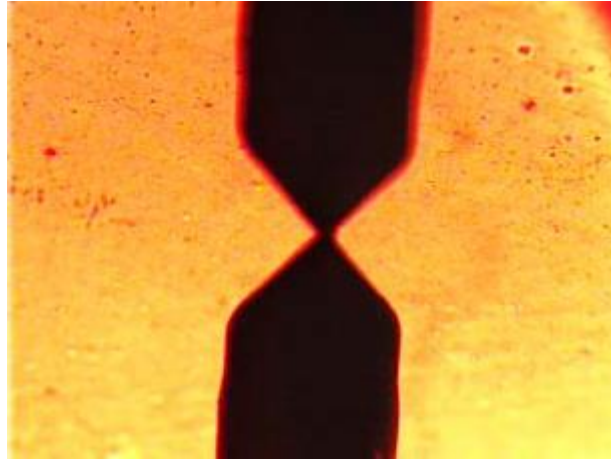


Figure 10: Champ microscopique montrant la surface de l'échantillon et l'aiguille de balayage de l'alpha-step profilomètre

d) Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie à balayage permet d'observer à haute résolution la surface des échantillons. La préparation des échantillons consiste à leur permettre de résister au faisceau d'électron du microscope électronique à balayage et à l'exposition au vide partiel ou poussé d'une part, et à les rendre conducteurs d'autre part.

Avant observation au microscope électronique, les échantillons sont rendus conducteurs par la technique de métallisation en appliquant une fine couche de carbone. Cette technique est réalisée en utilisant la machine à métallisation "BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater" (Figure 11).

Une fois ces coupons sont métallisés, La topographie a été observée par microscopie à balayage électronique (Hitachi S-4700 Scanning electron microscope SEM) (Figure 12)



Figure 11: Appareil à métallisation



Figure 12: Microscopie électronique à balayage

VI. Protocoles pour la stratégie d'éradication des biofilms

1. Préparation de la suspension d'adhésion et installation de biofilms

Une préculture et culture de *Salmonella enterica* sont réalisées à 20 ou à 37°C pour ces tests anti-biofilm. En fin de phase exponentielle, chaque culture est transférée dans un tube Falcon conique de 50 ml et les bactéries sont lavées deux fois par 20 ml d'eau physiologique stérile (0,85% NaCl) par centrifugation à 3000 *g* pendant 10 minutes à 20°C. Ensuite, les suspensions bactériennes, *S. enterica* ou *L. monocytogenes*, sont préparées à une concentration de l'ordre de 10⁸ CFU/ml. Celle-ci correspond à une densité optique de 0.1 à une longueur d'onde de 620 nm. Les bactéries sont ensuite dispersées par sonication pendant 5 minutes dans un bain ultrason (37 KHZ). Ensuite, les suspensions d'adhésion de l'ordre de 10⁷ CFU/ml sont préparées. Dans des réacteurs stériles d'installation des biofilms contenant les coupons nettoyés à l'éthanol (95 %), 5 ml de cette suspension bactérienne sont incubés pendant un temps d'adhésion d'une heure à la température ambiante. Au bout d'une heure, le volume déposé est prélevé avec précaution à l'aide d'une pipette 5 ml et 5 ml de tryptone soy broth (TSB) stérile sont déposés dans les systèmes d'installation de biofilms. Ces systèmes sont fermés et ensuite incubés 20°C ou à 37° pendant 24 heures.

2. Essai antibiofilm par l'action d'agents antimicrobiens

Après 24 heures d'incubation, les 5 ml de TSB sont retirés des systèmes et chaque coupon, sur lequel un biofilm de *Salmonella enterica* s'est formé, est trempé une fois dans 100 ml d'eau physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries non structurées en biofilm. Ensuite, le coupon est placé dans 20 ml de solution antibactérienne et l'ensemble est incubé pendant un temps précis et à température ambiante. Après ce temps, le coupon est retiré et placé dans 20 ml d'eau physiologique. Le biofilm est décroché en suivant un protocole de décrochage mis au point au laboratoire. En bref, la boîte contenant le coupon est vortexée pendant une minute, suivi par une sonication (37khz) pendant 5 minutes à (20°C). Après sonication, les tubes sont homogénéisés à nouveau pendant 1 minute et les solutions de récupération sont ensuite dénombrées sur milieu gélosé. Pour le dénombrement des bactéries, la solution de récupération est diluée jusqu'à 10⁻⁴ (par dilution au 10^{ème} dans 9 ml de Tryptone Sel) et 100 µl de chaque dilution sont étalés sur le milieu TSA. L'efficacité du produit est estimée par comptage des bactéries cultivables, après 24

heures d'incubation à 37°C et les résultats sont présentés sous forme de CFU/cm². La liste et les caractéristiques des produits utilisés sont présentées dans le tableau 2. L'eau physiologique est utilisée comme témoin négatif.

Tableau 2 : Conditions utilisées pour les essais anti-biofilm

Nature de l'agent antimicrobien	Concentration de l'agent antimicrobien	Temps de contact
Ammonium quaternaire	400 ppm	15 min
	200 ppm	
	100 ppm	
Désinfectant de surfaces concentré –Agent de surface non ionique et cationique (PROMER-Saneole)	0.25%	30 min
		15 min
		5 min

VII. Etude de la composition de la matrice du biofilm de *Salmonella enterica* suivant la température

a) Protocole de récupération de la matrice extracellulaire

Afin d'étudier les composants de la matrice des biofilms de *Salmonella enterica* en sucres totaux et en protéines totales, en fonction de la température d'installation de biofilms (20°C et 37°C), une installation de biofilm de *Salmonella enterica* à 20°C ou à 37°C a été réalisée.

Après rinçages des biofilms par l'eau physiologique, les bactéries structurées en biofilm sont décrochées en utilisant 4 ml d'eau physiologique. Ensuite, la suspension de récupération est homogénéisée vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un vortex, par la suite une sonication de 5 min (37 KHZ) est réalisée. Les tubes sont homogénéisés à nouveau pendant 1 minute suivi par une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, le surnageant est récupéré, filtré à travers des filtres 0,2 µm (Millipore, France) et conservé à -20°C pour la quantification des protéines totales et des sucres totaux.

b) Dosage des sucres totaux de la matrice extracellulaire

Le dosage des sucres totaux dans les échantillons (Matrice 20°C ou 37°C), a été appliqué par la méthode de Dubois (1956). En présence de l'acide sulfurique, les glucides se combinent

avec le phénol et donnent une coloration jaune-orangé. La gamme étalon est réalisée en utilisant une solution de glucose-anhydre (Sigma Aldrich, France). En bref, 1 ml d'échantillon à doser est mélangé avec 2,5 ml de H₂SO₄ (95%). Ensuite, 500µl d'une solution de phénol (10% w/v) est ajoutée. Les tubes sont homogénéisés par un vortex et incubés à 95°C pendant 5 minutes. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique est mesurée à 490 nm. La quantité en sucres (µg) de chaque échantillon est déterminée et convertie en une concentration en µg/cm².

c) [Dosage des protéines totales de la matrice extracellulaire](#)

La quantification des protéines est réalisée en suivant la méthode décrite par Bradford (1976), basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 sur les protéines. L'intensité de coloration est directement proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la solution. Une gamme étalon réalisée avec de la Bovine Sérum Albumine (BSA) (µg/ml) a servi pour estimer la concentration de protéines totales dans les échantillons tests. En bref, 500 µl de la solution à tester sont mélangés avec 2 ml du réactif de Bradford (Sigma Aldrich, France). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 35 minutes. Ensuite, la densité optique est mesurée à 595 nm et la concentration des protéines dans les échantillons est exprimée en µg/cm².

RESULTATS OBTENUS

I. Prévention de formation de biofilm

Pour prévenir les infections alimentaires liées à la formation de biofilms, ce travail porte sur l'étude des paramètres qui empêchent ou limitent cette adhérence en contrôlant les phénomènes aux interfaces Bactérie/Matériaux. L'objectif de ce travail est d'élaborer des biomatériaux éco-conçus permettant de réduire le phénomène de contamination d'équipements et les pertes économiques liées aux infections par des bactéries pathogènes. Ce travail s'est focalisé sur l'élaboration des traitements de surface de l'acier afin de les rendre fonctionnelles avec une activité anti-adhésion ou, et anti-biofilm, par une approche passive ou active. Les modifications de propriétés de surfaces ont fait appel à des techniques de pointe utilisant la voie du Plasma froid et la chimique/biochimique classique.

II. Prévention de formation de biofilm par voie passive

L'élaboration de revêtements à base de 1, 1, 3,3-Tetramethyldisiloxane (TMDS) à 97% de pureté est une approche de prévention de la formation de biofilms bactériens en inhibant l'adhésion bactérienne. Cette inhibition est faite par repoussement des bactéries grâce aux caractéristiques de la surface du dépôt à base de TMDS. De ce fait, cette approche préventive a été appelée passive puisqu'elle repousse sans tuer les bactéries.

Le monomère de TMDS qui est un composé organosilicié n'a pas de propriété antimicrobienne. Il a été utilisé pour ce dépôt, par la technique plasma froid micro-onde, pour ses caractéristiques chimiques, son coût faible, sa résistance à la chaleur et à l'abrasion, ainsi que ses propriétés hydrophobes/hydrophiles selon le changement des conditions de l'expérience. Le but étant d'obtenir des revêtements hydrophobes qui pourraient inhiber l'adhésion bactérienne.

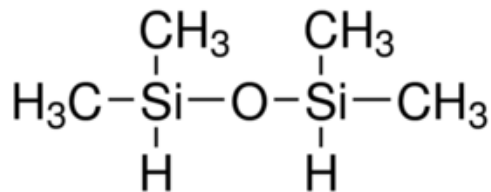


Figure 13: Formule chimique du 1, 1, 3, 3-Tetramethyldisiloxane

1. Dépôts à base de TMDS en fonction du débit du gaz plasmagène et de l'oxygène O₂

La technique plasma froid micro-onde a permis de produire des dépôts de à base de TMDS à propriétés différentes sur des coupons d'acier inoxydable. Ceci a été réalisé en modifiant le débit du gaz plasmagène N₂ et le débit d'O₂ envoyé en poste décharge. Le flux d'oxygène dans le plasma influence la concentration des sous-produits formés dans le plasma, tend vers une structure inorganique SiOx et augmente la réticulation du film déposé. Les essais ont été réalisés avec un débit stable du monomère (TMDS) de l'ordre de 3 sccm. L'objectif de ces expériences est de mettre au point des surfaces avec une activité anti-adhésion bactérienne importante pour une application dans les industries agroalimentaires. Par ailleurs, les essais préliminaires, réalisés au sein du laboratoire, montrent que ce type de surface ne présente pas une activité antibactérienne. Ainsi, les essais antibactériens ou Challenge tests n'ont pas été réalisés sur les revêtements plasma à base de TMDS.

Les observations à l'œil nu montrent que les revêtements à base de TMDS couvrent la totalité de la surface et présentent des irisations comme le montre la Figure 14. Par ailleurs, les résultats ont montré que ces dépôts sont stables à l'exception des dépôts réalisés sous les conditions 4 et 8 du tableau 3 (dépôts poudreux et non adhérents). Ainsi, ces dépôts n'ont pas été retenus et considérés pour la suite des essais.

Tableau 3: Conditions expérimentales utilisées pour les revêtements à base de TMDS

	TMDS (sccm)	N2 (SLM)	O2 (SLM)
T	0	0	0
1	3	4,3	0,05
2	3	4,3	0,025
3	3	4,3	0,01
4	3	4,3	0
5	3	3	0,05
6	3	3	0,025
7	3	3	0,01
8	3	3	0



Figure 14: Irisations sur coupon revêtu à base de TMDS

2. Test d'adhésion bactérienne sur coupons TMDS

Après les revêtements des surfaces par des dépôts plasma à base de TMDS, l'adhésion bactérienne de *Salmonella enterica*, une bactérie Gram négative, a été étudiée sur les surfaces modifiées. L'objectif de ces essais est d'évaluer la capacité antiadhésive des surfaces modifiées. Les résultats d'adhésion sont présentés dans la figure 15. Il faut noter que le dépôt obtenu suivant la condition, où le débit d'oxygène est égal à 0 SLM, n'a pas été pris en compte dans nos expériences (revêtement instable). Les bactéries adhérentes ont été observées et dénombrées par microscopie à épifluorescence après marquage à l'acridine orange (Figure 15).

Tableau 4 : Nombre de bactéries adhérentes suivant les différentes conditions TMDS/O2/N2

	TMDS (sccm)	N2 (SLM)	O2 (SLM)	Bactéries
T : Témoin	0	0	0	20,2 ± 2,8
1	3	4,3	0,05	29,0 ± 3,8
2	3	4,3	0,025	63,2 ± 3,5
3	3	4,3	0,01	64,7 ± 3,9
4	3	3	0,05	1,0 ± 0,9
5	3	3	0,025	1,7 ± 1,0
6	3	3	0,01	1,2 ± 1,4

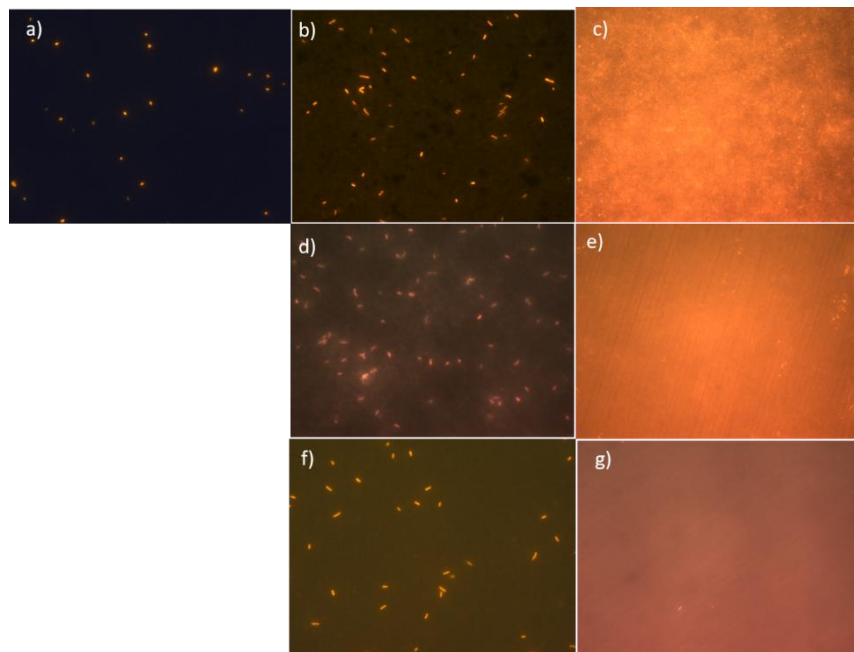


Figure 15: Champs microscopique (grossissement 100x) montrant l'adhésion bactérienne selon différentes conditions ; a) Acier inoxydable non modifié SS : TMDS=0 sccm, N2= 0 SLM, O2 = 0 SLM ; b) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 4.3 SLM, O2 = 0.01 SLM ; c) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 3 SLM, O2 = 0.01 SLM ; d) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 4.3 SLM, O2 = 0.025 SLM ; e) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 3 SLM, O2 = 0.025 SLM ; f) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 4.3 SLM, O2 = 0.05 SLM ; g) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 3 SLM, O2 = 0.05 SLM

La figure 15 et le tableau 4, montrent que le taux d'adhésion sur l'acier non-modifié est de l'ordre de 20 bactéries par champ microscopique. Par ailleurs, les résultats d'adhésion ont montrés que le taux d'adhésion sur les surfaces modifiées est dépendent du débit d'azote plasmagène et d'oxygène. En effet, le tableau 4 montre que le taux d'adhésion bactérienne sur les surfaces 1, 2 et 3 est de l'ordre de 29, 63 et 64 bactéries par champ microscopique, respectivement. Cependant, la diminution du débit d'azote de 4,3 à 3 SLM a entraîné une diminution significative de taux d'adhésion bactérienne. En effet, le taux d'adhésion sur les surfaces modifiées, selon les conditions 4, 5 et 6 (avec un débit d'azote plasmagène de 3 SLM), est de l'ordre de 1.3 bactéries par champ microscopique quel que soit le débit d'oxygène utilisé (Figure 15).

3. Caractérisation des propriétés de surface de revêtements plasma à base de TMDS

Il faut noter que l'adhésion bactérienne est un processus dynamique et fortement influencé par les propriétés de surfaces des supports abiotiques. Ainsi, les propriétés hydrophiles/hydrophobes des surfaces modifiées ont été caractérisées par les mesures d'angle de contact avec l'eau, ainsi que la nature des liaisons chimiques par spectroscopie infrarouge. La topographie et la rugosité des dépôts ont été analysées par profilométrie et microscopie à balayage électronique. L'objectif de ces essais est d'évaluer l'influence de propriétés de surface sur l'adhésion bactérienne.

a) Angle de contact sur les revêtements à base de TMDS

Les mesures d'angle de contact ont été menées avec l'eau sur les surfaces modifiées par des polymères plasma à base de TMDS. Les valeurs moyennes et les écart-types obtenus pour chaque type de revêtement sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Angle de contact sur coupons TMDS suivant différents débits N2_O2

	TMDS (sccm)	N2 (SLM)	O2 (SLM)	Contact angle
T	0	0	0	60,6 ± 2,8
1	3	4,3	0,05	108,5 ± 1,2
2	3	4,3	0,025	128,1 ± 1,2
3	3	4,3	0,01	137,7 ± 1,3
4	3	4,3	0	94,5 ± 1,0
5	3	3	0,05	96,2 ± 1,2
6	3	3	0,025	94,3 ± 1,3
7	3	3	0,01	96,0 ± 1,0
8	3	3	0	90,9 ± 1,2

Les résultats du tableau 5 montrent que la modification des surfaces par des revêtements plasma à base de TMDS augmente l'hydrophobicité des surfaces. En effet, l'acier inoxydable non-modifié a présenté un angle de contact de l'ordre de 60°. Les surfaces revêtues, avec un débit d'azote plasmagène de l'ordre de 3 SLM, ont montré un caractère hydrophobe avec un angle de contact de l'ordre de 94° quel que soit le débit d'oxygène utilisé. De plus, ce tableau montre que l'augmentation du débit d'azote plasmagène de 3 à 4,3 SLM a entraîné une augmentation significative du caractère hydrophobe. En effet, les valeurs d'angle de contact des surfaces modifiées selon les conditions 1, 2 et 3 sont respectivement de l'ordre de 108, 128 et 137°.

b) Spectre infrarouge sur les revêtements à base de TMDS

La spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR pour Fourier Transform of InfraRed) est une technique qui permet de collecter les données spectrales relatives aux liaisons chimiques présentes dans un matériau. Le principe de cette technique est basé sur l'exposition d'un matériau à un faisceau infrarouge dans le domaine de nombres d'ondes compris généralement entre 400 et 4000 cm^{-1} . La fréquence de vibration à laquelle se produit l'absorption est une caractéristique intrinsèque de la liaison chimique présente sur la surface. Ainsi, les liaisons chimiques présentes dans le matériau peuvent être mises en évidence par leur présence dans le spectre de bandes d'absorption correspondant à leurs différents modes de vibrations.

Dans un premier temps, la composition des films a été évaluée par spectroscopie infrarouge. Les résultats montrent que les spectres infrarouges sont relativement similaires quelle que soit la condition étudiée (Figure 16a, b et c). Ceci montre que la chimie de la surface ne change

pas d'une manière significative en changeant les conditions expérimentales (débits de N₂ et d'O₂). La présence de la bande à 2966 cm⁻¹ révèle une conservation des groupements méthyles présent dans la molécule de TMDS. De plus, les spectres montrent la présence de pic situé à 850 cm⁻¹ qui correspond à la vibration de liaison Si-(CH₃)₃ présent dans la molécule de TMDS. Les spectres montrent également la formation de groupements de type Si-(CH₃)₂ (783 cm⁻¹). La présence de ces bandes indique que les bouts de chaînes de la molécule du monomère sont partiellement gardés dans les revêtements. Le pic d'absorption à 1100 cm⁻¹ correspond de la liaison Si-O-Si. La bande large, observée à 3300 cm⁻¹, montre la présence des groupements hydroxyles est attribuée à la vibration des groupes Si-OH (silanol) et le groupement OH dues à la dissociation de la liaison Si-O. Ceci montre que l'ajout d'un gaz oxydant montre une évolution vers une structure SiO_x. De plus, ces spectre montre que la molécule a été partiellement fragmentée par les espèces du plasma qui a entraîné une réorganisation et la formation de nouvelles liaisons (Figure 16c). La présence des groupements Si(CH₃)₃, Si(CH₃)₂, Si(O)₂ à 845 cm⁻¹ et Si(O)₃ à 887 cm⁻¹ suggèrent la présence d'une structure sous forme de chaîne linéaire ou ramifiée de type SiO_x(CH₃)_y comme le montre la figure 17.

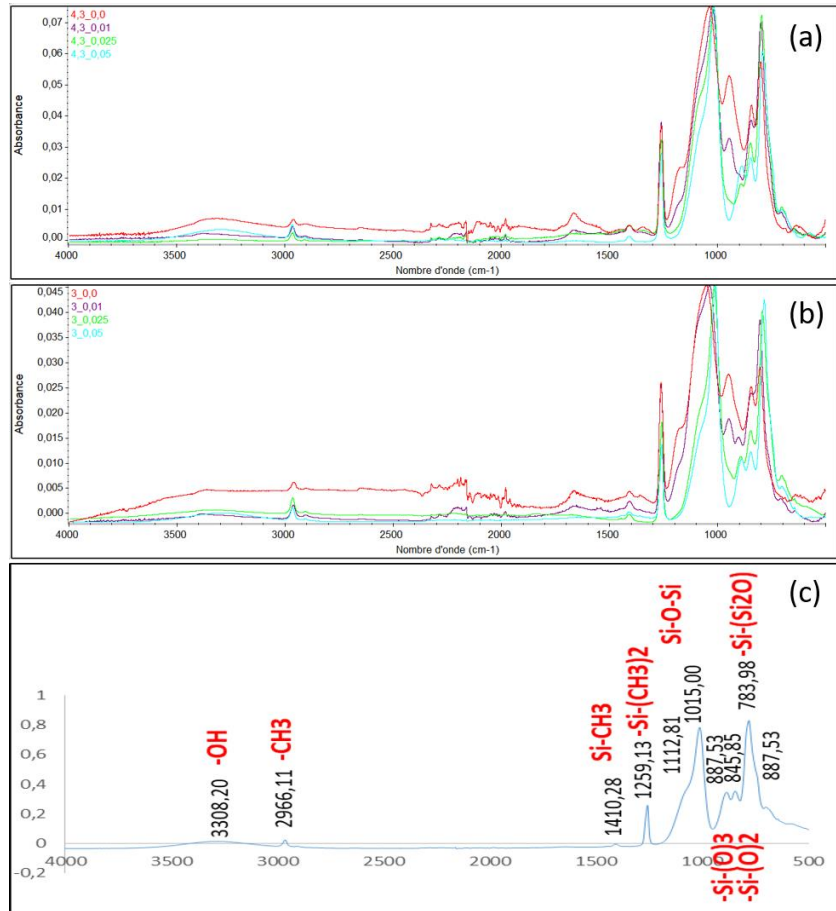


Figure 16 : Spectre infrarouge de bandes d'absorption du dépôt à base de TMDS (N₂_O₂); (a) Courbes du débit N₂ = 4,3 SLM et O₂ = 0,0 ; 0,01 ; 0,025 ; 0,05 SLM (b) Courbes du débit N₂ = 3 SLM et O₂ = 0,0 ; 0,01 ; 0,025 ; 0,05 SLM (c) Courbe représentant la condition (3_0,05)

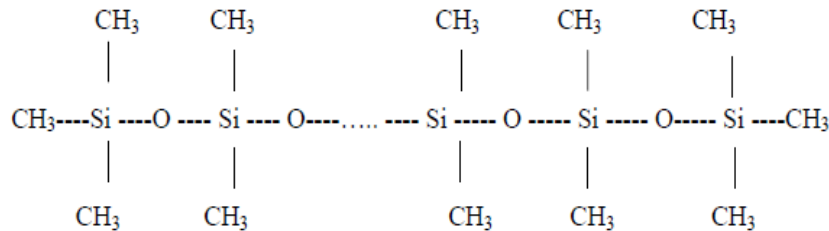


Figure 17: Structure des dépôts sous forme de chaîne linéaire de type SiO_x(CH₃)

1. Etude de la morphologie des dépôts

a) Etude de la rugosité des dépôts par profilométrie

La rugosité de la surface des dépôts à base de TMDS a été étudiée en utilisant un profilomètre de surface de type Alpha-step IQ. Les paramètres de rugosité, Ra et Rq, sont présentés dans le tableau 6. Les résultats montrent une variation de la rugosité des dépôts avec le changement du débit de gaz plasmagène (N₂) et d'O₂.

Tableau 6 : Rugosité des différents coupons TMDS

	N2 (SLM)	O2 (SLM)	TMDS (sccm)	Ra (nm)	Rq (nm)
Acier inoxydable	0	0,000	3,00	2,82 ± 0,10	3,94 ± 0,47
1	4,3	0,010	3,00	69,83 ± 8,94	83,06 ± 7,27
2	4,3	0,025	3,00	54,46 ± 0,60	68,90 ± 0,64
3	4,3	0,050	3,00	20,55 ± 0,90	33,32 ± 1,31
4	3	0,010	3,00	5,12 ± 0,92	8,68 ± 1,17
5	3	0,025	3,00	1,63 ± 0,20	2,10 ± 0,27
6	3	0,050	3,00	2,08 ± 0,34	3,43 ± 0,61

Le tableau 6 montre que l'acier non-modifié présente une surface lisse avec un Ra et Rq de l'ordre de 3 et 4 nm, respectivement. Les revêtements déposés, en appliquant un débit de gaz plasmagène de l'ordre de 3 SLM, sont également lisses et présentent des valeurs de Ra et de Rq relativement similaires à l'acier non modifiée. Le tableau 6 montre que les Ra des dépôts 4, 5 et 6 sont respectivement de l'ordre de 5, 1.5 et 2 nm. Les Rq des dépôts 4, 5 et 6 sont respectivement de l'ordre de 9, 2 et 4 nm. Cependant, l'augmentation du débit de gaz plasmagène de 3 à 4,3 SLM a significativement augmenté la rugosité des revêtements. Avec un gaz plasmagène de l'ordre de 4,3 SLM, les résultats montrent que l'augmentation du débit d'O2 entraine une diminution de la rugosité de surface des revêtements. Le tableau 6 montre que les Ra des dépôts 1, 2 et 3 sont respectivement de l'ordre de 69, 54 et 21 nm. Les Rq des dépôts 1, 2 et 3 sont respectivement de l'ordre de 83, 69 et 33 nm.

b) Microscopie électronique à balayage des revêtements TMDS

La microscopie à balayage électronique a permis d'observer à haute résolution la topographie des revêtements à base de TMDS. Ces surfaces sont rendues conductrices par métallisation avant cette analyse. Les surfaces revêtues par de polymère plasma à base de TMDS dans les différentes conditions ont été visualisées à l'aide d'un microscope à balayage électronique en utilisant les grossissements 10.0 K et 20.0 K. Dans ce rapport, seulement les photos, prises au grossissement 20.0 K, sont présentées (Figure 18). En effet, ces photos illustrent au mieux la topographie des revêtements déposés.

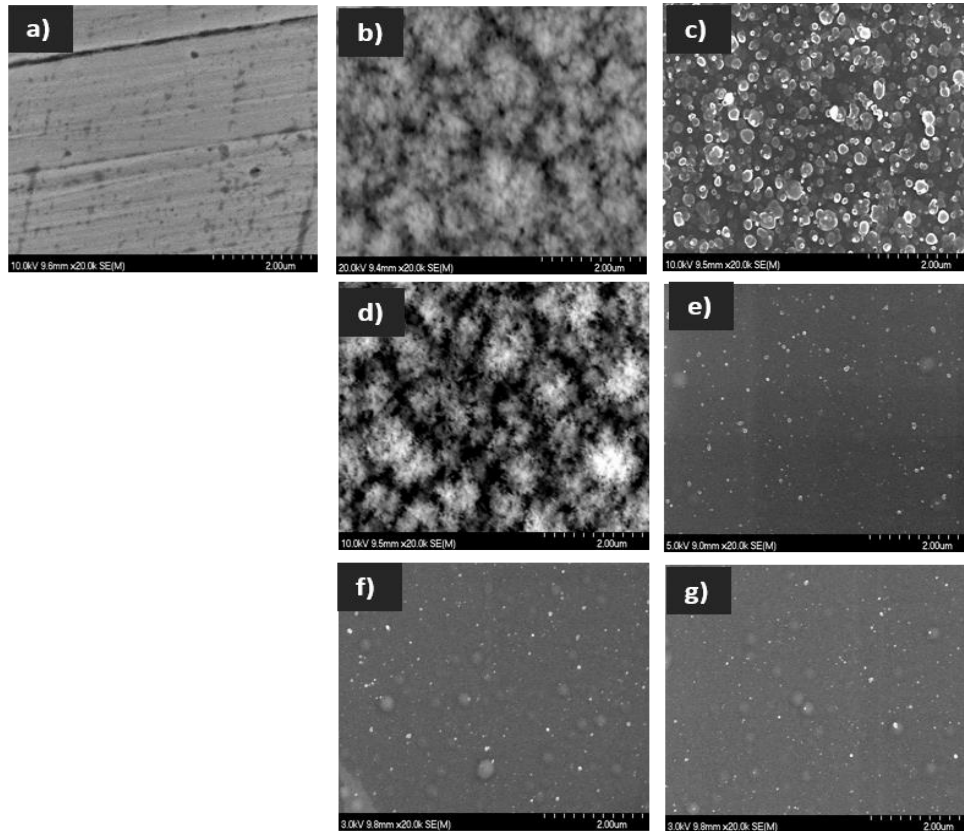


Figure 18 : Microscopie électronique à balayage TMDS ; a) Acier inoxydable non modifié SS : TMDS=0 sccm, N2= 0 SLM, O2 = 0 SLM ; b) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 4.3 SLM, O2 = 0.01 SLM ; c) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 3 SLM, O2 = 0.01 SLM ; d) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 4.3 SLM, O2 = 0.025 SLM ; e) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 3 SLM, O2 = 0.025 SLM ; f) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 4.3 SLM, O2 = 0.05 SLM ; g) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N2= 3 SLM, O2 = 0.05 SLM

La figure 18a montre que l'acier non revêtu présente une topographie lisse avec la présence des fissures et des crevasses irréguliers. Par ailleurs, les figures 18c, 18e et 18g montrent que les revêtements déposés, en appliquant un gaz de plasmagène de l'ordre de 3 SLM, ont relativement montré une topographie lisse quel que soit le débit d'oxygène utilisé. Les résultats de la figure 18c montre que l'application d'un débit d'O2 a entraîné l'apparition d'une topographie relativement lisse avec un aspect faiblement granuleux (présence des petites granules dont la taille ne dépasse pas le 0.5 μm). De plus, ces photos montrent que les dépôts ont couvert d'une manière régulière la surface de l'acier (absence des fissures et des crevasses). Les observations par MEB a montré que l'augmentation du débit de gaz plasmagène, en utilisant un débit d'O2 de l'ordre 0,01 et 0,025 SLM, a provoqué une topographie irrégulière avec des aspérités et des cavités (Figure 18b et 18d). Cependant, la figure 18f montre que l'application

d'un gaz plasmagène de 4,3 SLM avec un débit d'O₂ de 0,05 SLM a permis une croissance d'un revêtement homogène et lisse sur l'acier.

III. Prévention de formation de biofilms par voie active

1. Fonctionnalisation de l'acier inoxydable par des molécules présentant une activité antimicrobienne potentielle

L'objectif de cette partie de travail est de mettre au point des surfaces qui présentent une activité antiadhésive et, ou antibactérienne. Par ailleurs, les résultats présentés ci-dessus montrent que les revêtements à base de TMDS ne présentent pas de groupements fonctionnels tels que NH₂ ou COOH, ce qui rend l'immobilisation des molécules antimicrobiennes difficiles. Ainsi, des revêtements à base de dopamine, qui se polymérise en polydopamine et présente des groupements NH₂, ont été déposés sur l'acier. Ensuite, des molécules antimicrobiennes, le PEI 1, le PEI 2, et la Nisine, ont été greffées par des liaisons covalentes. La Glutaraldéhyde et l'acide succinique ont été utilisés comme de bras espaceurs pour lier la polydopamine aux molécules antibactériennes. Ensuite, des essais d'adhésion et antibactériennes ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité des revêtements. Les propriétés de surface des dépôts ont été analysées par mesure d'angle de contact, spectroscopie infrarouge, rugosimétrie et microscopie à balayage électronique.

2. Résultats concernant les revêtements avec les molécules PEI 1 et PEI 2

a) Essais d'adhésion bactérienne

Après l'immobilisation des PEI 1 et 2, l'adhésion de *Salmonella enterica* a été étudiée sur ces surfaces modifiées (SS-Dopa-Glu-PEI 1 et SS-Dopa-Glu-PEI 2). L'adhésion bactérienne a été étudiée par microscopie à épifluorescence après marquage des bactéries à l'acridine orange. Les résultats d'adhésion bactérienne sur l'acier nu et les surfaces modifiées sont présentés dans le Tableau 7 et la Figure 19.

Tableau 7 : Nombre de bactéries adhérees par champ microscopique

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Glu-PEI 1	SS-Dopa-Glu-PEI 2
Nb bactéries/Champ microscopique	20,46 ± 4,71	10,90 ± 4,94	8,16 ± 3,84	6,46 ± 4,45	7,22 ± 5,40

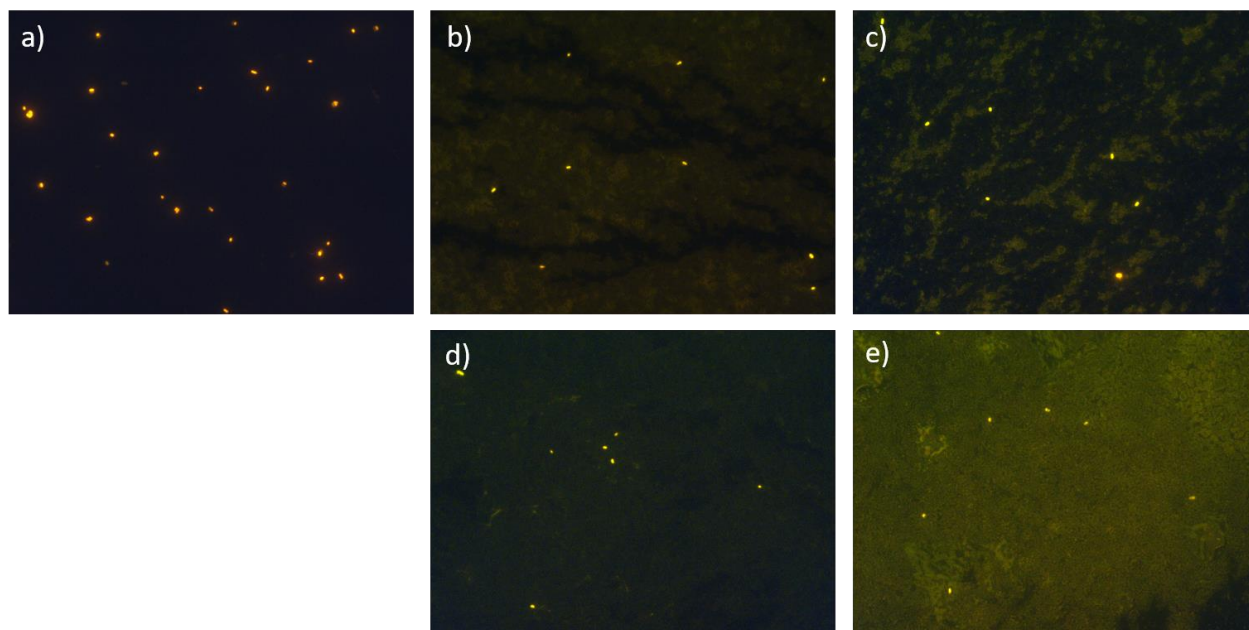


Figure 19 : Champs microscopiques (grossissement 100x) montrant *PSnella enterica* adhérees ; a) Acier inoxydable non modifié ($20,46 \pm 4,71$) ; b) Coupon SS-Dopa ($10,9 \pm 4,94$) ; c) Coupon SS-Dopa-Glu ($8,16 \pm 3,84$) ; d) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI1 ($6,46 \pm 4,45$) ; e) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI2 ($7,22 \pm 5,4$)

Les essais d'adhésion montrent que le taux d'adhésion de *S. enterica* sur l'acier non modifié (SS) est de l'ordre de 20 bactéries par champ microscopique. Par ailleurs le Tableau 7 montre que les taux d'adhésion bactérienne sur l'acier modifié par la dopamine (SS-Dopa) et la Glutaraldéhyde (SS-Dopa-Glu) est respectivement de l'ordre de 11 et 8 bactéries par champ microscopique. Les résultats obtenus montrent que l'immobilisation des PEI sur l'acier a entraîné une diminution non significative de l'adhésion bactérienne par comparaison à l'acier nu et revêtu par la polydopamine et la Glutaraldéhyde. En effet, le taux d'adhésion sur l'acier modifié par le PEI 1 (SS-Dopa-Glu-PEI1) et le PEI 2 (SS-Dopa-Glu-PEI1) est de l'ordre de 7 bactéries par champ microscopique.

b) Essais antibactériens (Challenge test)

Tableau 8 : Log CFU/cm² sur chaque type de coupon

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Glu-PEI1	SS-Dopa-Glu-PEI2
Log CFU/cm ²	$6,79 \pm 0,15$	$6,32 \pm 0,11$	$6,16 \pm 0,04$	$6,51 \pm 0,04$	$6,17 \pm 0,07$

Après l'immobilisation des PEI et les essais d'adhésion, les expériences ont concerné l'évaluation de l'activité antibactérienne des surfaces modifiées contre *Salmonella enterica*.

L'objectif de ces essais est d'évaluer l'activité anti-biofilm des surfaces modifiées avec l'immobilisation de PEI 1 et 2. Les essais antibactériens montrent que les surfaces modifiées, SS-Dopa, SS-Dopa-Glu, SS-Dopa-Glu-PEI 1 et SS-Dopa-Glu-PEI 2, ne présente pas une activité antibactérienne. En effet, la biomasse cultivable des bactéries, après exposition à l'acier nu et les surface modifiées, est de l'ordre de 6 log/cm² (Tableau 8).

c) Caractérisation des propriétés de surface de revêtements de PEI 1 et PEI 2

Après les essais anti-adhésions et antibactériens, les expériences ont concerné la caractérisation des surfaces modifiées par l'analyse d'angle de contact, la nature chimique par spectroscopie infrarouge, la rugosité par profilométrie et la topographie par microscopie à balayage électronique. L'objectif de ces analyses est de s'assurer de l'immobilisation des PEIs sur les surfaces.

i. Angle de contact

Les mesures d'angle de contact de l'eau avec la surface des coupons revêtus par polydopamine, Glutaraldéhyde, PEI 1 et PEI 2 ont été obtenues en déposant 1 gouttelette d'eau déminéralisée (5 µl) avec 5 réplicats à la température ambiante. Les valeurs moyennes et les écart-type des mesures, pour chaque type de revêtement, sont représentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Angle de contact suivant chaque type de coupon

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Glu-PEI1	SS-Dopa-Glu-PEI2
Angle de contact (θ°)	60,6 ± 2,80	53,92 ± 0,96	44,2 ± 0,54	9,44 ± 3,15	6,75 ± 0,66

Les mesures d'angle de contact montrent que l'acier non-modifié présente un angle de contact de l'ordre de 60,6°. La modification de surfaces par un revêtement polydopamine et Glutaraldéhyde a entraîné une diminution de l'hydrophobicité des surfaces. En effet, les surfaces modifiées par la polydopamine et la Glutaraldéhyde ont respectivement montré un angle de contact de l'ordre de 54 et 42 °. Cependant, l'immobilisation des PEI sur les surfaces SS-Dopa-Glu a rendu les surfaces super-hydrophiles. En effet, l'angle de contact avec l'eau, après immobilisation de PEI 1 et 2, a chuté à des valeurs inférieures à 10°.

ii. Spectre infrarouge

Afin de confirmer l'immobilisation des molécules sur les coupons élaborés, les surfaces ont été caractérisées par infrarouge par réflexion totale atténuée (ATR). Les spectres IR/ATR des surfaces sont répertoriés dans la Figure 20.

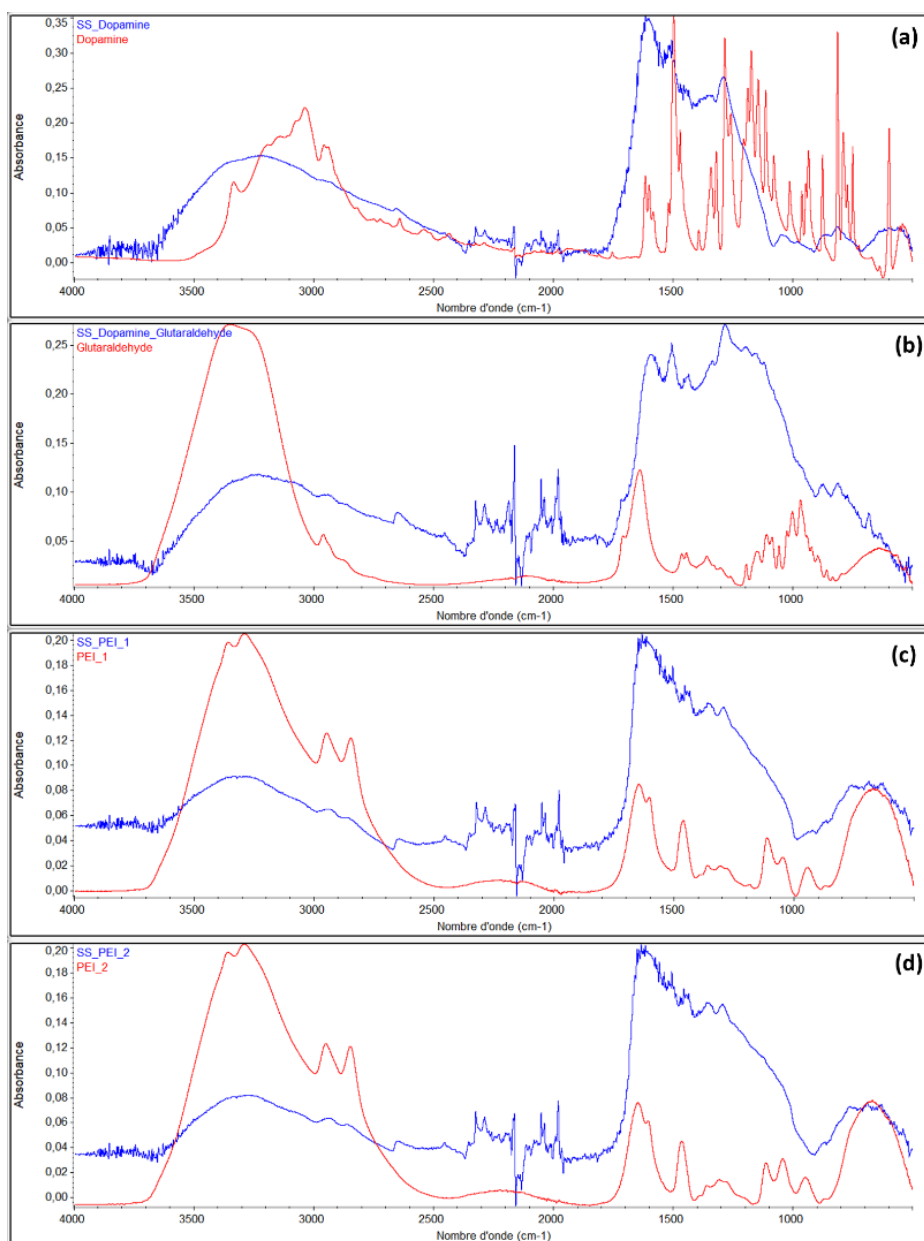


Figure 20 : Spectre infrarouge ATR, FTIR ; (a) Courbes Dopamine et SS-Dopa; (b) Courbes Glutaraldéhyde et SS-Dopa-Glu (c) Courbe PEI1 et SS-Dopa-Glu-PEI1 ; (d) Courbes PEI2 et SS-Dopa-Glu-PEI2

L'analyse de spectres infrarouges montre que l'allure du spectre de la dopamine seule est légèrement différente de celle de la polydopamine (Figure 20a). En effet, certains pics présents dans le spectre de la dopamine ont disparus du spectre de la polydopamine. Ceci est certainement dû à la polymérisation de la dopamine (disparition des groupements et formation des nouvelles liaisons). Les caractéristiques observées sont une large bande à $3700\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ qui correspond à la liaison amine (N-H) et la liaison hydroxyle (O-H). La bande à 1500 cm^{-1} est attribuée aux liaisons (C = C) et (C = N). La présence des amines aromatiques dans le revêtement déposé confirme la présence de dopamine sur la surface et sa polymérisation en poly-dopamine. Les pics observés à 1600 cm^{-1} et 1290 cm^{-1} sont attribués aux liaisons C=O et C – O. Le pic à 1600 cm^{-1} correspond également à la liaison (N-H).

Par ailleurs, les spectres infrarouges des surfaces modifiées avec la Glutaraldéhyde présentent une similitude très importante avec le spectre de la polydopamine. En effet, la majorité des pics caractéristiques de la Glutaraldéhyde et de la polydopamine sont similaires. Ainsi, les pics caractéristiques de la polydopamine semblent masquer les liaisons et les groupements caractéristiques de la Glutaraldéhyde (Figure 20b). Selon la littérature, les PEI présentent des pics d'absorption caractéristiques des groupes amine situés à 3400 et 1651 cm^{-1} [29]. Ainsi, les résultats, sur les surfaces modifiées avec le PEI 1 et PEI 2, montrent que ces pics sont masqués par les pics de la polydopamine. En effet, la polydopamine présente une forte proportion des groupements amines (Figure 20c et 20d).

iii. Rugosité

Afin d'analyser la topographie de la surface, la rugosité des revêtements a été étudiée à l'aide d'un profilomètre de surface Alpha-step IQ. Le tableau 10 illustre les résultats obtenus sur les paramètres Ra et Rq de l'acier nu et des surfaces modifiées.

Tableau 10 : Ra et Rq selon chaque type de coupon

	Ra (nm)	Rq (nm)
Acier inoxydable	2,82 ± 0,10	3,94 ± 0,47
SS-Dopa	1,93 ± 0,31	2,51 ± 0,41
SS-Dopa-Glu	2,84 ± 0,23	3,86 ± 0,45
SS-Dopa-Glu-PEI 1	3,77 ± 0,41	4,95 ± 0,55
SS-Dopa-Glu-PEI 2	4,34 ± 0,43	6,33 ± 0,19

Les résultats relatifs à l'étude de la rugosité montrent que l'acier nu et les surfaces modifiées présentent une rugosité relativement similaire. En effet, les valeurs moyennes de Ra et Rq sont respectivement de l'ordre de 3 et 4 nm quel que soit le type de surface.

iv. Microscopie électronique à balayage

Pour caractériser la nature de la topographie des surfaces modifiées avec les PEIs, la microscopie à balayage électronique a été réalisée et la figure 21 illustre la surface des coupons revêtus.

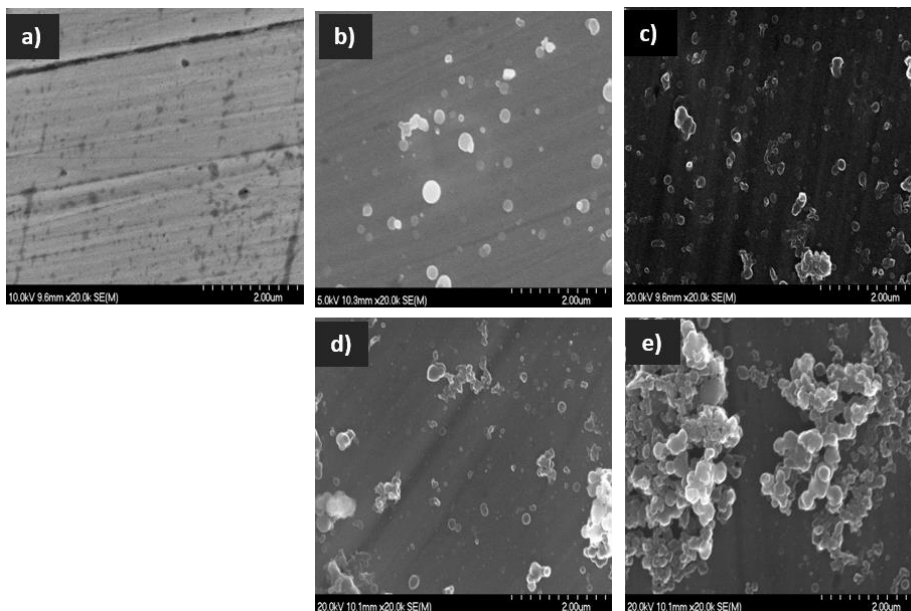


Figure 21: Microscopie électronique à balayage (20.0K) ; a) Acier inoxydable non modifié; b) Coupon SS-Dopa ; c) Coupon SS-Dopa-Glu ; d) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI 1; e) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI2

L'analyse de la topographie de l'acier nu, par microscopie à balayage électronique, montre que la surface de l'acier non modifié est lisse avec des petits trous et crevasses. Dans le cas de SS-

Dopa, la figure 21b montre que la surface est couverte par les polymères de polydopamine. En effet, cette figure montre l'absence de crevasses et des trous. Par ailleurs, la figure 21c montre l'apparition des structures sphériques caractéristique de la polymérisation 3D de la dopamine. Les résultats relatifs aux surfaces modifiées avec la Glutaraldéhyde, SS-Dopa-Glu, sont similaires à ceux des surfaces SS-Dopa. En ce qui concerne les surfaces modifiées avec le PEI 1 et PEI 2, les grosses structures observées correspondent probablement à l'immobilisation des PEI et leur capacité à s'auto polymériser sur la surface.

3. Résultats concernant les revêtements avec la Nisine

La deuxième partie de ces travaux a concerné l'immobilisation de la Nisine sur l'acier. Ainsi, deux stratégies d'immobilisations ont été suivies. La première consiste à immobiliser la Nisine sur la Glutaraldéhyde par l'intermédiaire de groupements NH₂ de la Nisine. Ces surfaces sont appelées SS-Dopa-Glu-Nis dans ce rapport. La deuxième stratégie consiste à greffer la Nisine directement sur la polydopamine par l'intermédiaire de son groupement COOH (SS-Dopa-Nis). Ensuite, l'efficacité antiadhésive et antibactérienne a été évaluée. La bactérie, *Listeria monocytogenes*, a été utilisée étant donné que la Nisine est active seulement contre les bactéries Gram Positives. L'objectif de ces essais est de mettre au point des surfaces qui présentent une activité antibactérienne et capable d'inhiber la formation de biofilms sur l'acier.

a) Essai d'adhésion bactérienne

L'efficacité antiadhésive des surfaces modifiées par la Nisine est présentée dans le Tableau 11 et la figure 22. Les bactéries adhérees sur les surfaces modifiées ont été observées et dénombrées par microscopie à épifluorescence après marquage à l'acridine orange.

Tableau 11 : Nombre de bactéries adhérees par champ microscopique

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Nis	SS-Dopa-Glu-Nis
Nombre de bactéries/ Champ microscopique	20,2 ± 6,15	10,05 ± 7,29	6,19 ± 3,80	17,48 ± 6,13	62,73 ± 10,07

Les résultats relatifs à l'adhésion de *L. monocytogenes* montrent que le taux d'adhésion bactérienne sur l'acier nu est de l'ordre de 20 cellules par champ microscopique. Par ailleurs, les surfaces modifiées avec la dopamine et la Glutaraldéhyde ont présenté un taux d'adhésion de

l'ordre de 10 et 6 bactéries par champ microscopique, respectivement. Les résultats relatifs aux surfaces modifiées par la Nisine montrent que la surface immobilisant la Nisine, directement par son groupement COOH (SS-Dopa-Nis), a présenté un taux d'adhésion de l'ordre de 17 bactéries par champ microscopique. Cependant, les surfaces SS-Dopa-Glu-Nis ont présenté un taux d'adhésion élevé de l'ordre de 62 bactéries par champ microscopique.

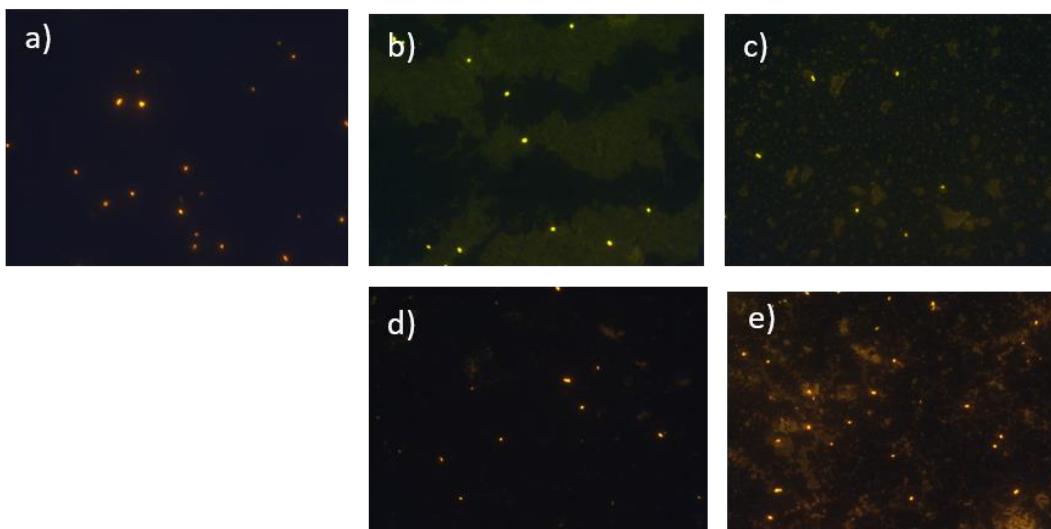


Figure 22: Champ microscopique (grossissement 100x) montrant *Listeria monocytogenes* adhérente sur chaque type de coupon ; a) Acier inoxydable SS non modifié ($20,2 \pm 6,15$) ; b) Coupon SS-Dopa ($10,05 \pm 7,29$) ; c) Coupon SS-Dopa-Glu ($6,19 \pm 3,8$) ; d) Coupon SS-Dopa-Nis ($17,48 \pm 6,13$) ; e) Coupon SS-Dopa-Glu-Nis ($62,73 \pm 10,07$)

b) Essais antibactériens (Challenge tests)

Les essais antibactériens des surfaces modifiées, SS-Dopa-Nis et SS-Dopa-Glu-Nis, ont été réalisés contre *L. monocytogenes* après un temps de contact de l'ordre de 3, 5 et 24 h.

i. Efficacité des surfaces SS-Dopa-Nis après 3, 5 et 24 h de contact

Tableau 12 : Log CFU/cm² de *Listeria monocytogenes* après 3, 5 et 24 h sur SS-Dopa-Nis et SS

	Acier inoxydable SS	SS-Dopa-Nis3	SS-Dopa-Nis5	SS-Dopa-Nis24
Log CFU/cm ²	$5,80 \pm 0,06$	$5,43 \pm 0,09$	$5,70 \pm 0,05$	$7,61 \pm 0,04$

Dans un premier temps, l'efficacité antibactérienne a été évaluée d'une manière qualitative sur un tapis bactérien déposé sur la gélose TSA. Après 24 h d'incubation, les résultats obtenus ont montré l'absence d'une zone d'inhibition. De plus, une croissance bactérienne a été

détectée au-dessous de la surface SS-Dopa-Nis. Pour confirmer ces résultats, l'activité antibactérienne quantitative a été évaluée par le dénombrement des bactéries par la méthode de dénombrement classique (sur milieu gélosé). Le Tableau 12 montre que les surfaces SS-Dopa-Nis, (Nisine immobilisée par l'intermédiaire de son groupement COOH), ne présentent pas une activité antibactérienne. En effet, le nombre des bactéries exposées aux surfaces SS et SS-Dopa-Nis, après un temps de contact de 3 et 5 heures, est de l'ordre de 5,5 log CFU/cm². De plus, les résultats obtenus après 24 heures d'adhésion bactérienne sur SS et SS-Dopa-Nis montrent que la population bactérienne a augmenté et atteint une concentration bactérienne de l'ordre de 7,5 log CFU/cm².

ii. Efficacité des surfaces SS-Dopa-Glu-Nis après 3, 5 et 24 h de contact

Tableau 13 : Log CFU/cm² de *Listeria monocytogenes* après 3 heures et 5 heures sur SS-Dopa-Glu-Nis et SS

	Acier inoxydable SS	SS-Dopa-Glu- Nis3	SS-Dopa-Glu- Nis5	SS-Dopa-Glu- Nis24
Log CFU/cm ²	5,17 ± 0,16	2,49 ± 0,37	2,69 ± 0,61	7,50 ± 0,30

Les analyses qualitatives sur boîte a montré l'absence d'une zone d'inhibition. Cependant, la croissance bactérienne a été inhibée au-dessous de la surface SS-Dopa-Glu-Nis. Dans un deuxième temps, l'activité antibactérienne quantitative a été évaluée par le dénombrement des bactéries par la méthode de dénombrement classique (sur milieu gélosé). Le Tableau 13 montre que les surfaces SS-Dopa-Glu-NIS, (Nisine immobilisée par l'intermédiaire de ses groupements NH₂), présentent une activité antibactérienne importante contre *L. monocytogenes*. En effet, les surfaces SS-DOPA-Glu-Nis, après un temps de contact de 3 et 5 h avec la suspension bactérienne, ont entraîné une réduction logarithmique de l'ordre de 3 log CFU/cm² par comparaison au témoin négatif. Après 24 heures d'incubation, la population bactérienne a atteint une concentration de l'ordre de 7,5 log CFU/cm².

c) Caractérisation des surfaces modifiées avec la Nisine

Après les essais anti-adhésions et antibactériens, les expériences ont concerné la caractérisation des propriétés de surfaces modifiées par l'analyse d'angle de contact, la nature chimique par spectroscopie infrarouge, la rugosité par profilométrie et la topographie par microscopie à balayage électronique. L'objectif de ces analyses est de s'assurer de l'immobilisation de la Nisine sur les surfaces et de comprendre les résultats relatifs à l'adhésion bactérienne et l'activité antibactérienne.

i. Angle de contact

Tableau 14 : Angle de contact des différents types de coupons

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Nis	SS-Dopa-Glu-Nis
Angle de contact (θ°)	60,6 ± 2,8	53,92 ± 0,96	42,08 ± 2,59	80,64 ± 3,40	80,37 ± 1,92

Les mesures d'angle de contact montrent que l'acier nu est légèrement hydrophobe avec un angle de contact de l'ordre de 60,6°. La modification de l'acier avec la polydopamine et la Glutaraldéhyde a légèrement diminuée le caractère hydrophobe des surfaces modifiées. En effet, les surfaces modifiées par la polydopamine et la Glutaraldéhyde ont présenté un angle de contact de l'ordre de 54 et 42°, respectivement. Cependant, l'immobilisation de la Nisine sur l'acier a augmenté hydrophobicité par comparaison à l'acier nu, le SS-Dopa et le SS-Dopa-Glu. Les résultats obtenus (Tableau 14) ont montré que le SS-Dopa-Nis et du SS-Dopa-Glu-Nis présente un angle de contact de l'ordre 80°. Cette augmentation d'angle de contact pourrait montrer que la Nisine a été immobilisée et a induit une augmentation de l'hydrophobicité des surface SS-Dopa-Glu-Nis et SS-Dopa-Nis.

ii. Spectre infrarouge

Afin de confirmer l'immobilisation la Nisine sur les coupons élaborés, les surfaces ont été caractérisées par infrarouge par réflexion totale atténuée (ATR). Les spectres IR/ATR des surfaces sont répertoriés dans la Figure 23.

D'après la littérature, la bande située entre 1600 et 1650 cm^{-1} est attribuée à la présence d'amides primaires, RCONHR, dans la Nisine (liaison peptidique) [30]. La Nisine est aussi caractérisée une par bande d'adsorption à 1419 cm^{-1} relatif à la présence du groupement COO-.

Cependant, ces bandes caractéristiques la Nisine sont présentes sur le spectre de la polydopamine, rendant ainsi la détection de la Nisine sur la surface difficile.

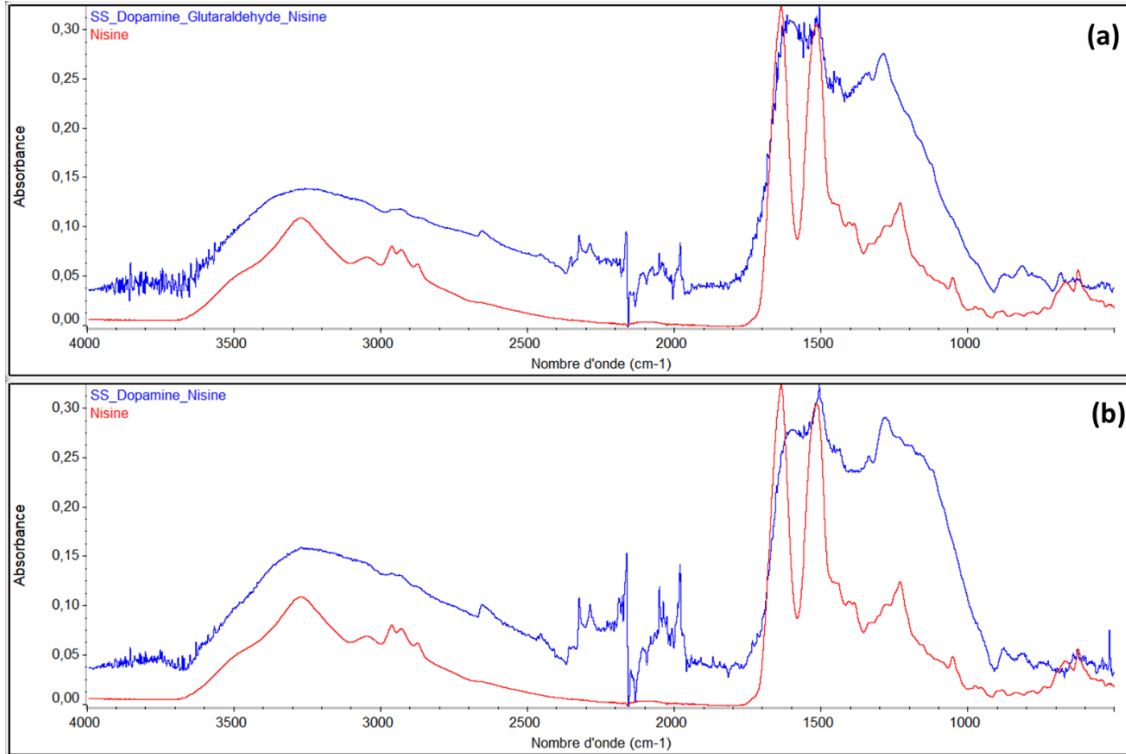


Figure 23: Spectres infrarouge ATR ; FTIR ; (a) Courbes Nisine et SS-Dopa-Glu-Nis ; (b) Courbe Nisine et SS-Dopa-Nis

iii. Rugosité

Afin d'analyser la topographie des surfaces modifiées, la rugosité des revêtements a été étudiée à l'aide du profilomètre de surface Alpha-step IQ. Le tableau 15 ci-dessous illustre les résultats des Ra et Rq obtenus.

Tableau 15 : Ra et Rq selon chaque type de coupon

	Ra (nm)	Rq (nm)
Acier inoxydable	2,82 ± 0,10	3,94 ± 0,47
SS-Dopa	1,93 ± 0,31	2,51 ± 0,41
SS-Dopa-Glu	2,84 ± 0,23	3,86 ± 0,45
SS-Dopa-Glu-Nis	3,08 ± 0,21	4,01 ± 0,20
SS-Dopa-Nis	4,80 ± 0,78	6,06 ± 0,3

Les résultats relatifs à l'étude de la rugosité montrent que l'acier nu et les surfaces modifiées, SS-Dopa, SS-Dopa-Glu, SS-Dopa-Glu-Nis et SS-Dopa-Nis, présentent une rugosité lisse et relativement similaire. En effet, les valeurs moyennes de Ra et Rq sont respectivement de l'ordre de 3 et 4 nm quel que soit le type de surface et de revêtement.

iv. Microscopie électronique à balayage

Pour caractériser la nature de la topographie des surfaces, la microscopie à balayage électronique a été utilisée (Figure 24)

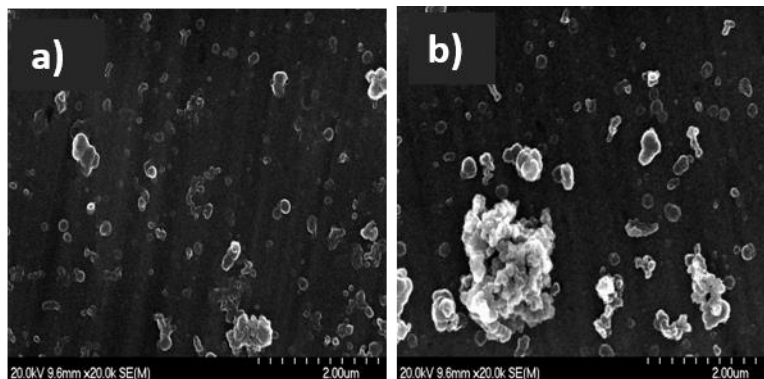


Figure 24: Microscopie électronique à balayage (20.0kV) ; a) Coupon SS-Dopa-Nis ; b) Coupon SS-Dopa-Glu-Nis

L'analyse de la topographie montre l'absence des crevasses et des trous observés sur l'acier nu. Par ailleurs, les figures 24a et 24b montrent l'apparition des structures sphériques caractéristiques de la polymérisation en 3D de la dopamine et l'immobilisation de la Nisine. En effet, ces structures sont légèrement plus grosses que celles observés sur les surfaces modifiées par la polydopamine et la Glutaraldéhyde.

4. Optimisation du dépôt de la Nisine

Les résultats relatifs à la fonctionnalisation de l'acier avec la Nisine ont montré que l'activité antibactérienne contre *L. monocytogenes* est intéressante. Ces surfaces ont présenté une réduction logarithmique de l'ordre de 3 Log CFU/cm² de la population bactérienne initiale. Cette réduction est largement supérieure à celle exigée par la norme ISO 22196 :2011 (une réduction logarithmique de 2 log CFU/cm²). Cependant, la Glutaraldéhyde, qui est utilisée comme un bras de linkage, est un composé chimique toxique et cette toxicité limite son application dans le secteur alimentaire. Ainsi, cette partie de travail s'est focalisée sur la substitution de la

Glutaraldéhyde par l'acide succinique (AS). En effet, l'acide succinique est un acide dicarboxylique, acidifiant/correcteur d'acidité et sans risques connus en tant qu'additif alimentaire. Le principe de substitution est basé sur la formation des deux liaisons amides avec les groupements carboxyles de l'acide succinique. La première consiste à lier un groupement carboxyle de l'acide succinique avec un groupement NH₂ de la polydopamine (immobilisée sur la surface). La deuxième consiste à greffer la Nisine en liant un de ces groupements NH₂ au deuxième groupement carboxyle de l'acide succinique.

a) Essai d'adhésion bactérienne

Dans un premier temps et après l'immobilisation de la Nisine sur l'acier par l'intermédiaire de l'acide succinique, des essais d'adhésion de *Listeria monocytogenes* ont été réalisés afin d'évaluer le caractère antiadhésif des nouveaux revêtements. Les résultats de cette adhésion bactérienne sont présentés dans le tableau 18 et la figure 25.

Tableau 16 : Nombre de bactéries adhérents par champ microscopique sur les différents types de coupons y compris SS-Dopa-AS-Nis

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Nis	SS-Dopa-Glu-Nis	SS-Dopa-AS-Nis
Nombre de bactéries/champ microscopique	20,22 ± 6,15	10,05 ± 7,29	6,19 ± 3,81	17,48 ± 6,13	62,73 ± 10,07	24,91 ± 5,23

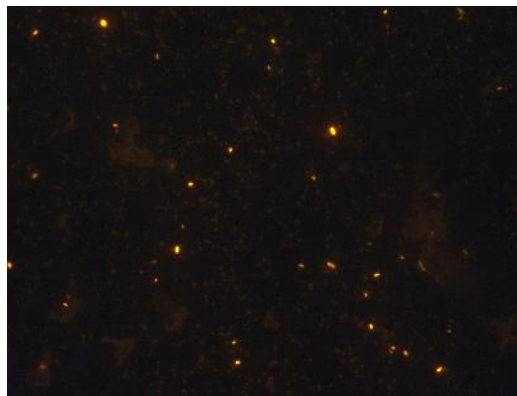


Figure 25: Champ microscopique montrant l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur SS-Dopa-AS-Nis

Les résultats obtenus ont montré que la surface SS-Dopa-AS-Nis n'a pas présenté une activité antiadhésive. En effet, les résultats d'adhésion ont montré que ce revêtement a présenté un taux d'adhésion de l'ordre de 25 bactéries par champ microscopique. (Tableau 16)

b) Essais antibactériens (Challenge test)

Dans un deuxième temps, des essais antibactériens contre *L. monocytogenes* ont été réalisés sur les revêtements SS-Dopa-AS-Nis en utilisant les surfaces SS et SS-Dopa-AS comme témoins négatifs. Les surfaces ont été confrontées à une suspension bactérienne pendant 3 et 5 heures. Ensuite, la mortalité bactérienne a été évaluée par dénombrement des colonies formées sur milieu gélosé TSA après 24 heures d'incubation à 37°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17: Réduction logarithmique bactérienne suivant chaque type de revêtement

	Log initial	Log de réduction			
Type de coupon	Acier inoxydable SS	SS-Dopa-AS (3 h)	SS-Dopa-AS (5 h)	SS-Dopa-AS-Nis (3 h)	SS-Dopa-AS-Nis (5 h)
Log CFU/cm ²	5,78 ± 0,06	0,27 ± 0,08	0,36 ± 0,19	1,48 ± 0,27	1,25 ± 0,16

Les résultats obtenus montrent que les surfaces SS et SS-Dopa-AS n'ont pas présenté une activité antibactérienne (Tableau 17). Cependant, le revêtement SS-Dopa-AS-Nis a montré une activité antibactérienne satisfaisante. En effet, le tableau 17 montre que la surface SS-Dopa-AS-Nis a assuré une réduction logarithmique, de la population bactérienne initiale, de l'ordre 1.5 log Log CFU/cm².

c) Caractérisation du dépôt

i. Angle de contact

Tableau 18: Angle de contact sur les différents types de coupons y compris SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis

	SS	SS-Dopa	SS-Dopa-Glu	SS-Dopa-Nis	SS-Dopa-Glu-Nis	SS-Dopa-AS-Nis	SS-Dopa-AS
Angle de contact (θ°)	60,60 ± 2,80	53,92 ± 0,96	42,08 ± 2,59	80,64 ± 3,40	80,37 ± 1,92	72,87 ± 2,45	42,36 ± 1,64

Après les essais anti-adhésions et antibactériens, les expériences ont concerné la caractérisation des propriétés hydrophiles/hydrophobes des surfaces SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis. Les résultats sont présentés dans le tableau 18. Les résultats obtenus montrent que le revêtement SS-Dopa-AS-Nis est plus hydrophobe que le revêtement SS-Dopa-AS. En effet, le tableau 18 montre que les surfaces SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis ont présenté un angle de contact avec l'eau de l'ordre de 42 et 73°, respectivement.

ii. Spectre infrarouge

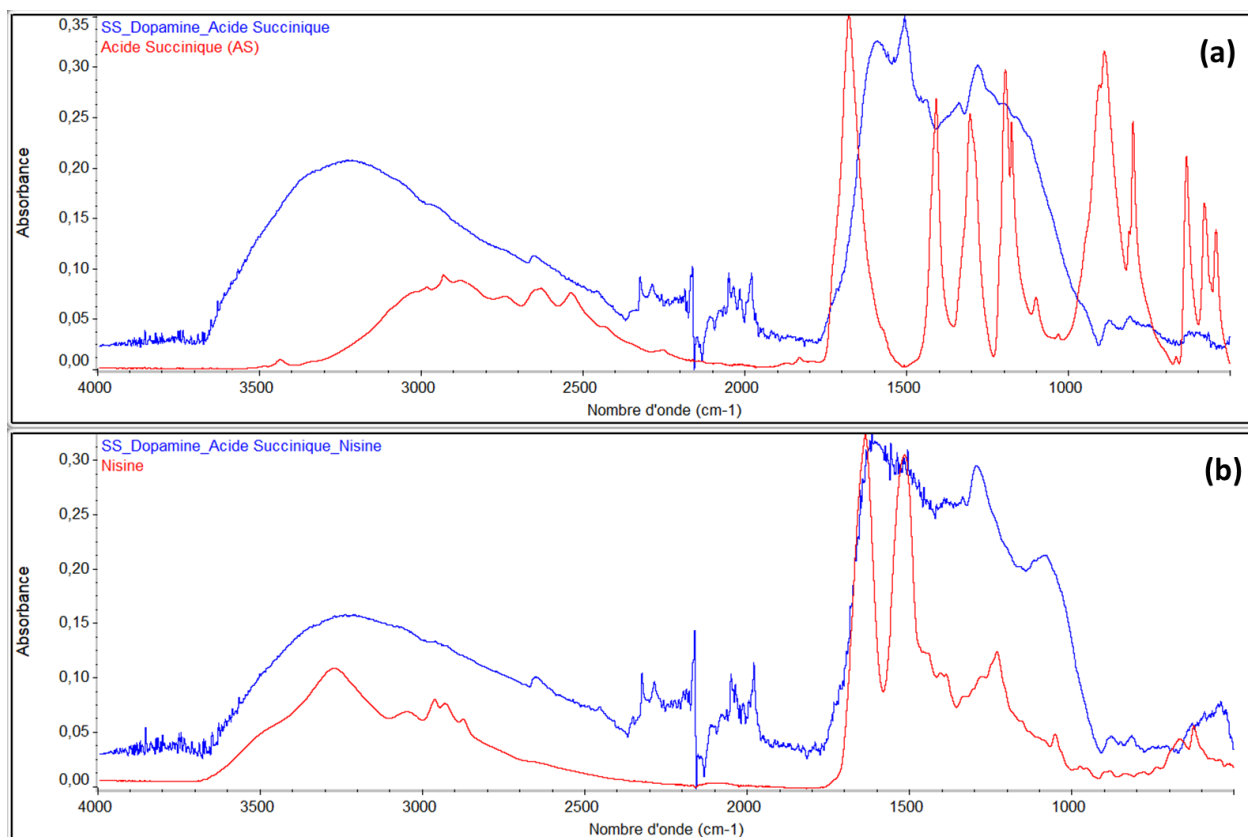


Figure 26: Spectre infrarouge (a) Acide succinique et SS-Dopa-AS; (b) Nisine et SS-Dopa-AS-Nis

Après l'évaluation des propriétés hydrophiles/hydrophobes, la nature chimique des dépôts a été évaluée par spectroscopie infrarouge. L'objectif de ces essais est de confirmer la présence de l'acide succinique et de la Nisine sur les surfaces modifiées.

D'après la littérature et comme le montre le spectre de la figure 26a, l'acide succinique présente une bande d'adsorption à 1419 cm^{-1} liée à la présence du groupement carbonyle (C=O)

[31]. Les bandes observées à $800,89\text{ cm}^{-1}$ et $624,65\text{ cm}^{-1}$ sont attribuées au groupement COO. Cependant, ces bandes caractéristiques de l'acide succinique sont également présentes sur le spectre de la polydopamine, rendant ainsi la détection des acides succiniques difficile (Figure 26). Le spectre de la figure 26b montre que la bande située entre 1600 et 1650 cm^{-1} est attribuée à la présence d'amides primaires, RCONHR, dans la Nisine (liaison peptidique). La Nisine est caractérisée aussi par la bande d'adsorption à 1419 cm^{-1} relative à la présence du groupement COO. Cependant, ces bandes caractéristiques la Nisine sont présentes sur le spectre de la polydopamine. Ainsi, la détection de la présence de la Nisine sur les surfaces est difficile par cette méthode.

iii. Rugosité

Tableau 19 : Ra et Rq selon chaque type de coupon y compris SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis

	Ra (nm)	Rq (nm)
Acier inoxydable	$2,82 \pm 0,10$	$3,94 \pm 0,47$
SS-Dopa	$1,93 \pm 0,31$	$2,51 \pm 0,41$
SS-Dopa-Glu	$2,84 \pm 0,23$	$3,86 \pm 0,45$
SS-Dopa-Glu-Nis	$3,08 \pm 0,21$	$4,01 \pm 0,20$
SS-Dopa-Nis	$4,80 \pm 0,78$	$6,06 \pm 0,3$
SS-Dopa-AS	$3,47 \pm 0,56$	$4,41 \pm 0,52$
SS-Dopa-AS-Nis	$4,00 \pm 0,43$	$5,39 \pm 0,36$

Afin d'analyser la topographie de la surface, la rugosité des revêtements a été étudiée à l'aide du profilomètre de surface Alpha-step IQ. Le tableau 19 ci-dessus illustre les paramètres Ra et Rq de la rugosité. Les résultats montrent que l'acier nu et les surfaces modifiées, SS-Dopa, SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis, présentent une rugosité lisse et relativement similaire. En effet, les valeurs moyennes des Ra et Rq sont respectivement de l'ordre de 3 et 4,5 nm.

iv. Microscopie électronique à balayage

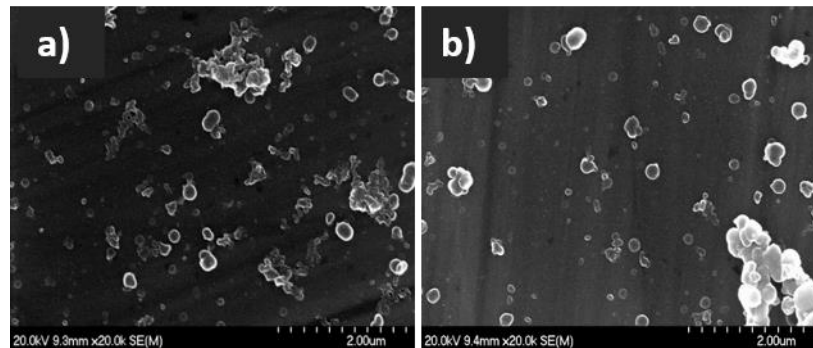


Figure 27: Microscopie électronique à balayage (20.0K) ; a) Coupon SS-Dopa-AS ; b) Coupon SS-Dopa-AS-Nis

Pour caractériser la nature de la topographie des surfaces, la microscopie à balayage électronique a été utilisée (Figure 27). L'analyse par microscopie à balayage électronique montre que le SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis présentent une topographie similaire à celle de SS-Dopa-Glu et SS-Dopa-Glu-Nisine. En effet, la figure 27b montre l'apparition des structures sphériques qui sont caractéristiques de la polymérisation en 3D de la dopamine et l'immobilisation de la Nisine. De plus, ces structures sont légèrement plus grosses que les structures observées sur les surfaces SS-Dopa et SS-Dopa-AS.

IV. Eradication des biofilms

Dans le but d'évaluer l'effet de la température sur la formation des biofilms de *S. enterica*. La biomasse des bactéries structurées en biofilm a été déterminée sur l'acier après 24 heures d'incubation à 20 et 37°C. Dans un deuxième temps, les essais ont concerné l'évaluation de l'activité des produits présentés dans le tableau 2 vis-à-vis des biofilms installés à 20 et 37°C. L'objectif de ces tests est d'étudier l'influence de la température d'installation sur la résistance des biofilms de *S. enterica* aux détergents/désinfectants. Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance de ces biofilms, une étude quantitative sur la composition de la matrice extracellulaire a été réalisée.

1. Effet de la température sur la structuration des bactéries en biofilm et la résistance au traitement désinfectants/détergents

Les résultats des observations microscopiques montrent la colonisation de l'acier par *S. enterica* quelle que soit la température d'installation. En effet, les figures 28 et 29 montrent respectivement, les biofilms de *S. enterica*, installés à 20 et 37°C après 24 heures sur l'acier. Ces résultats montrent que les bactéries colonisent la surface en formant des macro-colonies qui rentrent en confluence pour former un tapis bactérien.

Ensuite, les essais ont concerné l'évaluation de l'activité des produits, présentés dans le tableau 22, vis-à-vis des biofilms installés à 20 et 37°C. Les essais antibactériens contre les biofilms de *S. enterica* ont été réalisés en utilisant deux agents chimiques antimicrobiens. Le premier est le chlorure de benzalkonium, un ammonium quaternaire (AQ) pur. Le deuxième est un désinfectant de surface concentré. Ce produit qu'on a nommé P1 dans ce rapport, est un produit commercialisé qui contient un agent non ionique et cationique contenant du N-(3-aminopropyl)-N-dodécylpropane-1,3-diamine et du chlorure de didécyldiméthylammonium. L'eau physiologique stérile a été utilisée comme un témoin négatif.

Les résultats obtenus montrent que la biomasse cultivable après traitement des biofilms avec l'eau physiologique est de l'ordre de 8 log CFU/cm², quelle que soit la température d'installation du biofilm (Tableau 20). Par ailleurs, les résultats antibiofilms montrent que l'efficacité de l'ammonium quaternaire (BAC) est dose dépendante. En effet, l'augmentation de la concentration du BAC augmente l'efficacité antibiofilm. Les résultats obtenus montrent que la biomasse cultivable après traitement des biofilms, installés à 37°C, avec 100, 200 et 400 ppm du BAC est de l'ordre de 5,5, 1,8 et 0 log CFU/cm², respectivement. De plus, ces résultats montrent que l'augmentation de la température d'installation induit une augmentation de la résistance des biofilms de *S. enterica*. En effet, la biomasse cultivable, après traitement des biofilms installés sur l'acier par 100 ppm du BAC, passe de 2,5 à 5,5 log CFU/cm² quand la température d'installation passe de 20 à 37°C. Par ailleurs, les résultats du traitement des biofilms, installés à 20°C, avec 200 et 400 ppm du BAC montrent que ces concentrations présentent une activité antibiofilm totale. En effet, la biomasse cultivable est de 0 log CFU/cm² (Tableau 20).

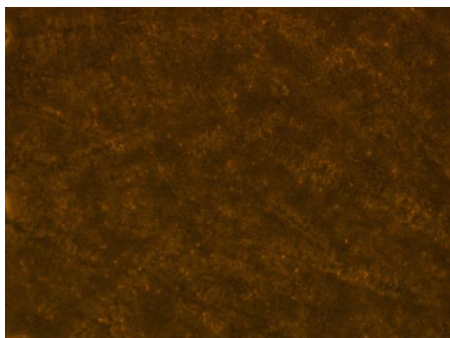


Figure 28: Biofilm *S. enterica* à 20°C

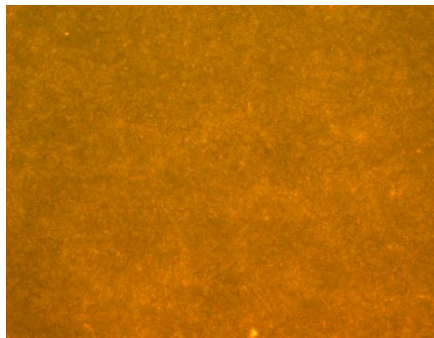


Figure 29: Biofilm *S. enterica* à 37°C

Tableau 20: Efficacité des produits BAC et P1 contre les biofilm de *Salmonella enterica* installés à 20 et 37°C suivant le temps de contact et la concentration

		Log CFU/cm ²							
		20°C				37°C			
Concentration (ppm) de l'ammonium quaternaire (BAC)	SS - 0	100	200	400	SS - 0	100	200	400	
	8,21 ± 0,05	2,63 ± 0,09	1,75 ± 0,14	0 ± 0	7,97 ± 0,07	5,51 ± 0,11	1,75 ± 0,14	0 ± 0	
Temps de contact (min) avec P1 (0,25%)	SS (0%)	5	15	30	SS (0%)	5	15	30	
	7,06 ± 0,05	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	8,00 ± 0,05	5,95 ± 0,06	0 ± 0	0 ± 0	

Les résultats relatifs au traitements des biofilms par le produit P1 montrent que l'efficacité anti-biofilm est dépendante du temps d'application du produit. Les résultats du tableau 20 montrent que la biomasse cultivable après traitement des biofilms, installés à 37°C, pendant 5, 15 et 30 min est respectivement de l'ordre de 6, 0 et 0 log CFU/cm². Par ailleurs, ce produit a présenté une activité antibiofilm totale contre les biofilm installés à 20°C quel que soit le temps d'application (Tableau 20).

2. Effet de la température sur les constituants principaux de la matrice extracellulaire

La quantification des protéines totales dans la matrice des biofilms de *S. enterica* montre que la concentration de protéines augmente avec l'augmentation de la température de croissance. En effet, lorsque la température d'installation du biofilm passe de 20 à 37°C, la concentration protéique dans la matrice extracellulaire passe de 4 à 11 µg/cm² (Tableau 21). Par ailleurs, les résultats du tableau 21 montrent que la température de culture ne présente pas un effet significatif sur la quantité des sucres totaux dans la matrice extracellulaire. En effet, la

concentration des sucres totaux est de l'ordre de 9 et 11 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ quand la température d'installation de biofilms est de 20 et de 37°C, respectivement (Tableau 21).

Tableau 21 : Quantification de protéines totales et des sucres totaux dans la matrice des biofilms de *S. enterica* installés, à 20 et 37°C sur l'acier inoxydable.

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
Température d'installation	20°C	37°C
Protéines totales	4,38 ± 0,97	11,37 ± 0,76
Sucres totaux	9,16 ± 0,12	11,84 ± 0,24

DISCUSSION DES RESULTATS

La contamination des surfaces et des installations par des biofilms dans le secteur alimentaire constitue un véritable problème de santé publique. En effet, ces biofilms constituent un réservoir de bactéries viables à l'origine d'une variété des épisodes de toxi-infections alimentaires et des pertes économiques considérables [1]. Dans le but d'empêcher l'adhésion bactérienne et prévenir la formation de biofilm sur l'acier inoxydable, des dépôts à base de TMDS ont été élaborés par plasma froid micro-onde. Le TMDS a été utilisé pour ces propriétés hydrophobes et son prix bas. De nombreuses études montrent que l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface de contact avec les bactéries réduit l'adhésion bactérienne en les repoussant [32-34]. Ces résultats sont en désaccord avec les résultats relatifs aux coupons revêtus à base de TMDS qui ont montré que le taux d'adhésion bactérienne est augmenté sur les surfaces qui présentent des caractères super-hydrophobes (Conditions où le débit de gaz plasmagène est augmenté et le débit d'oxygène diminué). Par ailleurs, l'étude de la rugosité et de la topographie a montré que ces surfaces présentent des surfaces rugueuses avec des aspérités et cavités. Cette augmentation de la rugosité pourrait expliquer le taux d'adhésion important sur ces surfaces. En effet, la présence des crevasses, des fissures et des irrégularités donne asile aux microorganismes et favorise l'adhésion des bactéries et la formation des biofilms [1]. Les résultats relatifs aux dépôts TMDS avec un débit gaz plasmagène de l'ordre de 3 SLM montrent que ces conditions ont générés des surfaces lisses. De plus, ces dépôts ont couvert la totalité de surface et éliminé les trous et les crevasses observés sur l'acier non modifié. Ces résultats sont en complet accord avec différentes études qui ont montré que la diminution de la rugosité réduit le taux d'adhésion des bactéries sur les surfaces [1, 33]. Ainsi, ces résultats permettent de conclure que la topographie et la rugosité de la surface sont des paramètres très importants et qui influencent significativement le taux d'adhésion bactérienne. Les aspérités et les irrégularités présentes sur ces surfaces aident les bactéries à se coincer, à adhérer à la surface et à former des biofilms. Ces résultats mettent l'accent sur le fait que les surfaces utilisées dans le secteur alimentaire doivent être lisses et les surfaces usées doivent être remplacées par des nouvelles surfaces afin d'éviter les problèmes liés à la formation de biofilms.

Les résultats relatifs aux revêtements plasma à base de TMDS montrent que, sous certaines conditions, l'adhésion bactérienne a été inhibée significativement. Cependant, du fait que des interactions surface / milieu environnement, ce serait une erreur de croire que l'on pourrait développer une surface avec des propriétés antiadhésives absolues. Par conséquent, il est important de développer des surfaces qui présentent à la fois un pouvoir antiadhésif et une activité antibactérienne. Dans ce contexte, la deuxième partie de ce travail s'est focalisée sur l'immobilisation des molécules antibactériennes sur l'acier inoxydable telles que les polyéthylénimines et la Nisine. Différentes études ont montré que les PEIs non-immobilisés présentent une activité antibactérienne [35, 36]. Cependant, nos résultats montrent que l'immobilisation des PEIs sur l'acier a entraîné une perte de cette activité antimicrobienne. Par ailleurs, ces surfaces revêtues avec les PEIs ont montré une diminution non significative de l'adhésion bactérienne par comparaison avec les revêtements polydopamine. Cette diminution de l'adhésion bactérienne semble être liée aux caractères lisses de surfaces revêtues et ce caractère lisse est probablement dû aux revêtements de polydopamine. En effet, la polydopamine couvre la surface et entraîne la disparition des trous et des crevasses (présents sur l'acier non-modifié). Dans l'objectif de s'assurer que les PEI sont bien immobilisés sur la surface, la mesure de l'angle de contact a été réalisée et a confirmé l'immobilisation des PEIs sur les surfaces. En effet, les surfaces revêtues par les PEIs ont montré des caractères super-hydrophiles par comparaison aux surfaces modifiées par la polydopamine et la Glutaraldéhyde. De plus, la microscopie électronique à balayage montre que les grosses structures observées correspondent probablement à cette immobilisation et à la capacité de PEI à s'auto polymériser sur la surface. Par ailleurs, les analyses par spectroscopie infrarouge n'a pas permis la détection de la présence de PEI sur les coupons du fait que les pics caractéristiques des PEIs sont masqués par ceux de la polydopamine. Ainsi, ces résultats montrent que la spectroscopie infrarouge ne semble pas être adaptée pour ce type de revêtements. Ainsi, des essais seront réalisés par la technique TOF-SIMS (Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol) pour confirmer la présence des PEIs sur les surfaces modifiées. Cette technique est une méthode d'analyse élémentaire et moléculaire à très haute sensibilité de traces en extrême surface.

Dans le but de lutter contre la formation de biofilms de *L. monocytogenes*, la Nisine, un additif alimentaire actif contre les bactéries Gram positives, a été greffée sur l'acier selon deux approches en utilisant ses groupements $-NH_2$ et $-COOH$. En effet, la Nisine a été immobilisée par ses groupements NH_2 en utilisant la Glutaraldéhyde ou l'acide succinique comme bras espaceur. Dans la deuxième approche, la Nisine a été immobilisée directement sur la polydopamine par son groupement $-COOH$. Des études sur le mécanisme d'action de la Nisine évoquent la nécessité de la présence des deux groupements $-NH_2$ et $-COOH$ pour que la Nisine soit active [37, 38]. Cependant, nos résultats montrent que celle-ci est active que lorsqu'elle est immobilisée par son groupement NH_2 (Coupon SS-Dopa-Glu-Nis). Ceci démontre que c'est la partie hydrophile de Nisine ($-COOH$) qui exerce l'activité antimicrobienne. Pour caractériser ces dépôts, l'étude qualitative du dépôt par tapis bactérien a confirmé l'immobilisation de la Nisine. L'absence de zone d'inhibition pour le dépôt SS-Dopa-Glu-Nis confirme que la Nisine est fixée et non relarguée. La croissance bactérienne détectée sous le coupon SS-Dopa-Nis caractérisé par la fixation de la Nisine par son groupement $-COOH$ confirme également l'inactivité de la Nisine immobilisée de cette manière à la polydopamine. Par ailleurs, l'augmentation du caractère hydrophobe des surfaces SS-Dopa-Glu-Nis et SS-Dopa-Nis confirment également la présence de la Nisine sur les surfaces modifiées. Dans le but d'optimiser le type du dépôt de Nisine, la Glutaraldéhyde qui est un composé chimique toxique a été substituée par l'acide succinique. En effet, l'acide succinique est un acide dicarboxylique, acidifiant/correcteur d'acidité et sans risques connus en tant qu'additif alimentaire. Les essais antibactériens ont montré une activité antibactérienne importante du dépôt SS-Dopa-AS-Nis. De plus, la fixation de la Nisine a été confirmée par l'augmentation d'hydrophobicité par la mesure de l'angle de contact et par la microscopie à balayage électronique. Cependant, les résultats montrent que cette efficacité antimicrobienne est légèrement inférieure à celle des surfaces immobilisant la Nisine par l'intermédiaire de la Glutaraldéhyde. Ainsi, des essais supplémentaires sont nécessaires pour optimiser cette immobilisation.

Dans le l'objectif de combattre contre la persistance des biofilms dans les IAAs, il est important de mettre en place des stratégies éradicatrices adaptées permettant de garantir la qualité sanitaire des produits transformés et l'hygiène des surfaces utilisées lors de la

transformation agroalimentaire. Cependant, les bactéries structurées en biofilms sont plus résistantes aux agents antimicrobiens que celles à l'état planctoniques. De plus, le secteur agroalimentaire constitue un environnement propice à la formation des biofilms. Ces bactéries peuvent agir donc comme une source de contamination continue des dispositifs et des installations. Ainsi, les opérations de nettoyabilité et/ou de désinfection en milieux alimentaires doivent tenir compte de l'historique et des conditions physico-chimiques d'installation du biofilm. Selon Buckingham-Meyer et al., les conditions et l'environnement de croissance du biofilm influencent la formation du biofilm [39]. De plus, les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la température d'installation des biofilms, de 20°C à 37°C, augmente la résistance des biofilms de *Salmonella enterica*. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Nguyen and Yuk et Abdallah et al., qui montrent que la température de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* a influencé la résistance de ce biofilm aux agents désinfectants [16, 18, 40]. Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance de ces biofilms, une étude quantitative sur la composition de la matrice extracellulaire en sucres totaux et protéines totales a été réalisée. Les résultats montrent que l'augmentation de la température de formation du biofilm de *S. enterica* provoque une augmentation de la sécrétion de la matrice extracellulaire. Ceci montre que la résistance de biofilms est probablement liée à l'augmentation quantitative de la matrice extracellulaire. Ces résultats mettent l'accent sur le fait que les produits détergents/désinfectants doivent être testés sur des biofilms installés dans différentes conditions environnementales pour garantir l'efficacité dans les conditions réelles d'application. De plus, ces résultats montrent que le choix des molécules antibactériennes pour traiter les biofilms doit tenir en compte la qualité de la matrice extracellulaire de biofilms. En effet, les molécules choisies dans la formulation des produits doivent être capable de franchir la matrice extracellulaire en échappant aux interactions non covalentes (interactions hydrophobes et électrostatiques).

Pour conclure, les résultats montrent que l'immobilisation des peptides antimicrobiens représente une voie attractive pour le développement de revêtements microbicides pour plusieurs raisons. Ces agents ont un large spectre d'activité antimicrobienne même à faible concentration et sont rarement sensibles à l'émergence de la résistance bactérienne ce qui n'est pas le cas des antibiotiques traditionnels. Cependant, ces revêtements ont montré une efficacité

antibactérienne et ne permettent pas l'inhibition de l'adhésion bactérienne. Ainsi, une approche de modification de la surface par des multi-stratégies est sans doute la bonne voie à suivre pour la conception innovante de biomatériaux présentant simultanément une activité antiadhésive et antimicrobienne. En effet, les futurs travaux de recherche vont tenir en compte l'immobilisation des molécules qui présentent des activités antiadhésives et antibactériennes. Par ailleurs, nos résultats ont montré que la résistance du biofilm dépendait de plusieurs facteurs environnementaux couramment rencontrés dans le secteur alimentaire. Il est donc intéressant de connaître l'histoire écologique des bactéries et les conditions environnementales de la formation des biofilms, telle que la température, qui sont susceptibles de modifier la résistance de biofilms. Ainsi, cette étude suggère que l'évaluation de l'efficacité des détergents/désinfectants doit être testée contre les biofilms formés dans différentes conditions environnementales, afin de réduire le risque microbiologique lié à la persistance de biofilms. De plus, les molécules choisies dans la formulation des produits microbicides doivent être capable de franchir la matrice extracellulaire en échappant aux interactions non covalentes (interactions hydrophobes et électrostatiques).

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Différentes étapes de formation du biofilm.....	10
Figure 2: Inhibition de la formation de biofilms par une fonctionnalisation passive ou active.....	12
Figure 3: Formule chimique de la Nisine.....	16
Figure 4:Grandes démarches suivies dans l'élaboration des expériences.....	18
Figure 5:Mécanismes de polymérisation de la polydopamine	22
Figure 6: Fonctionnalisation de l'acier inoxydable.....	23
Figure 7:Goniomètre pour mesure de l'angle de contact.....	28
Figure 8 :L'instrument ATR (NICOLET iS50 ABX FT-IR - Thermo-SCIENTIFIC	29
Figure 9 : Tour de pression pivotante de l'instrument ATR - NICOLET iS50 ABX FT-IR - Thermo-SCIENTIFIC	29
Figure 10:Champ microscopique montrant la surface de l'échantillon et l'aiguille de balayage de l'alpha-step profilomètre	29
Figure 11: Microscopie électronique à balayage	30
Figure 12: Appareil à métallisation	30
Figure 13 : Formule chimique du 1, 1, 3, 3-Tetramethyldisiloxane.....	34
Figure 14: Irisations sur coupon revêtu à base de TMDS.....	35
Figure 15:Champs microscopique (grossissement 100x) montrant l'adhésion bactérienne selon différentes conditions ; a) Acier inoxydable non modifié SS : TMDS=0 sccm, N ₂ = 0 SLM, O ₂ = 0 SLM ; b) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 4.3 SLM, O ₂ = 0.01 SLM ; c) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 3 SLM, O ₂ = 0.01 SLM ; d) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 4.3 SLM, O ₂ = 0.025 SLM ; e) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 3 SLM, O ₂ = 0.025 SLM ; f) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 4.3 SLM, O ₂ = 0.05 SLM ; g) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 3 SLM, O ₂ = 0.05 SLM	36
Figure 16 : Spectre infrarouge de bandes d'absorption du dépôt à base de TMDS (N ₂ _O ₂); (a) Courbes du débit N ₂ = 4,3 SLM et O ₂ = 0,0 ; 0,01 ; 0,025 ; 0,05 SLM (b) Courbes du débit N ₂ = 3 SLM et O ₂ = 0,0 ; 0,01 ; 0,025 ; 0,05 SLM (c) Courbe représentant la condition (3_0,05)	40
Figure 17: Structure des dépôts sous forme de chaîne linéaire de type SiO _x (CH ₃)	40
Figure 18: Microscopie électronique à balayage TMDS ; a) Acier inoxydable non modifié SS : TMDS=0 sccm, N ₂ = 0 SLM, O ₂ = 0 SLM ; b) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 4.3 SLM, O ₂ = 0.01 SLM ; c) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 3 SLM, O ₂ = 0.01 SLM ; d) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 4.3 SLM, O ₂ = 0.025 SLM ; e) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 3 SLM, O ₂ = 0.025 SLM ; f) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 4.3 SLM, O ₂ = 0.05 SLM ; g) Dépôt plasma TMDS=3 sccm, N ₂ = 3 SLM, O ₂ = 0.05 SLM	42
Figure 19:Champs microscopiques (grossissement 100x) montrant Salmonella enterica adhérentes ; a) Acier inoxydable non modifié (20,46 ± 4,71) ; b) Coupon SS-Dopa (10,9 ± 4,94) ; c) Coupon SS-Dopa-Glu (8,16± 3,84) ; d) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI1 (6,46 ± 4,45) ; e) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI2 (7,22 ± 5,4)	44
Figure 20: Spectre infrarouge ATR, FTIR ; (a) Courbes Dopamine et SS-Dopa; (b) Courbes Glutaraldéhyde et SS-Dopa-Glu (c) Courbe PEI1 et SS-Dopa-Glu-PEI1 ; (d) Courbes PEI2 et SS-Dopa-Glu-PEI2	46
Figure 21:Microscopie électronique à balayage (20.0K) ; a) Acier inoxydable non modifié; b) Coupon SS-Dopa ; c) Coupon SS-Dopa-Glu ; d) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI 1; e) Coupon SS-Dopa-Glu-PEI2	48
Figure 22:Champ microscopique (grossissement 100x) montrant Listeria monocytogenes adhérentes sur chaque type de coupon ; a) Acier inoxydable SS non modifié (20,2 ± 6,15) ; b) Coupon SS-Dopa (10,05 ± 7,29) ; c) Coupon SS-Dopa-Glu (6,19± 3,8) ; d) Coupon SS-Dopa-Nis (17,48 ± 6,13) ; e) Coupon SS-Dopa-Glu-Nis (62,73 ± 10,07).....	50

Figure 23: Spectres infrarouge ATR ; FTIR ; (a) Courbes Nisine et SS-Dopa-Glu-Nis ; (b) Courbe Nisine et SS-Dopa-Nis	Error! Bookmark not defined.
Figure 24: Microscopie électronique à balayage (20.0K) ; a) Coupon SS-Dopa-Nis ; b) Coupon SS-Dopa-Glu-Nis	54
Figure 25: Champ microscopique montrant l'adhésion de <i>Listeria monocytogenes</i> sur SS-Dopa-AS-Nis..	55
Figure 26: Spectre infrarouge (a) Acide succinique et SS-Dopa-AS; (b) Nisine et SS-Dopa-AS-Nis	57
Figure 27 : Microscopie électronique à balayage (20.0K) ; a) Coupon SS-Dopa-AS ; b) Coupon SS-Dopa-AS-Nis	59
Figure 28: Biofilm <i>S. enterica</i> à 37°C	61
Figure 29: Biofilm <i>S. enterica</i> à 20°C	61

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Débit de TMDS, N ₂ , O ₂	20
Tableau 2 : Conditions utilisées pour les essais anti-biofilm	32
Tableau 3: Conditions expérimentales utilisées pour les revêtements à base de TMDS	35
Tableau 4 : Nombre de bactéries adhérees suivant les différentes conditions TMDS/O ₂ /N ₂	36
Tableau 5 : Angle de contact sur coupons TMDS suivant différents débits N ₂ _O ₂	37
Tableau 6 : Rugosité des différents coupons TMDS	41
Tableau 7 : Nombre de bactéries adhérees par champ microscopique	43
Tableau 8 : Log CFU/cm ² sur chaque type de coupon	44
Tableau 9 : Angle de contact suivant chaque type de coupon	45
Tableau 10 : Ra et Rq selon chaque type de coupon	47
Tableau 11 : Nombre de bactéries adhérees par champ microscopique	49
Tableau 12 : Log CFU/cm ² de <i>Listeria monocytogenes</i> après 3, 5 et 24 h sur SS-Dopa-Nis et SS	50
Tableau 13 : Log CFU/cm ² de <i>Listeria monocytogenes</i> après 3 heures et 5 heures sur SS-Dopa-Glu-Nis et SS	51
Tableau 14 : Angle de contact des différents types de coupons	52
Tableau 15 : Ra et Rq selon chaque type de coupon	53
Tableau 16 : Nombre de bactéries adhérees par champ microscopique sur les différents types de coupons y compris SS-Dopa-AS-Nis	55
Tableau 17: Réduction logarithmique bactérienne suivant chaque type de revêtement	56
Tableau 18: Angle de contact sur les différents types de coupons y compris SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis	56
Tableau 19 : Ra et Rq selon chaque type de coupon y compris SS-Dopa-AS et SS-Dopa-AS-Nis	58
Tableau 20: Efficacité des produits BAC et P1 contre les biofilm de <i>Salmonella enterica</i> installés à 20 et 37°C suivant le temps de contact et la concentration	61
Tableau 21 : Quantification de protéines totales et des sucres totaux dans la matrice des biofilms de <i>S. enterica</i> installés, à 20 et 37°C sur l'acier inoxydable	62

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. Abdallah, C. Benoliel, D. Drider, P. Dhulster, N.E. Chihib, Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments, *Arch Microbiol.* 196 (2014) 453-472.
- [2] Santé-publique-France(InVS), Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2016
- [3] World-Health-Organization(WHO), Estimates of burden of foodborne disease – European perspective, 2015.
- [4] R.M. Donlan, J.W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin Microbiol Rev.* 15 (2002) 167-193.
- [5] H.C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat Rev Microbiol.* 8 (2010) 623-633.
- [6] L.D. Renner, D.B. Weibel, Physicochemical regulation of biofilm formation, *MRS Bull.* 36 (2011) 347-355.
- [7] R. Bos, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol Rev.* 23 (1999) 179-230.
- [8] M. Klausen, A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jorgensen, S. Molin, T. Tolker-Nielsen, Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants, *Mol Microbiol.* 48 (2003) 1511-1524.
- [9] C. Weidenmaier, A. Peschel, Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions, *Nat Rev Microbiol.* 6 (2008) 276-287.
- [10] E. Karatan, P. Watnick, Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms, *Microbiol Mol Biol Rev.* 73 (2009) 310-347.
- [11] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science.* 284 (1999) 1318-1322.
- [12] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol.* 49 (1995) 711-745.
- [13] J.M. Brunkard, E. Ailes, V.A. Roberts, V. Hill, E.D. Hilborn, G.F. Craun, A. Rajasingham, A. Kahler, L. Garrison, L. Hicks, J. Carpenter, T.J. Wade, M.J. Beach, J.S. Yoder Msw, Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water---United States, 2007--2008, *MMWR Surveill Summ.* 60 (2011) 38-68.
- [14] L. Chaves Simões, M. Simões, Biofilms in drinking water: problems and solutions, *RSC Advances.* 3 (2013) 2520-2533.
- [15] G.D. Bixler, B. Bhushan, Biofouling: lessons from nature, *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 370 (2012) 2381-2417.
- [16] M. Abdallah, C. Benoliel, P. Ferreira-Theret, D. Drider, P. Dhulster, N.-E. Chihib, Effect of culture conditions on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to disinfecting agents, *Biofouling.* 31 (2015) 49-59.

- [17] M. Abdallah, G. Chataigne, P. Ferreira-Theret, C. Benoliel, D. Drider, P. Dhulster, N.E. Chihib, Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants, *Appl Microbiol Biotechnol.* 98 (2014) 2597-2607.
- [18] H.D.N. Nguyen, H.-G. Yuk, Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers, *Food Control.* 29 (2013) 236-240.
- [19] P.A. Cotter, S. Stibitz, c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation, *Curr Opin Microbiol.* 10 (2007) 17-23.
- [20] M. Shigeta, G. Tanaka, H. Komatsuzawa, M. Sugai, H. Suginaka, T. Usui, Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method, *Chemotherapy.* 43 (1997) 340-345.
- [21] W.M. Davison, B. Pitts, P.S. Stewart, Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *Antimicrob Agents Chemother.* 54 (2010) 2920-2927.
- [22] C. Llanes, D. Hocquet, C. Vogne, D. Benali-Baitich, C. Neuwirth, P. Plésiat, Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48 (2004) 1797-1802.
- [23] Z.X. Voo, M. Khan, Q. Xu, K. Narayanan, B.W.J. Ng, R. Bte Ahmad, J.L. Hedrick, Y.Y. Yang, Antimicrobial coatings against biofilm formation: the unexpected balance between antifouling and bactericidal behavior, *Polymer Chemistry.* 7 (2016) 656-668.
- [24] L.Q. Xu, D. Pranantyo, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, S.L.-M. Teo, G.D. Fu, Synthesis of catechol and zwitterion-bifunctionalized poly(ethylene glycol) for the construction of antifouling surfaces, *Polymer Chemistry.* 7 (2016) 493-501.
- [25] Y. Xu, J.E. Jones, H. Yu, Q. Yu, G.D. Christensen, M. Chen, H. Sun, Nanoscale Plasma Coating Inhibits Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilm, *Antimicrob Agents Chemother.* 59 (2015) 7308-7315.
- [26] S.J. Kang, S.J. Park, T. Mishig-Ochir, B.J. Lee, Antimicrobial peptides: therapeutic potentials, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12 (2014) 1477-1486.
- [27] L. Karam, C. Jama, N. Nuns, A.S. Mamede, P. Dhulster, N.E. Chihib, Nisin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces: evidence of its interactions and antibacterial activity, *J Pept Sci.* 19 (2013) 377-385.
- [28] I. 22196, Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces, (2018).
- [29] D. Xu, Q. Wang, T. Yang, J. Cao, Q. Lin, Z. Yuan, L. Li, Polyethyleneimine Capped Silver Nanoclusters as Efficient Antibacterial Agents, *Int J Environ Res Public Health.* 13 (2016).
- [30] R. el-Jastimi, M. Lafleur, Structural characterization of free and membrane-bound nisin by infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta.* 1324 (1997) 151-158.
- [31] A.J. B. Ravi, B. Neelakanda Prasad, C. Sadeshkumar, a. G.Rajarajan, SPECTRAL DIFFRACTION AND OPTICAL STUDIES OF SUCCINIC- ACETIC ACID SINGLE CRYSTALS, 6 (2013) 334 - 341.
- [32] M.R. Park, M.K. Banks, B. Applegate, T.J. Webster, Influence of nanophase titania topography on bacterial attachment and metabolism, *International Journal of Nanomedicine.* 3 (2008) 497-504.
- [33] M. Abdallah, C. Benoliel, C. Jama, D. Drider, P. Dhulster, N.E. Chihib, Thermodynamic prediction of growth temperature dependence in the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to stainless steel and polycarbonate, *J Food Prot.* 77 (2014) 1116-1126.

- [34] A. Pagedar, J. Singh, V.K. Batish, Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms, *J Basic Microbiol.* 50 Suppl 1 (2010) S98-106.
- [35] K.A. Gibney, I. Sovadinova, A.I. Lopez, M. Urban, Z. Ridgway, G.A. Caputo, K. Kuroda, Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity, *Macromol Biosci.* 12 (2012) 1279-1289.
- [36] D. Xu, Q. Wang, T. Yang, J. Cao, Q. Lin, Z. Yuan, L. Li, Polyethyleneimine Capped Silver Nanoclusters as Efficient Antibacterial Agents, *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 13 (2016) 334.
- [37] J. Aveyard, J.W. Bradley, K. McKay, F. McBride, D. Donaghy, R. Raval, R.A. D'Sa, Linker-free covalent immobilization of nisin using atmospheric pressure plasma induced grafting, *Journal of Materials Chemistry B.* 5 (2017) 2500-2510.
- [38] D. Duday, C. Vreuls, M. Moreno, G. Frache, N.D. Boscher, G. Zocchi, C. Archambeau, C. Van De Weerd, J. Martial, P. Choquet, Atmospheric pressure plasma modified surfaces for immobilization of antimicrobial nisin peptides, *Surface and Coatings Technology.* 218 (2013) 152-161.
- [39] K. Buckingham-Meyer, D.M. Goeres, M.A. Hamilton, Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests, *J Microbiol Methods.* 70 (2007) 236-244.
- [40] M. Abdallah, O. Khelissa, A. Ibrahim, C. Benoliel, L. Heliot, P. Dhulster, N.E. Chihib, Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants, *Int J Food Microbiol.* 214 (2015) 38-47.

RESUME/ABSTRACT

La capacité des bactéries pathogènes à adhérer et former des biofilms bactériens sur les dispositifs alimentaires constitue un véritable problème de santé publique. Pour la lutte contre la persistance des biofilms dans les IAAs, il est important de caractériser les interactions aux interfaces entre les bactéries et les matériaux utilisés dans le secteur agroalimentaire. Il est également nécessaire de trouver des solutions permettant de garantir la qualité sanitaire des produits transformés et l'hygiène des surfaces utilisées lors de la transformation agroalimentaire. Dans ce contexte, ce travail de recherche a pour objectif de trouver des stratégies préventives de la formation des biofilms ainsi que des stratégies éradicatrices des biofilms. En effet, des traitements de surface de l'acier inoxydable ont été réalisés afin de le rendre fonctionnel avec une activité anti-adhésion et antimicrobienne, par chimie classique et plasma froid microonde. Par ailleurs, des essais anti-biofilm ont été menés sur des biofilms formés à 20 et 37°C pour comprendre la relation entre la température de formation du biofilm et la résistance aux agents désinfectants.

Mots clés : Biofilm bactériens, Qualité sanitaire, Traitements de surface, Résistance aux agents désinfectants

The ability of pathogenic bacteria to adhere and to form biofilms on food devices constitutes a great public health concerns. Thus, it is important to characterize interactions at the interfaces between bacteria and materials used in food sectors. It is also of importance to find solutions to ensure safety and food safety at all stages of the food chain. In this regard, this work aims to find preventive strategies for the formation of biofilms and strategies for their eradication. Indeed, surface treatments of stainless steel have been carried out in order to make it functional with an anti-adhesion and anti-microbial activity. Surfaces were treated by conventional chemistry and cold microwave plasma. Furthermore, anti-biofilm assays were performed against biofilms grown at 20 and 37°C on stainless steel in order to understand the relationship between the temperature of the biofilm formation and their resistance to disinfectants.

Keywords: Bacterial biofilms, Sanitary quality, Surface treatments, Resistance to disinfectants