

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana



Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département des sciences biologique

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en

Analyses Biologiques et Biochimiques

Thème

**Evaluation de la capacité des souches de *Staphylococcus spp* à former des
biofilms dans l'industrie laitière**

Soutenu le 19/06/2017

Présentée par

Bentiba Khadidja

Bentiba Lamya

Devant le jury

M^r Badache. H	Président	MCB	UDB Khemis Miliana
M^r Amrouche. Z	Examineur	MAA	UDB Khemis Miliana
M^r Ait ouazzou. A	Examineur	MCA	UDB Khemis Miliana
M^{me} Didouh. N	Promotrice	MCB	UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2016 /2017

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions(Dieu), le tout puissant, pour la santé, la patience et le courage qu'il nous à donner, pour la réalisation de ce modeste travail.

*Tout d'abord, Nous remercions les plus vifs s'adressent à **M^{me} Didouh N.** pour son encadrement.*

*Nous remercions **Mr Badache** maître de conférence classe B d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Nous remercions également très sincèrement **Mr Amrouche** maître assistant classe A d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Nous remercions **Mr Ait ouazzou.** maître de conférence classe A d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous remercions également **M^{me} Nadjiba, Aïcha** et **M^{me} Affafe** techniciennes aux laboratoires de microbiologie pour la réalisation de travail.*

*Nous remercions également l'ensemble des personnels du laboratoire d'analyses médicales de **Dr Zibouche** en particulier Asma et Yassine pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation de différentes manipulation au service de microbiologie.*

Nous remercions toutes personnes ayant participé de près ou de loin d'avoir à la réalisation de ce modeste travail.

Nous remercions énormément tous nos collègues de la spécialité analyses biologiques et biochimiques

Khadidja et lamya

Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu de m'avoir accordé des connaissances de la science et de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

*Avant tous, je dédie ce travail :
A tous ceux qui me sont proches et chers, mes parents, qu'ils trouvent ici gratitude pour leur soutien, leur confiance en moi, leur encouragements.*

A mes sœurs : Fatima, Djamila, Aïcha, Nacera et Amina.

A mes frères : Moustapha et Mohamed que dieu les émisse.

A tous ma famille : Oncles, Tantes, Cousins et cousines.

A tous mes filles étrangères de l'université de Khemis Miliana.

A tout mes amis surtout : Hanane, Kheira, Nawel et Zahra

*Mon cher binôme : Lamya
Sans oublier mes collègues les étudiants de 2^{ème} Année
Master Analyses Biologiques et Biochimiques.*

Promotion 2016-2017

Khadija

Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu de m'avoir accordé des connaissances de la science et de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

A la bougie de ma vie, la fleur de mes jours, A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

*A mon père qui a sacrifié sa vie pour notre instruction.
A mes chers frères : Mohammed, Ahmad et Abd el-wahab.*

A mes chères sœurs : Fatima, Amina, Khalida , Hizia et Affaf pour leurs disponibilités, leurs encouragements.

A mes oncles et mes tantes , Cousins et cousines.

A tout mes amis :hanane ,samira , khadidja, Zahra, fatima , Wahiba et Hajdira

A toute ma grande famille : BENTAIBA

Mon cher binôme et mon cousines : Khadidja.

A tous mes camarades de promotion de master II d'analyses biologiques et biochimiques.

lamya

Sommaire

Liste d'abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Partie I : Synthèse bibliographique	03
I : Biofilm du <i>Staphylococcus</i>	03
II-Définition	03
III- La formation de biofilm par <i>Staphylococcus spp</i> dans l'industrie alimentaire	04
IV- Les compositions de biofilms	05
V- Les étapes de formation des biofilms.	06
V.1. Film de conditionnement	06
V.2. L'adhérence réversible	06
V.3. L'adhérence irréversible	07
V.4. Le développement précoce du biofilm	07
V.5. La maturation du biofilm	07
V.6. Le détachement de bactéries	07
VI. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	09
VI-1. Caractéristiques de la surface	09
VI-2. Caractéristiques du milieu	10

VI-3. Propriétés des cellules	11
VII- Les effets bénéfiques et néfastes de biofilms	12
VII- Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières	13
IX- Prévention et élimination des biofilms	15
Partie II : Partie Expérimentale	
I. Matériels et Méthodes	
I. Lieu d'étude	17
II.L'origine des souches	17
III. Matériel	17
III. Revivification et vérification de la pureté des souches	18
V. Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i>	18
V.1 .La méthode du Rouge Congo Agar	18
V.2. La méthode en tube (TM)	19
V.3.La technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon	19
V.4. Evaluation de la capacité des souches à formé le biofilm	20
V.4.1. Nettoyage des lames d'acier inoxydable	21
V.4.2.Essai d'obtention d'un biofilm expérimental	22
II : Résultats et Discussions	
I.- Caractères phénotypiques des <i>Staphylococcus spp</i> isolés	23
II- Evaluation de la formation de biofilm	23
II-1- Technique Rouge Congo Agar	24
II-2- Technique TM	26
II.3- Technique MATH	29

II.4- .Evaluation de formation de biofilm sur l'acier inoxydable	31
Conclusion	34
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des figures et des tableaux

Figure n°01: Composition du biofilm	05
Figure n°02 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm	08
Figure n°03 : Représentation schématique du test de MATH permettant la mesure d'affinité des <i>Staphylococcus spp</i> à l'héxadécane.	20
Figure n°04 : aspect macroscopique des colonies de <i>Staphylococcus</i> sur Géluse Chapman	23
Figure n°05: Production de Slime chez les souches <i>Staphylococcus spp</i> isolées sur milieu Rouge Congo Agar	24
Figure n°06: Répartition des souches <i>Staphylocoques spp</i> isolées d'industrie laitière en fonction de production de Slime bactérien	25
Figure n°07 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM	27
Figure n°08 : Répartition des souches <i>Staphylocoques spp</i> isolées d'industrie laitière en fonction de la production de biofilm	27
Figure n°09 : Pourcentage d'affinité des souches <i>Staphylococcus spp</i> à l'héxadécane	29
Figure n°10 : L'adhésion des souches <i>Staphylococcus spp</i> sur l'acier inoxydable	31
Tableau n°01 : La comparaison des résultats de la technique RCA et la méthode TM	28

Résumé :

La formation de biofilm pose des problèmes dans beaucoup de branches de l'industrie alimentaire. En industrie laitière, les biofilms de *Staphylococcus* se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne et la transmission de maladies.

Dans ce travail, on a évalué la capacité de 19 souches de *Staphylococcus spp* isolées d'industrie laitière à former un biofilm par différentes méthodes : méthode RCA, méthode TM, méthode MATH et la capacité de formation d'un biofilm sur l'acier inoxydable.

La production de Slime sur milieu rouge Congo a révélé que 04 souches sont productrices de Slime (21.05%), 08 souches sont intermédiaire (42.10%) et 07 souches non productrice du Slime (36.84%). Selon la technique TM, 5 souches ont été fortement formatrices du biofilm (26,31%), 09 souches étaient modérément (47,36%) et 05 souches ont été non formatrices du biofilm (26,31%).

Pour la technique MATH, 09 souches sont hydrophobes, 08 moyennement hydrophobes et 02 souches sont hydrophiles. L'étude de la formation de biofilm sur l'acier inoxydable montre que le nombre maximum des cellules adhérentes a été de l'ordre de $5,80 \times 10^6$ UFC/cm² et un nombre minimum de $1,2 \times 10^5$ UFC/cm².

La comparaison des résultats de la technique RCA, la technique TM, MATH et la technique d'adhésion sur acier inoxydable permet d'observer qu'il y a une relation entre la production de slime, l'hydrophobicité et la formation de biofilm soit sur le verre ou sur l'acier inoxydable.

Mots clés : *Staphylococcus spp*, biofilm, hydrophobicité, Slime.

Abstract:

The formation of biofilm is problematic in many branches of the food industry. In the dairy industry, biofilms of *Staphylococcus* are usually formed on the surfaces which are in contact with fluids, and can be a source of bacterial contamination and the transmission of diseases.

In this work, we assessed the ability of 19 strains of *Staphylococcus spp* isolated from dairy industry to form a biofilm by different methods: RCA method, method TM, MATH method and the ability to form biofilm on the Stainless Steel surface.

The production of slime on medium Congo Red Agar revealed that 04 strains are producing Slime (21.05%), 08 strains are intermediate (42.10%) and 07 strains, non producer of the Slime (36.84%). According to the method TM, 5 strains have been strongly the biofilm-forming (26,31%), 09 strains were moderately (47,36%) and 05 strains were not biofilm-forming (26,31%).

For the technical MATH, 09 strains are hydrophobic, 08 moderately hydrophobic and 02 strains are hydrophilic. The study of ability to form biofilm on the stainless steel surface shows that the maximum number of adherent cells was of the order of $5,80 \times 10^6$ CFU/cm² and a minimum number of 1.2×10^5 CFU/cm².

The comparison of the results of the technique, RCA, the TM, MATH and the ability to form biofilm on stainless steel allows to observe that there is a relationship between the production of slime, hydrophobicity, and biofilm formation either on the glass or on the stainless steel.

Key words: *Staphylococcus spp*, biofilm, hydrophobicity, slime.

المخلص

يسبب تشكيل بيوفيلم مشاكل في العديد من فروع الصناعات الغذائية. في صناعة الألبان، بيوفيلم المكورات العنقودية عادة ما تكون شكلت على السطوح التي تتلامس مع السوائل، ويمكن أن تكون مصدرا للتلوث البكتيري وانتقال الأمراض.

في هذا العمل، قمنا بتقييم قدرة 19 سلالات المكورات العنقودية المعزولة من مصانع الألبان على تشكيل البيوفيلم بطرق مختلفة: طريقة RCA، طريقة TM، طريقة MATH والتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ.

كشفت إنتاج Slime في وسط rouge Congo أن 04 سلالات منتجة Slime (21.05٪)، 08 سلالات كانت متوسطة (42.10٪) و 07 سلالات غير منتجة (36.84٪). وفقا لتقنية TM، كانت 5 سلالات مكونة للبيوفيلم للغاية (26.31٪)، 09 سلالات كانت متوسطة (47.36٪)، وكانت 05 سلالات غير قادرة على تشكيل البيوفيلم (26.31٪). كشفت تقنية MATH أن 09 سلالات نافرة من الماء، سلالات 08 معتدلة و 02 محبة للماء .

مقارنة مع نتائج تقنية CAR، تقنية TM وتقنية الالتصاق على الفولاذ المقاوم للصدأ يمكن ملاحظة أن هناك علاقة بين إنتاج Slime، اللامائية وتشكيل البيوفيلم إما على الزجاج و إما على الفولاذ المقاوم للصدأ.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية، بيوفيلم، لامائية، Slime .

Introduction

Introduction

Dans l'industrie alimentaire les bactéries pourraient être en mesure de fixer et à former des biofilms sur la surface de la transformation des aliments (**Langoni et al., (2008)** ;(**Aung et al., 2011**). et qui sont particulièrement connus par leurs effets négatifs sur la santé. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les contaminations de produits alimentaires, la bio détérioration des matériaux (en particulier la bio corrosion, etc). (**Klinger et al., 2005**).

Parmi les microorganismes qui ont la capacité de former un biofilm sur les surfaces des équipements, *Staphylococcus spp*: un pathogène alimentaire est régulièrement rencontré dans de très nombreux environnements, en particulier ceux de la chaîne alimentaire. La capacité de *Staphylococcus spp* à former des biofilms fournit un important facteur de virulence (**Costerton et al., 1994**).

La fixation des bactéries sur les surfaces est influencée par les propriétés physico-chimiques de l'environnement (température, pH) et de la bactérie elle-même telle que l'hydrophobicité, production des substances extracellulaires telles que le slime, la mobilité qui permet aux bactéries de s'adhérer à des surfaces biotique et abiotiques comme l'acier inoxydable qui est couramment utilisé en industrie laitière.(**Moltz et Martin, 2005; Folsom et Fank, 2006 ; Shi et Zhu, 2009**).

Ce travail entre dans ce contexte. Il a pour principal objectif de caractériser 19 souches de *Staphylococcus spp* isolées d'équipements laitiers à former un biofilm. Le travail porte sur Caractérisation des souches de *Staphylococcus spp* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm par l'étude des facteurs qui peuvent influencer ce processus tels que l'hydrophobicité de la surface cellulaire (CSH), la production de Slime ainsi que l'adhésion bactérienne à l'acier inoxydable par la formation d'un biofilm expérimental.

Le travail comporte trois grandes parties :

1. Une mise au point bibliographique traitant du biofilm, ses étapes de formation, les problèmes causés par le biofilm en industrie agroalimentaire ainsi que des procédés de control et d'élimination de biofilm.

2. Une partie expérimentale comprenant : La mise au point d'une collection de souches de *Staphylococcus spp* isolées à partir des canalisations d'une usine laitière, et la détection de la capacité de ces souches à formé de biofilm par 4 méthodes expérimentaux : RCA, TM, MATH et adhésion à l'acier inoxydable.

3. Une troisième partie rend compte des résultats expérimentaux obtenus. Enfin, nous présenterons la principale conclusion de ce travail.

Partie I

Synthèse

Bibliographique

Partie I : synthèse bibliographique

I. Biofilm de *Staphylococcus*

I-Historique :

La découverte du biofilm remonte au début des années 40 depuis les travaux de **Henrici 1933** et **Zobell 1943**. Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Zobell en 1943.

Les biofilms sont un ensemble de micro colonies, entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS). Christensen *et al.* (1982) ont été les premiers à observer la formation d'un biofilm chez une souche de *S. epidermidis* isolée d'un cathéter. Ils ont noté la formation d'un film gluant, filamenteux sur des tubes de cultures, puis ils ont visualisé cette substance extracellulaire par une coloration au bleu alcian en microscopie électronique à balayage. Ces auteurs ont noté que la plupart des souches avaient une production variable de cette substance qui dépendait du milieu et de la supplémentation en glucose. Ils ont suggéré que la formation de biofilm était un facteur critique dans la pathogénèse de *S. epidermidis*. Ces faits ont été confirmés la même année par Peters *et al.* (1982) qui ont montré une corrélation entre la capacité de colonisation du matériel médical par *S. epidermidis* et les infections nosocomiales (**Planchon, 2006**).

II. Définition :

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides (**Jain *et al.*, 2011**) adhésive et protectrice qu'ils secrètent. C'est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif (**Characklis, 1989 ; Bourion, 1995 ; Bosgiraud, 2003 ; Boutaleb, 2007 ; Salaun, 2009**).

Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (**Behlau et Gilmore, 2008**).

III- La formation de biofilm par *Staphylococcus spp* dans l'industrie alimentaire :

Dans l'industrie alimentaire, il est important de connaître les conditions dans les quelles *S. aureus* est capable de survivre, adhérer aux surfaces et former des biofilms (**Futagawa-Saito et al., 2006**), conduisant à la contamination des produits alimentaires. En forme planctonique, *S. aureus* n'apparaît pas résistant aux désinfectants, comparativement à d'autres bactéries, mais il peut être parmi les plus résistants lorsqu'il est attaché à une surface (**Fratamico et al., 2009**). *S. aureus* peut produire un biofilm multicouche incorporés dans un glycocalix avec l'expression des protéines hétérogènes dans l'ensemble, formant au moins deux types de biofilms : ica-dépendant, médiée par adhésine intercellulaires polysaccharidique (PIA)/poly-N-acétyl-glucosamine β -1,6 (PNAG) et ica-indépendante, médiée par des protéines (**Beloin et Ghico, 2005**).

Les souches de *Staphylococcus* sont des bactéries productrices des entérotoxines thermorésistantes pouvant provoquer une intoxication chez l'homme.

Neuf types antigéniques majeurs de la SE (Entéro-toxine Staphylococcus) ont été désignés : SEA, SEB, SEC, SED, SEF, SEG, SEH, SEI et SEJ (**Zhange et al., 1998**). Toutes ces toxines présentent une activité super antigéniques en interagissant avec les cellules présentatrices d'antigène et, stimulent la prolifération non spécifique des cellules T (**Balaban et al., 2000 ;Nehal et al., 2010**).

La toxine se forme dans l'aliment et même si la bactérie est détruite par la cuisson, ces toxines restent présentes dans l'aliment (**Balaban et al.,2000**). Les symptômes d'une intoxication par *Staphylococcus* se présentent très rapidement après l'ingestion de l'aliment contaminé, et se manifestent essentiellement par des nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. Le plus souvent, il n'y a pas de fièvre. La gravité et la durée de la maladie dépendent de la quantité de toxine ingérée et de l'état de santé et de la sensibilité de la personne. Généralement, les symptômes disparaissent d'eux-mêmes après 6 à 12 heures. Dans la plupart des cas, la bactérie est transmise dans la nourriture via les personnes préparant les aliments qui sont porteuses du germe, par exemple par leurs mains ou lorsqu'elles éternuent.

Dans l'environnement de la transformation des aliments, il est admis que l'adhésion microbienne est généralement précédée par l'adsorption de molécules organiques et inorganiques formant un film de conditionnement. Ce dernier modifie les propriétés physico-chimiques du substrat en surface (Chmielewski et Frank, 2003; Lorite et al., 2011).

Les biofilms ont le potentiel d'agir comme une source de contamination microbienne chronique qui peut compromettre la qualité des aliments et représentent un danger important pour la santé (Marques et al., 2007).

IV- Les compositions des biofilms :

Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes (Tremblay, 2014). Ces cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée (>90% d'eau) et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Cependant, leur répartition est fonction de l'espèce concernée. Par exemple, chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin »). (Arciola et al., 2015) (Voire figure n° 01).

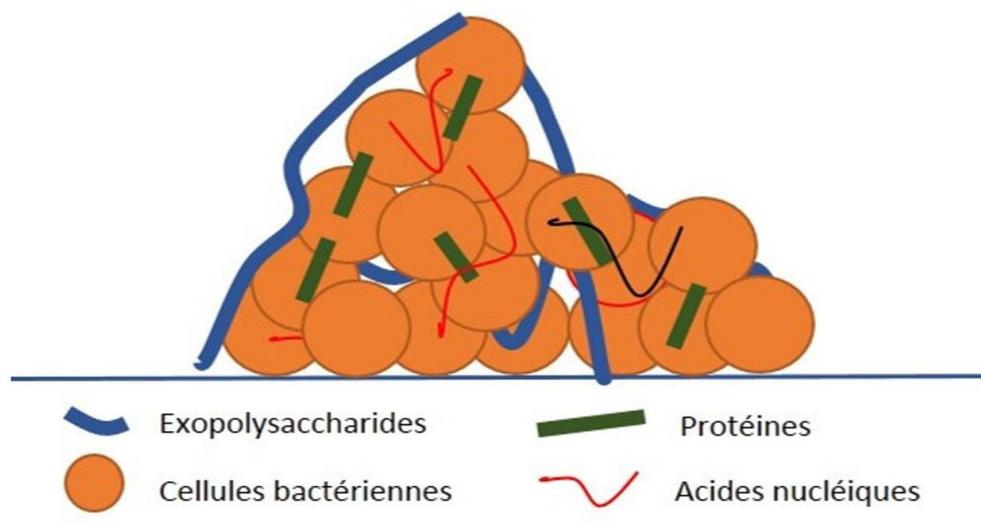


Figure n°01: Composition du biofilm (Lister et al., 2014).

V- Les étapes de formation de Biofilm :

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (**Annous *et al.*, 2009**), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (**Vu *et al.*, 2009**).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques et/ ou sur les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Talero, 2008**).

V-1. Film de conditionnement :

En premier lieu, un film de conditionnement, est produit pendant l'immersion dans un liquide (**Belmar-Beiny et Fryer, 1992 ; Boyd *et al.*, 2000**). Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques ou organiques ou des composés biologiques de l'environnement (**Zottola et Sasahara, 1994**). La nature du film de conditionnement sera affectée par la nature de la surface et la source du film de conditionnement (**Pratt-Terpstra et Busscher, 1998 ; Boyd *et al.*, 2000**).

Le rôle du film primaire n'est pas clairement élucidé, il modifierait les propriétés physicochimiques de surface influençant ainsi l'adhésion bactérienne.

V.2- L'adhérence réversible :

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Høiby *et al.* 2011**) par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide (**Beloin *et al.*, 2008**).

L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin *et al.*, 2008**)

V.3. L'adhérence irréversible :

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (Høiby, 2011) et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E.coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (Beloïn *et al.*, 2008).

V.4. Le développement précoce du biofilm :

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (Jacolosen *et al.*, 2008).

V.5. La maturation du biofilm :

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (Folkesson *et al.*, 2008), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (Tenke *et al.*, 2006).

La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (Jacolosen *et al.*, 2008).

V.6. Le détachement du biofilm :

Les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnement après un retour à l'état planctonique.

Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les

bactéries elles mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités.

Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (**Kaplan, 2010**). Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries (**Joshi *et al.*, 2010**).

Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (**Joshi *et al.*, 2010**). (Voir la figure n°02).

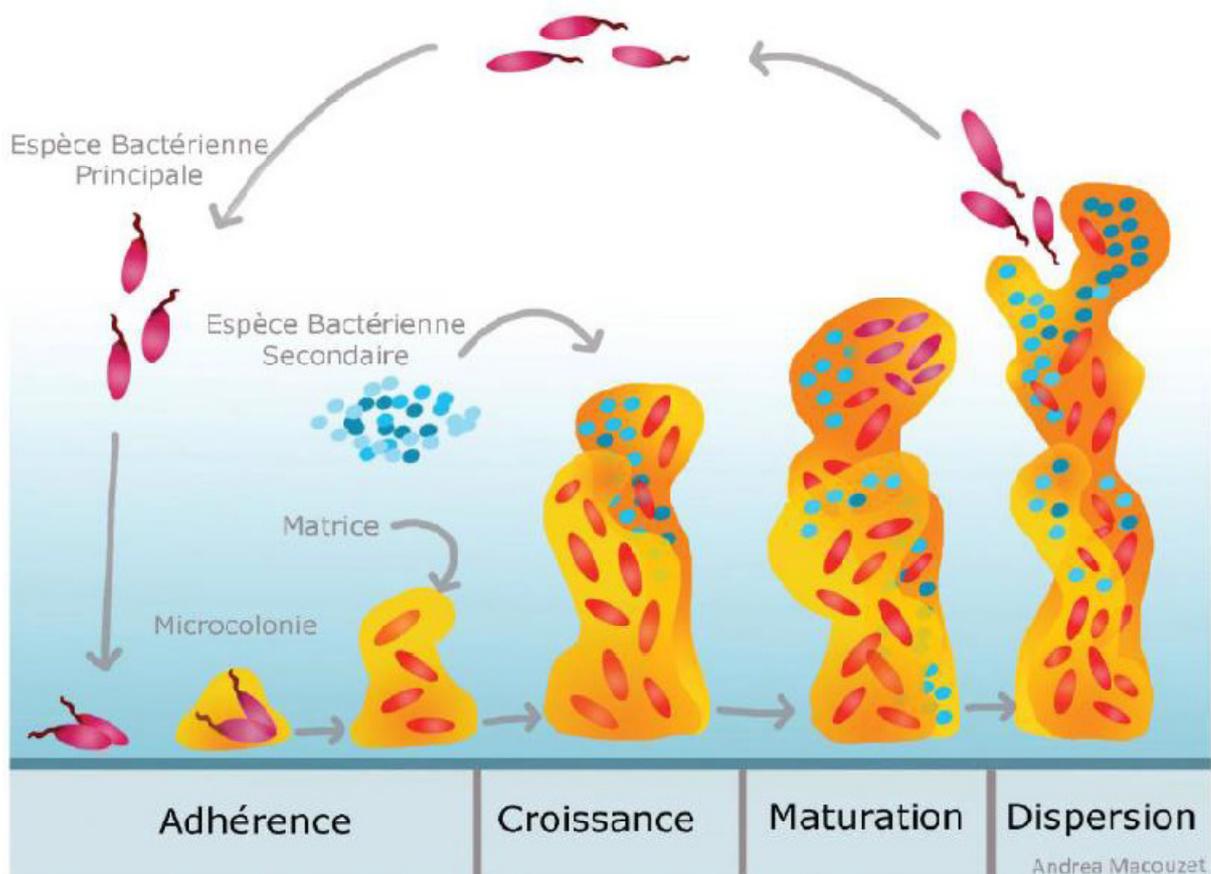


Figure n°02: Schéma présentant les étapes du développement du biofilm (**Yannick *et al.*, 2014**)

VI- Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (**Donlan, 2002**).

VI.1. Caractéristiques de la surface :

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (**De Chalvet et De Rochemonteix, 2009**).

VI.1.1 Rugosité de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**).

Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (**Donlan et Costerton, 2002**).

VI.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

VI.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Nobbs, 2009).

VI.2. Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (O'Toole *et al.*, 2000; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008):

a. Température : est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007).

b. ph : du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (Hamadi *et al.*, 2004) ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Boutaleb, 2007).

c. Concentration en oxygène.

d. Concentration en fer.

e. Osmolarité.

f. Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez, 2007**).

g. Concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

h. Concentrations en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na^+ , Calcium Ca^{2+} , ion ferrique Fe^{3+}) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (**Fletcher, 1988**).

i. Hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation.

C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

VI.3. Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (**Donlan, 2002**).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes.

Les Exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

VII- Les effets bénéfiques et néfastes de biofilms :

VII.1. Les effets bénéfiques :

Les biofilms jouent un rôle positif pour notre santé. La surface de notre peau est recouverte d'un biofilm dont la présence engendre une compétition microbienne rendant plus difficile la colonisation par des organismes pathogènes (Percival *et al.*, 2012). Les biofilms gastro-intestinaux assurent également un rôle de protection et participent au processus de digestion (Macfarlane *et al.*, 2011). Ils jouent aussi un rôle clé dans la production et la dégradation de la matière organique, dans les cycles d'azote, de soufre, ainsi dans la dégradation des polluants (Marchall, 2010).

Les biofilms peuvent se révéler très utiles dans le domaine agroalimentaire. La production d'éthanol dans des réacteurs dans lesquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm, sont utilisés également dans la production du vinaigre (acide acétique) (Alnasouri, 2010).

VII.2. Les effets néfastes :

Les biofilms peuvent entraîner de sévères problèmes de santé lorsqu'ils induisent l'apparition d'espèces pathogènes. Malgré les procédures de nettoyage et de désinfection, les biofilms posent des problèmes divers en médecine : biofilm de bactéries pathogènes se développent dans des systèmes digestifs, urinaire et respiratoire ou contamination

d'implants ou de tubulures lors des opérations médicales. L'implantation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité de l'eau potable (contamination, mauvais goût) (**Block et al, 1993**).

Les biofilms sont responsables de la dégradation de la qualité des aliments et de contamination dans les équipements de l'industrie agro-alimentaire (**Fournaud et al, 1978**).

La formation de biofilms sur les plaques de certains échangeurs de chaleur à température base, dans l'industrie alimentaire, peut diminuer leur capacité de transfert thermique (**Characklis et al., 1980**) et entraîner l'augmentation de pression sur les pompes à cause de la diminution de diamètres dans ses tuyaux (**Hamilton, 1987**).

VIII- Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières :

La formation de biofilm pose des problèmes dans beaucoup de branches de l'industrie alimentaire (**Poulsen ,1999**). En industrie laitière, les biofilms se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne responsable de la réduction de la durée de conservation des produits et de la transmission de maladies (**Carpentier et Cerf, 1993 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002 ; Agarwal et al., 2006**). Ils peuvent en effet servir de niche à des espèces pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (**Wong, 1998**) et causent alors de sévères problèmes de santé publique (**Cerf, 2002**). La formation des biofilms sur les équipements d'industrie laitière peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques (**Bremer et al., 2006; Zhao et Liu,2006 ;Gram et al., 2007**).

Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques ce qui fait de leur élimination à partir des équipements de traitement des denrées alimentaires un défi important (**Simões et al., 2006 ; Simões et Vieira, 2009**). Des études ont montré que les micro-organismes organisés en biofilm sur une surface sont plus résistants aux antibiotiques et aux désinfectants, que les cellules planctoniques, cette résistance dépend de leur activité métabolique et augmente avec l'âge du biofilm (**Mattila-Sandholm et Wirtanen, 1992 ; Lechevallier et al., 1998 ; Zottola et Sasahara ,1994 ; Costerton et al ., 1995**), l'état de la matrice d'exopolymères, la surface et les conditions de

croissance (**Muatapha et Liewen,1989 ;Frank et Koffi,1990**). Généralement, les micro-organismes vivant dans les biofilms sont beaucoup plus résistants aux désinfectants que des micro-organismes dans une culture planctonique. La résistance accrue est provoquée par plusieurs facteurs. Le glycocalyx limite la diffusion et peut causer la désactivation des désinfectants. La densité de la suspension bactérienne à l'intérieur du biofilm et l'état physiologique de cellules affectant la production des enzymes dégradantes sont également impliqués (**Vidal et al., 1997 ; Wirthlin et al., 2005**).

Les micro-organismes dans les biofilms peuvent catalyser des réactions chimiques et biologiques (sulfate-réductases ou les bactéries productrices d'acide) causant ainsi la corrosion des canalisations et des tanks de stockage. Ils peuvent également réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épais (**Costerton et Lappin-Scott, 1989 ; Vieira et al., 1993 ; Mittelman, 1998**). Dans les biofilms, la concurrence pour les nutriments a comme conséquence une insuffisance nutritive, a également un rôle important dans la plus grande résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens (**Berg et al., 1982 ; Jones et Pickup, 1989**). Certaines études ont montré que les bactéries portées par les aliments étaient plus résistantes aux divers désinfectants. Cette résistance est encore plus grande dans des biofilms âgées (plus de 24 h) que dans des biofilms jeunes (**Anwar et al., 1990 ; Frank et Koffi, 1990 ; Lee et Frank, 1991 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992**).

Compte tenu des différents facteurs décrits précédemment, les micro-organismes adhérents et/ou en biofilms sont très difficiles à éliminer et sont donc une source récurrente de contamination des aliments dans le secteur agro-alimentaire et les biofilms formés sur les canalisations ou d'autres surfaces dans l'environnement de traitement des denrées alimentaires sont identifiées comme source potentielle pour l'intoxication alimentaire (**Allion, 2004**). La résistance des biofilms aux traitements conventionnels augmente la nécessité de développer de nouvelles stratégies de prévention (**Singh et al., 2002 ; Simoes et al., 2009**).

IX- Prévention et élimination des biofilms :

Beaucoup de travaux ont cherché à améliorer l'efficacité du nettoyage en place (NEP) en étudiant le rôle des produits chimiques (**Peng *et al.*, 2002**), de la température (**Wilson, 2005**), du temps de contact (**Lelièvre *et al.*, 2002**), des propriétés des matériaux (**Jullien *et al.*, 2003 ; Speranza *et al.*, 2004; Zhao, 2004 ; Whitehead et Verran, 2006 ; Hadjiev *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2007**). **Palmer *et al.*(2007)** ont également souligné l'importance de la conception des installations sur la facilité du nettoyage des surfaces d'équipement.

En effet, l'hydrodynamique est un paramètre principal dans le nettoyage. Cependant, relativement peu d'études (**Lelièvre *et al.*, 2002 ;Herrera *et al.*, 2007**) ont rendu compte de la cinétique de détachement des bactéries adhérentes (**Faille *et al.*, 2013**).

Une stratégie pour empêcher la formation du biofilm est de désinfecter régulièrement, avant la formation d'un nouveau biofilm (**Das *et al.*, 1998**). L'implémentation d'une étape de germination avant le NEP peut réduire le nombre de spores dans la chaîne de fabrication (**Hornstra *et al.*., 2007**).

L'inhibition de la formation de biofilm peut être la meilleure manière pour les contrôler dans les équipements de transformation alimentaire. **Furukawa *et al.* (2009)** ont montré que les esters d'acide gras et de sucre (additifs utilisés comme émulsifiants dans les aliments traités) sont des agents prometteurs pour l'inhibition de la formation de biofilm par des bactéries d'intoxication alimentaire.

Les mécanismes inhibiteurs et les modalités pratiques d'utilisation de ces esters dans la transformation alimentaire devraient être étudiés.

Les biosurfactants ont plusieurs propriétés qui pourraient être utiles dans beaucoup de domaines de l'industrie alimentaire, leur activité antiadhésive a attiré l'attention comme nouvel outil pour empêcher et perturber les biofilms formés dans des surfaces de contact alimentaire (**Nitschke et Costa, 2007**). L'argent est utilisé pour retarder ou empêcher la formation des biofilms (**Cicalini *et al.*, 2004 ; Gentry et Cope, 2005 ; Ashraf *et al.*, 2014**).

La formation de biofilm sur les appareils médicaux implantés est une cause fréquente de rejet d'implant. Plusieurs auteurs rapportent l'inhibition de la formation de biofilm sur de tels dispositifs in vitro en les enduisant d'argent (**Klueh *et al.*, 2000 ; Hashimoto, 2001**).

Les enzymes et les bactériocines sont aussi considérés en tant qu'agents améliorant l'efficacité de nettoyage et de désinfection, cependant, plus d'études devraient être effectuées pour affirmer leur efficacité contre des biofilms.

Eviter la formation de biofilm par l'incorporation des produits antimicrobiens dans les matériaux extérieurs (**Weng *et al.*, 1999 ; Park *et al.*, 2004**), ou en modifiant les propriétés physico-chimiques de surfaces (**Whitehead *et al.*, 2004, 2005 ; Rosmaninho *et al.*, 2007**) est également une voie de progrès.

Partie II

Partie Expérimentale

Partie I : Matériel et méthode

I. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie à université Djilali Bounaama. Durant la période allant du février au Mai 2017.

II. L'origine des souches

Les 19 souches utilisées dans notre travail issu d'une collection de souches isolées à partir d'une canalisation post et pré pasteurisation de lait de vache de l'usine Arib –Ain Defla.

III. Matériel :

- Anse de platine
- Pipette pasteur
- Boîtes de pétri
- Tubes à essais
- Tubes à hémolyse
- Etuve
- Bec bunsen
- La hôte
- Vortex
- Spectrophotomètre
- Les lames d'acier inoxydable.

Milieux de culture

Milieux de culture liquides

- Bouillon cœur cerveau (BHIB).
- Bouillon nutritif (BN).

Milieux de culture solides

- Gélose Chapman.
- milieu Rouge Congo Agar.

Réactifs :

- Cristal violet.
- **PBS** : Phosphate buffered saline.
- **TSE** : Tryptone sel eau.

III. Revivification et vérification de la pureté des souches

La revivification des souches a été effectuée dans le bouillon nutritif. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h.

La vérification de la pureté des souches a été réalisée sur gélose Chapman qui est un milieu sélectif pour les staphylocoques, sa teneur élevée en chlorure de sodium limite le développement de certains germes autres que *Staphylococcus*. Les micro-organismes fermentant le mannitol donnent des colonies jaunes. Ce caractère est un critère d'orientation pour l'identification de *Staphylococcus aureus* (Leyral et Vierling, 2007).

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose Chapman avec incubation à 37°C pendant 24-48h, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et même couleur renseignent sur la pureté des souches.

V. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* :

V.1 .La méthode du Rouge Congo Agar :

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de Slime. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhésion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (Ziebuhr *et al.*, 2001).

La production de Slime a été recherchée sur le milieu Rouge Congo Agar(RCA). Selon Freeman *et al.* (1989), le milieu a été préparé avec 37 g/L BHIB, 50 g/L de saccharose, 10 g/L d'agar et 0,8 g/L du Rouge Congo, puis autoclavé à 121°C pendant 15 minutes (Nasr *et al.*, 2012). Le milieu estensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche. La lecture a été faite après 24 heures à 37°C (Jain et Agarwal, 2009).

Les souches productrices de Slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Nasr *et al.*, 2012).

V.2. La méthode en tube (TM) :

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen *et al.* (1982)**.

A partir d'une boîte de culture 18-24 heures,ensemencer une colonie dans 10 mL de BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (**Mathur *et al.*, 2006**).

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La formation de biofilms est notée comme de 0 pour absent, + pour modéré et +++ pour fort (**Stepanovic *et al.*, 2000**).

V.3.La technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) :

Plusieurs travaux rapportent que le caractère hydrophobe de la surface des cellules bactériennes a été déterminé par plusieurs méthodes. Des méthodes fondées sur la précipitation des cellules par les sels (**Lindahl *et al.*, 1981**), des méthodes utilisant la Chromatographie d'interaction hydrophobe (**Smyth *et al.*,1978 ; Doyle *et al.*, 1984**) et des méthodes mettant en évidence l'adhérence à divers hydrocarbures liquides, y compris l'hexadécane (**Rosenberg *et al.*, 1980 ; Doyle *et al.*, 1984 ;Craven et Blankenship, 1987 ; Kutima et Foegeding, 1987**).

L'utilisation de la méthode MATH –pour Microbial adhesion to hydrocarbons- est une des méthodes les plus simples et les plus rapides. Cette méthode est basée sur l'affinité à l'hexadécane.

la densité optique initiale des suspensions (DO_i) à 600 nm est ajustée à une valeur proche de 0,600 par addition de bouillon nutritif dans les tubes à hémolyse (**Bos *et al.*, 1999**).

La mesure de l'affinité pour l'hexadécane a été réalisée par le mélange dans des tubes à hémolyse de 3 ml de suspension bactérienne avec 0,5 ml d'hexadécane. Une émulsion fine entre les deux phases est obtenue par agitation au Vortex pendant une minute. Après un repos

de 30 min à la température ambiante, la DO de la phase aqueuse est lue à 600 nm (DO_{eq} = DO après une minute d'agitation).

Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors calculé par la relation suivante :

$$\text{CSH}\% = [(\text{DO}_i - \text{DO}_f) / \text{DO}_i] \times 100$$

DO_i : Densité Optique initiale

DO_f : Densité Optique finale

Lorsque la :

CSH(%) < 20% hydrophile

CSH(%) > 40% hydrophobe

20% < CSH(%) < 40% moyennement hydrophobe.

CSH : hydrophobicité de surface cellulaire

L'expérience est réalisée trois fois pour chaque souche.

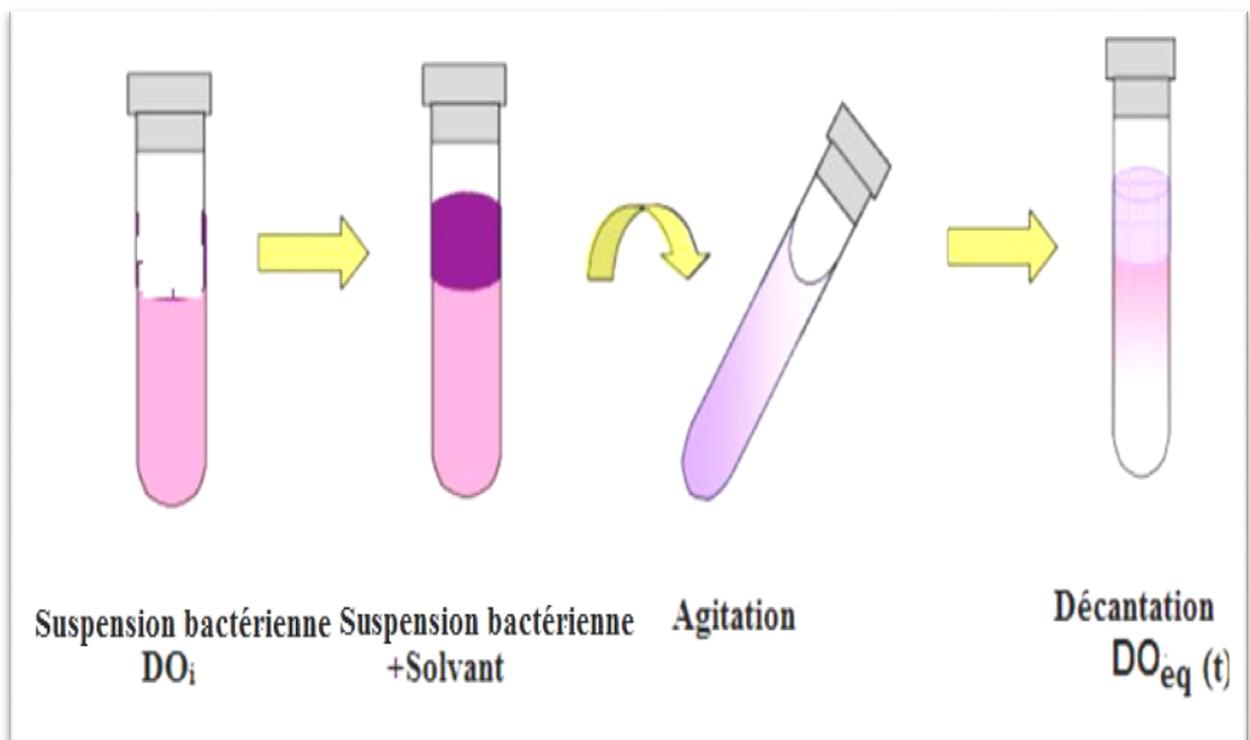


Figure n°03 : Représentation schématique du test de MATH permettant la mesure d'affinité des *Staphylococcus spp* à l'héxadécane. (Didouh ,2015)

V.4. Evaluation de la capacité des souches à formé le biofilm :

V.4.1. Nettoyage des lames d'acier inoxydable :

Les lames sont préparées suivant la technique de **Peng. (2001)**.

-Les lames coupées dans des dimensions de 5 cm sur 1 cm sont submergées dans un mélange d'éthanol et d'acétone (v/v) pendant une heure, afin d'éliminer les traces des matières grasses.

-Rinçage à l'EDS.

-Elles sont ensuite submergées dans une solution de NaOH à 2% pendant 5 minutes à 75°C.

-Un deuxième rinçage des lames à l'EDS.

-Puis elles sont submergées dans la solution de HNO₃ à 1% pendant 5 minutes à 75°C.

enfin un dernier rinçage à l'EDS.

Avec un marqueur hydrophobe et indélébile, un carré est délimité sur les coupons d'aciers d'une dimension de 1cm sur 1cm, puis recouverts avec du papier aluminium pour enfin être stérilisés.

V.4.2.Essai d'obtention d'un biofilm expérimental :

La méthode utilisée pour la formation du biofilm à *Staphylococcus spp* se fait selon la technique de **Marques et al. (2007)** afin de réaliser une adhésion et une formation complète du biofilm. Les étapes de formation se résument comme suit :

*Préparer un inoculum bactérien d'une charge de 10⁵ UFC /ml

*Les lames ainsi préparées, est submergé dans la suspension contenant 10⁵ UFC /ml, et incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après cette durée d'incubation, les surfaces subissent certaines opérations qui se résument come suit :

-Les surfaces sont d'abord rincées au PBS pour éliminer les cellules non adhérees à la surface.

Partie expérimentale

-les lames vont être placées dans des tubes de TSE (tryptone sel eau) additionné de 2% de tween 20 et agité au vortex pendant 1 minute.

-A partir de ce tube, des dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-5} (tube contenant de l'eau physiologie 9g/L).

-Un ensemencement est réalisé en inoculant 0,1 ml sur gélose nutritive.

-Et enfin, les boîtes sont dénombrées après 48 heures d'incubation à 37°C.

Le nombre de cellules adhérentes est calculé par la formule suivante :

$$\text{UFC/cm}^2 = (\text{Ne}/\text{A}) \times \text{d}$$

A : la surface de la lame.

Ne : nombre de bactéries dans la boîte.

d : facteur de dilution

II. Résultats et discussions

I. Caractères phénotypiques des *Staphylococcus spp* isolés :

Sur la Gélose Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques du genre *Staphylococcus*. Le développement bactérien sur le milieu Chapman ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (entérocoques) peuvent y cultiver. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre après 48h d'incubation à 37°C. (Voire figure 04)

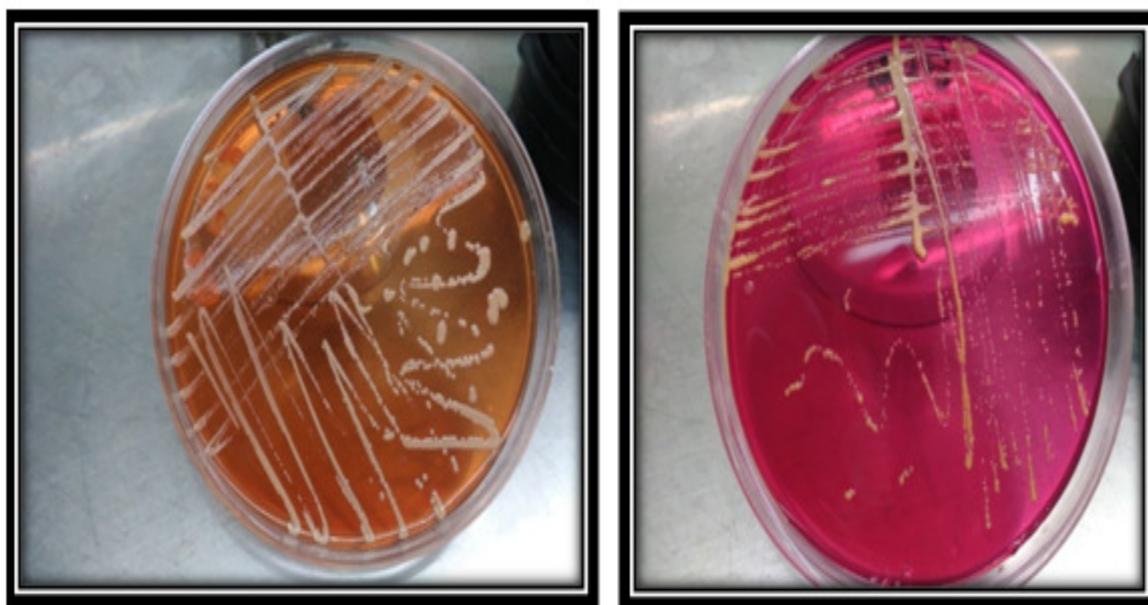


Figure 04: aspect macroscopique des colonies de *Staphylococcus spp* sur Gélose Chapman (Originale)

II. Evaluation de la formation de biofilm :

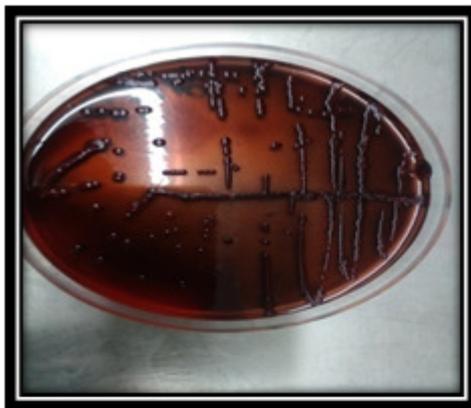
Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms. Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou, 2009).

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode qualitative de tube TM (Christensen *et al.*, 1982). et la méthode du Rouge Congo (Mathur *et al.*, 2006).

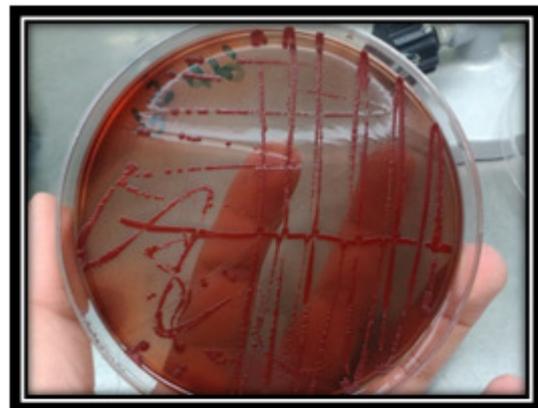
II.1- Technique Rouge Congo Agar :

Les 19 souches de *Staphylococcus spp* isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former le biofilm par techniques de Rouge Congo Agar (RCA).

La recherche de la production de Slime sur milieu rouge Congo a révélé que 04 souches sur 19 isolées d'industrie laitière sont productrices de Slime (21.05%), 08 souches sont intermédiaire (42.10%) et 07 souches non productrice du Slime (36.84%) (Voire figure n° 05).



A) Production du slime



B) Production moyenne du slime



C) L'absence du slime

Figure n°05: Production de Slime chez les souches *Staphylococcus spp* sur milieu Rouge Congo Agar.(Originale)

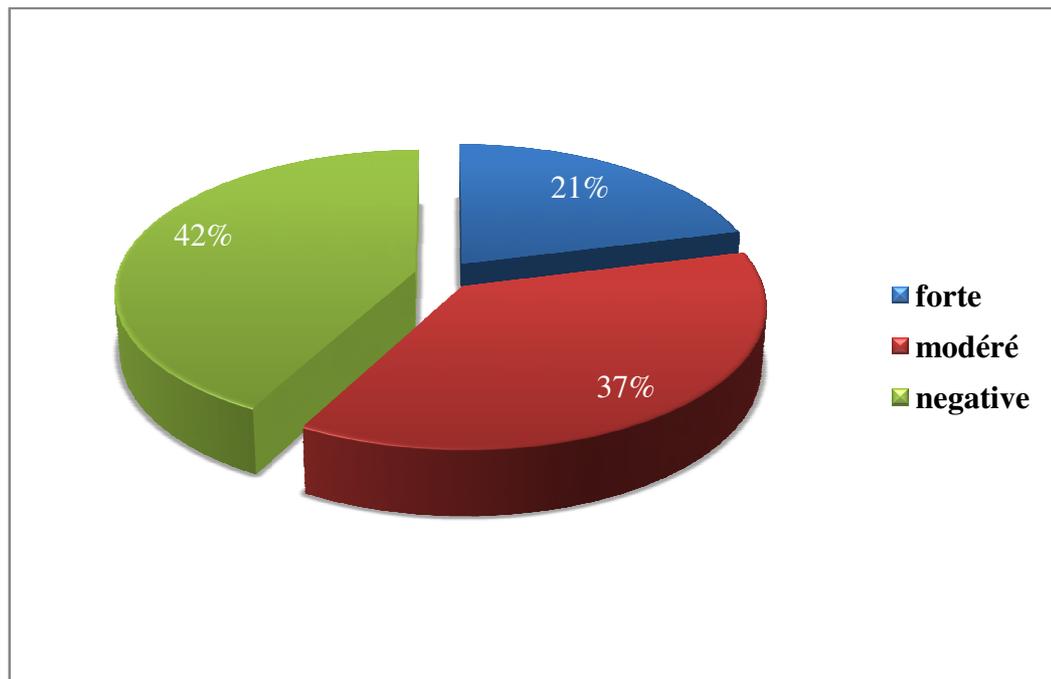


Figure n°06: Répartition des souches *Staphylocoques spp* isolées d'industrie laitière en fonction de production de Slime bactérien.

Le Slime est définie comme la substance polymérique extracellulaire, également connu sous le nom de exo-polysaccharides (EPS), qui est principalement formé par PIA chez *S. epidermidis* et *S. aureus*, (**Costerton et al., 1995**)

La production des exo-polysaccharides joue un rôle important dans les infections causées par différents microorganismes (**Alcaraz et al., 2003**), et est considérée comme un facteur de virulence important pour certains microorganismes tels que *Staphylococcus aureus*.

Les EPS (exo-polysaccharides) sont généralement des matériaux polysaccharidiques, qui sont impliqués dans la protection des cellules microbiennes. En plus, les microorganismes qui produisent ces exo-polysaccharides sont plus résistants à la dessiccation, à la prédation et aux produits chimiques (**Ophir et al., 1994**). Cependant, ces molécules sont également importantes dans la formation de biofilms sur les surfaces puis qu'elles sont impliquées dans les premières étapes de la formation de biofilms.

Krukowski *et al.* (2008) ont indiqué que, sur les 59 isolats de *S. aureus* isolées de la sécrétion inflammatoire des glandes mammaires des vaches, 42,37 % produisent du Slime et 57,68% ne produisent pas de Slime.

Gundogan *et al.* (2006) ont constaté que 58 (52,7 %) des 110 souches de *S. aureus* isolées à partir de lait cru, lait pasteurisé et les glaces des échantillons ont été productrices de Slime.

Ciftci *et al.* (2009) ont constaté que seulement 22 des 59 souches (37,2 %) de *S. aureus* isolées des échantillons de lait ont été productrices de Slime.

Le résultat obtenu par **Vasudevan *et al.* (2003)** 32 souches (91,4 %) sur 35 souches de *S. aureus* isolées de mammites bovines a été productrice de Slime. Ces valeurs sont plus élevées par rapport à nos résultats.

Plusieurs auteurs signalent que la méthode de Rouge Congo Agar semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm *in vitro*.

II-2- La technique TM :

Selon la technique TM et sur l'ensemble de 19 souches, 5 souches ont été fortement formatrices du biofilm (26,31%), 9 souches étaient modérément (47,36%) et 5 souches ont été non formatrices du biofilm (26,31%).

La méthode TM semble facile à réaliser mais la lecture des résultats peut-être difficile, car plusieurs auteurs stipulent que la formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible recouvre le mur et le bas du tube alors que d'autres considèrent que la formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm (**Mathur *et al.*, 2006**).



Figure n°07 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM.(Originale)

Les résultats de TM sont présentés dans la figure suivante :

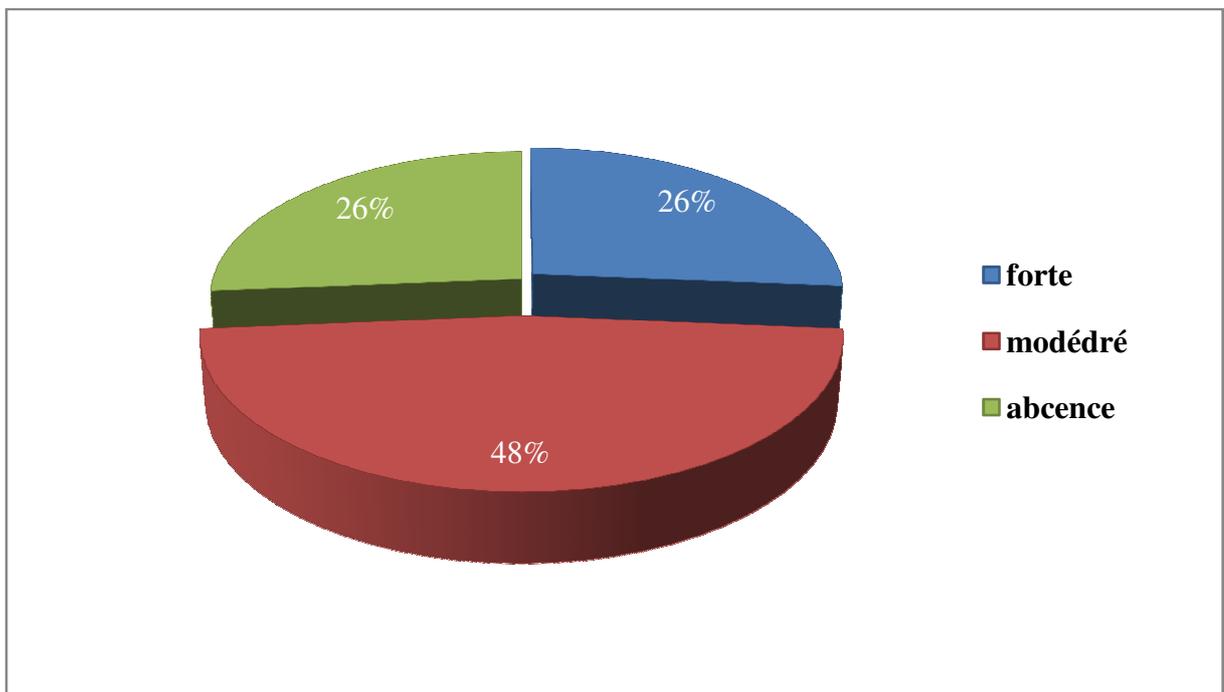


Figure n°08 : Répartition des souches *Staphylococcus* spp isolées d'industrie laitière en fonction de la production de biofilm.

Krukowski et al. (2008) ont indiqué que, sur les 59 isolats de *S. aureus* isolées de la sécrétion inflammatoire des glandes mammaires des vaches, 47,45 % produit Slime utilisé par la méthode MT.

La comparaison de nos résultats avec **Krukowski et al. (2008)** montrent que nous avons trouvés uniquement 28% des souches ont été fortement formatrices du biofilm.

Afreenish et al.(2011) ont constatés que 49 % des souches de *S. aureus* isolé à partir de lait sont considérées comme productrices de biofilm et 51 % comme des non-productrices de biofilm.

Fox et al. (2005) démontré que 41,4 % des souches de *S. aureus* retrouvés dans le lait de vache ont formé le biofilm.

D'après les résultats obtenus on peut dire qu'il y a une corrélation entre la production de Slime et la formation de biofilm sur verre (**Voire tableau n° 01**).

Tableau n°01 : La comparaison des résultats de la technique RCA et la méthode TM.

Technique	Nombre des souches <i>Staphylococcus spp</i>		
	Fort	Modéré	Absence
RCA	04	08	07
TM	05	09	05

Les résultats de nos expériences ont montré que la TM était la plus efficace et la mieux indiquée pour une évaluation qualitative de l'adhésion bactérienne sur une surface.

Dans une autre étude, **Ruzicka et al.(2004)** a noté que sur 147 souches de *S. epidermidis*, TM a détecté la formation de biofilm chez 79 (53,7 %) et RCA a détecté uniquement 64 (43,5 %).

Ils ont montré que la méthode TM est la meilleure pour la détection du biofilm que la méthode RCA.

II.3-La technique MATH :

L'hydrophobicité de la surface bactérienne des souches de *Staphylococcus spp* est connue pour être associée à sa pathogénicité, à son adhésion bactérienne et à sa capacité à former le biofilm (Costa *et al.*, 2006 ; Pour *et al.*, 2011). Dans ce travail, l'hydrophobicité des souches *Staphylococcus spp* a été évaluée par la méthode MATH en utilisant l'héxadécane comme solvant.

Les résultats obtenus par la méthode MATH indiquent qu'à partir des valeurs obtenues, les isolats peuvent être classés en trois groupes :

Groupe 1: très hydrophobe comprennent 9 souches (47.36% des isolats).

Groupe 2: les souches moyennement hydrophobes comprennent 8 souches (42.10% du total des isolats).

Groupe 3: les souches hydrophiles comprennent 02 souches soit 10.52% du total des isolats.

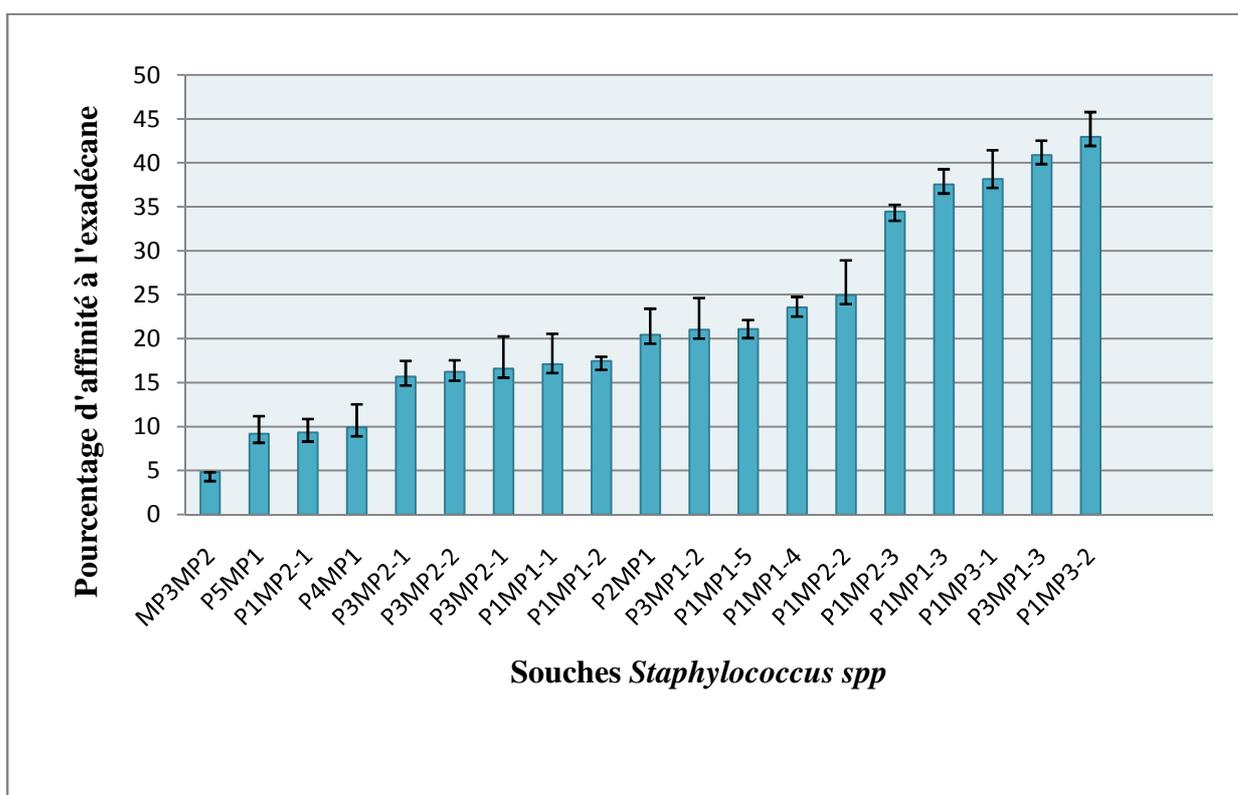


Figure n°09: Pourcentage d'affinité des souches *Staphylococcus spp* à l'héxadécane.

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (**Jana et al., 2000 ; Cappello et al., 2006**). L'hydrophobicité chez les bactéries à Gram positive est due à la partie de lipide d'acide lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule, ayant pour résultat une surface hydrophobe (**Frank, 2001**).

Nos résultats montrent que la majorité des souches de *Staphylococcus* spp isolées d'industrie laitière sont hydrophobes 9 (47.36%), les souches moyennement hydrophobes sont 8(42.10%) et enfin 2(10.52%) souches sont hydrophiles.

Ciccio et al. (2014) ont démontré que : parmi les 67 souches de *Staphylococcus* spp testées à 37°C (64,1 %) sont des souches hautement hydrophobes, (31,3 %) des souches modérément hydrophobes et (4.4 %) sont des souches hydrophiles.

Mamo et al. (1987) ont trouvés 33% souches de *S. aureus* isolées de mastite bovine sont hydrophobes ,28 % étaient modérément hydrophobes et 26 % étaient hydrophiles.

Les résultats obtenus dans cette étude sur l'affinité pour l'hexadécane des souches de *Staphylococcus* spp montrent que nos isolats présentent des valeurs similaires ou légèrement plus faibles que celles citées dans des travaux antérieurs.

La comparaison des résultats de la technique RCA, la technique TM et la technique MATH permet d'observer que :

*02 souches sont productrices du Slime , formatrice de biofilm sont hydrophobes , 02 souches productrice du Slime, bonne formatrices de biofilm sont hydrophiles et une (01) souche formatrice de biofilm par la technique TM hydrophobe.

*09 souches avec une production intermédiaire de biofilm par la méthode TM sont hydrophobes Parmi les 09 souches 08 avec une production intermédiaire de Slime.

*07 souches non productrices du Slime sont hydrophobes. Parmi les 07 souches il y a 05 non formateurs de biofilm par méthode TM.

D'après ces résultats on n'a trouvé qu'il ya une relation entre la technique RCA et la technique MATH et entre la technique RCA et la technique TM, mais il n'y a pas relation entre la technique MATH et la technique TM.

II.4. Evaluation de formation de biofilm sur l'acier inoxydable :

Les résultats montrant l'intensité de l'adhésion des cellules de *Staphylococcus spp* sur l'acier inoxydable (**Voire figure N°10**). Le nombre maximum d'adhésion des cellules viables a été de l'ordre de $5,80 \times 10^6$ UFC/cm² et un nombre minimum de $1,2 \times 10^5$ UFC/cm².

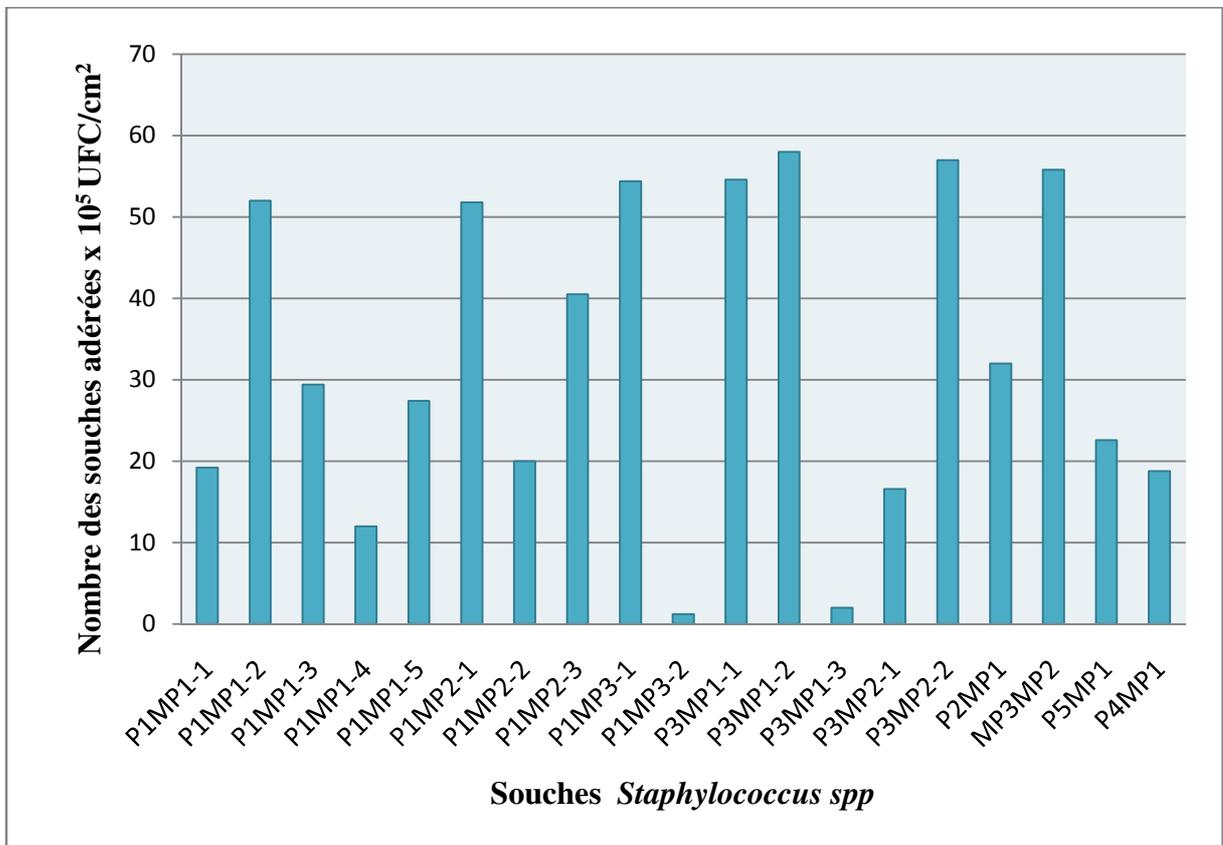


Figure n°10: Evaluation de la formation de biofilm par les souches *Staphylococcus spp* sur l'acier inoxydable.

La comparaison des résultats de la technique RCA, la technique TM et la technique d'adhésion sur acier inoxydable permet d'observer que :

*02 souches sont productrices du Slime, hydrophobes, formatrice de biofilm par la technique TM et une forte formation de biofilm sur l'acier inoxydable, 02 souches productrice du Slime, bonne formatrices de biofilm, hydrophile avec une faible formation de biofilm sur acier inoxydable et une (01) souche formatrice de biofilm par la technique TM, hydrophobe et bonne formatrice du biofilm sur l'acier inoxydable.

*09 souches avec une production intermédiaire de biofilm par la méthode TM, hydrophobes et bonne formatrices de biofilm sur l'acier inoxydable. Parmi les 09 souches 08 avec une production intermédiaire de Slime.

*07 souches non productrices du Slime, hydrophobes avec une bonne formation de biofilm sur l'acier inoxydable. Parmi les 07 souches il y a 05 non formateurs de biofilm par méthode TM.

D'après les résultats obtenus on peut dire qu'il y a une relation entre la production de Slime, l'hydrophobicité et la formation de biofilm soit sur le verre ou sur l'acier inoxydable.

Heloísa et al. (2012) ont montré que la formation de biofilm sur l'acier inoxydable par *S. aureus* isolé des usines de transformation des aliments avec un taux de 10^8 CFU/cm².

D'après **Oliveira. (2014)** 42 % des 31 souches de *S. aureus* isolées d'environnements de traite étaient productrices de biofilm sur l'acier inoxydable.

Il a été constaté que la cause d'une importante crise au Japon en 2000, qui a touché plus de 13 000 personnes, a été la production d'une toxine thermorésistants par la bactérie *S. aureus* survivre dans les canalisations d'une usine laitière (**Asao et al., 2003**).

Marques et al. (2007) ont étudié la formation de biofilm par *S. aureus* isolées de services alimentaires sur les surfaces en verre et en acier. Le nombre des bactéries était de l'ordre de 10^7 et 10^8 UFC/cm², respectivement, après 15 jours d'incubation.

Evandro et al. (2014) on montré que la formation de biofilm sur l'acier inoxydable par *S. aureus* isolé de services alimentaires était avec un taux de 10^7 UFC/cm².

Tsuneda et al. (2003) indiqué que Le nombre de *S. aureus* ont adhéré sur la surfaces d'acier inoxydable plus de 72 h d'incubation à 7 et 28 °C avec un taux de 10^5 à 10^6 UFC/cm².

Azelmad *et al.* (2015) montré que le nombre des souches des *S.aureus isolées* d'usines laitière adhéraient sur l'acier inoxydable avec une charge de $3,02.10^7$ UFC/cm².

Certaines études ont constaté que la formation de biofilm sur des surfaces hydrophobes est produite dans une plus grande mesure que sur des surfaces hydrophile (**Cerca *et al.*, 2005 ; Pagedar *et al.*, 2010**).

les bactéries à caractère hydrophobe préfèrent adhérer aux surfaces hydrophobes et que les bactéries à caractère hydrophile préfèrent adhérer aux surfaces hydrophiles (**Katsikogianni et Missirlis, 2004 ; Costa *et al.*, 2006; Hamadi *et al.*, 2009 ; Treter et Macedo, 2011**).

Ils ont trouvé qu'il y a une corrélation positive entre l'hydrophobicité et l'adhérence bactérienne (**Hamadi *et al.*, 2005; Henriques *et al.*, 2004 ; Hamadi *et al.*, 2008; Sliva *et al.*, 2008**). Nos résultats sont également en accord avec cette étude.

D'autres chercheurs n'ont pas été établit une relation entre l'adhérence bactérienne et propriétés physico-chimiques (hydrophobicité) (**Flit *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006 ;Teixeira *et al.*, 2007**)

Ils ont constatées que l'adhésion bactérienne est inhibée ou réduit par le pré conditionnement avec du lait entier ou composants du lait (protéines) (**Helke *et al.*, 1993 ; Almakhlafi *et al.*, 1995 ; Wong, 1998 ; Barnes *et al.*, 1999 ; Flit *et al.*, 2001 ; Pakar *et al.*, 2001 ; Rubio *et al.*, 2002**).

Toutefois, en présence de protéines de lactosérum, il y a une augmentation de l'attachement de plusieurs micro-organismes de lait sur l'acier inoxydable, caoutchouc et surfaces en verre a été observés par **Speers et Gilmour, (1985)**.

Conclusion

Conclusion

La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *Staphylococcus spp.*

La formation de biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments constitue un risque accru de contamination du produit, puisque les bactéries au sein du biofilm sont plus résistantes aux désinfectants et à d'autres stress environnementaux, et cela peut conduire à des problèmes d'hygiène alimentaire.

Dan cette étude, la capacité des souches de *Staphylococcus spp* a formé du biofilm à été évalué par les méthodes suivantes : Rouges Congo Agar (RCA), méthode en tube (TM), la technique MATH et l'étude d'adhésion des souches a l'acier inoxydable.

La production de Slime sur milieu rouge Congo Agar a révélé que 04 souches sont productrices de Slime, 08 souches avec une production intermédiaire et 07 souches non productrice du Slime. Selon la technique TM, 5 souches ont été fortement formatrices du biofilm, 09 souches étaient modérément et 05 souches ont été non formatrices du biofilm

Pour la technique MATH, 09 souches sont hydrophobes, 08 moyennement hydrophobes et 02 souches hydrophiles. L'étude d'adhésion sur l'acier inoxydable le nombre maximum des cellules viables a été de l'ordre de $5,80 \times 10^6$ UFC/cm² et un nombre minimum de $1,2 \times 10^5$ UFC/cm².

La comparaison des résultats de la technique RCA, la technique TM et la technique d'adhésion sur acier inoxydable permet d'observer que :

*02 souches sont productrices du Slime , hydrophobe ,formatrice de biofilm par la technique TM et une forte formation de biofilm sur l'acier inoxydable , 02 souches productrice du Slime, bonne formatrices de biofilm, hydrophile avec une faible formation de biofilm sur acier inoxydable et une (01) souche formatrice de biofilm par la technique TM, hydrophobe et bonne formatrice du biofilm sur l'acier inoxydable.

*09 souches avec une production intermédiaire de biofilm par la méthode TM, hydrophobes et bonne formatrices de biofilm sur l'acier inoxydable. Parmi les 09 souches 08 avec une production intermédiaire de Slime.

*07 souches non productrices du Slime, hydrophobes avec une bonne formation de biofilm sur l'acier inoxydable. Parmi les 07 souches il y a 05 non formatrices de biofilm par méthode TM.

D'après les résultats obtenus on peut dire qu'il y a une relation entre la production de Slime, l'hydrophobicité et la formation de biofilm soit sur le verre soit sur l'acier inoxydable.

Afin de minimiser le risque de formation de biofilm et d'intoxication alimentaire due à la présence des bactéries qui ont été présentes au niveau du biofilm et deviennent présentes au niveau de l'aliment, il serait intéressant d'explorer des techniques qui permettent d'inhiber l'adhésion bactérienne sur la surface qui est en contact avec les aliments. Cela serait également une voie à prospecter.

Références

Bibliographiques

Liste des références:

A

Agarwal S., Sharma K., Swanson B. G., Yuksel G. U., Clark S. 2006. Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **89**:1452-1466.

Ashraf M. A., Ullah S., Ahmad I., Qureshi A. K., Balkhair K. S., Abdur Rehman M. 2014. Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. *J. Sci. Food Agric.* **94**:388-403.

Alcaraz L.E., Satorres S.E., Lucero R.M. and Centrorbi O.N.P. 2003. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz. J. Microbiol.* **34** (1), 45-51.

Allion A.2004. Mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Thèse de Doctorat l'ENSIA sciences alimentaires.

Al-Makhlafi, H., Mcguire, J., et Daeschel, M. 1994. Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 3560-3565.

Alnnasouri M. 2010. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat en génie des procédés et des produits. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do!, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.

Anwar H., Dasgupta M., Costerton J. W. 1990. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2043–2046.

Arciola C.R, An Y.H, Campoccia D. 2005. Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int. J.Artif. Organs.* **28**: 1091- 1100]

Références bibliographiques

Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L.2015: Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:7. eCollection 2015.

Azelmad .K , Hamadi .F , Mimouni .R , Amzil. K , Latrache.H , Mabrouki. M , El Boulani .A.2016 .Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus xylosus* to materials commonly found in catering and domestic kitchens , *food control*,07-44, 156–163.

B

Balaban N, Rasooly A.2000. Staphylococcal enterotoxins.*Int J Food Microbiol.* 1;61(1):1-10.

Barnes L. M., Lo M. F., Adams M. R., Chamberlain A. H. L.1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4543-4548.

Bayouhd S., Othmane A., Bettaieb F., Bakhrouf A., Ben Ouada H., Ponsonnet L. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering.* 26:300-305.

Behlou I ..., Gilmore M. S.2008.Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases.*Arch Ophthalmol* 126,1572-1581.

Belmar-Beney M .T., Fryer P.J. 1992. Bulk and surface effects on the initial stages of whey fouling. *Food and Bioproducts Processing.* 70: 193-199.

Beloin C.,Roux A., Svanborg C.2008 .Echerichia coli, biofilms.*Curr Top Microbiol Immunol* 322,249-289.

Beloin C., Ghico J. M. 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 16–19. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.008.

Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J. 2003. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology.* 59(11): 3973-3977.

Berg J.D., Matin A., Roberts P. V. 1982. Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 814–818.

Références bibliographiques

Block J.C, Haudidier K, Paquin J.L, Miazga J., Levi Y. 1993. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems, *Biofouling*, 6: 333-343.

Bos R., Van der Mei H. C., Busscher J. H. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*. 23:179-230.

Bosgiraud C. 2003. Microbiologie générale et santé. Edition ESKA.

Bourion F. 1995. Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bimicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua*, thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, France.200p.

Boutaleb N.2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud UFR science et science de l'ingénieur. 194 p.

Boyd R. D., Cole D., Rowe D., Verran J., Coultas S. J., Paul A. J., West R. H., Goddard D. T. 2000. Biofouling in Food Processing: Biofilm or Biotransfer Potential? *J Adhes Sci Technol*. **14**: 1195–1201.

Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J. 2006. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol*. **106**: 254–262.

Briandet R. 1999. Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms. Aspects physico-chimiques, Thèse de Docteur de l'ENSAR - Mention Physico-chimie et Qualité des Bioproduits, Rennes, France.

C

Cappello S., Guglielmino P. P. 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 205-207.

Carpentier B., Cerf O. 1993. A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol*. **75**: 499–511.

Références bibliographiques

Cerf O. 2002. Risques bactériens liés aux produits laitiers. *Revue Française des Laboratoires*. 2002:67-69.

Characklis W.G., Bryers J.D., Trulear M. G., Zilver N. 1980. Biofouling film development and its effects on energy losses: a laboratory study. In *Condenser Biofouling Control* (Edited by Garey J F et al) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.

Characklis W.G, Marshall K.C. 1990. Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachy E.H. 1982. Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* 37: 318-326.

Cicalini S., Palmieri F., Petrosillo N. 2004. Clinical review: new technologies for prevention of intravascular catheter-related infections. *Crit. Care* .8:157–162.

Ciftci A, Findik A, Onuk E. E., Savasan S .2009. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Braz. J. Microbiol.* 40:254-261.

Corbière Morot-Bizot S. 2006. Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de doctorat : Université d'Auvergne, école doctorale des sciences de la vie et de la sante.133 P

Costa G.F.D.M., Tognim M.C.B., Cardoso C.L., Carrara-Marrone F.E., Garcia L.B.2006. *Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of Acinetobacter baumannii strains isolated from catheter tips. Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 10: 346-351.

Costerton J. W., Lappin-Scott H. M. 1989. Behavior of bacteria in biofilms. *Am. Soc. Microbiol. News.* 55: 650–654.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.

Costerton J.W, Stewart P.S, Greenberg E.P.1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318-1322

Références bibliographiques

Couture B. 1990. Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.

D

Das J. R., Bhakoo M., Jones M.V., Gilbert P. 1998. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 852–858.

Davido B. 2010. Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré. Thèse de doctorat : Université Denis Diderot (Paris VII) Faculté de médecine Paris 7. 61p.

De Chalvet De Rochemonteix A. 2009. Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.

Di Ciccio P., Vergara A., Festino A.R., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A. 2014. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell. *Food Control* .10(048) : 933.

Didouh N. 2015 Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. Université Abou –Bekr Belkaid –Tlemcen.

Donlan R.M, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.*15: 167- 193.

Dumas C. 2007. Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? .*Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 155–166.

Références bibliographiques

E

El Kouir D. P. 2003. Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC, maladies infectieuses* , [8-007-A-10].

Espinasse F., Page B., Cottard-Bouelle,B.2010.Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires* 426,51-63.

Evandro .L .S, Quênia. G. S. M,¹ Isabella M. B, Ana. J, Maria .L. C, José P .S.J 2014, Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers , *Braz J Microbiol* ,45(1): 67–75.

F

Faille C., Bénézech T., Blel W., Ronse A., Ronse G., Clarisse M., Slomianny C. 2013. Role of mechanical vs. chemical action in the removal of adherent *Bacillus* spores during CIP procedures. *Food. Microbiol* .33: 149-157

Fauchere J.L. and Avril J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213- 217.

Figarella, J. L. 2004. *Microbiologie générale et appliquée*. Paris: DELAGRAVE.

Filloux A., Vallet I. 2003.risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.*Med Sci (Paris)* 19, 77-83.

Fletcher M .1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*. 170: 2027-2030.

Flint S., Plamer J., Bloemen K., Brooks J., Crawford R. 2001. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 151-157.

Folkesson A., Haagenen J. A. J., Zampaloni C., Sternberg C., Molin S. 2008. Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides|, *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11

Fournaud J., Graffino G., Rosset R., Jacque R. 1978. I nd. Alim. Agric. 273-282.

Références bibliographiques

Fox L.K, Zadoks R.N, Gaskins C.T.2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with Intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107:295-299.

Fratamico P. M., Annous B. A., Guenther N. W. 2009. *Biofilms in the Food and Beverage Industries.* Oxford; Cambridge; Philadelphia; New Delhi: Woodhead Publishing Limited.

Frank J. F., Koffi R. A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* **53**: 550-554.

Frank J.F. 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research.* 43: 319-369.

Freeman D.J., Falkiner FR., Keane CT. 1989. New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology.* 42: 87-84.

Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Sakurai N., Fukuyasu T. 2006. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet. Res.* 2:4. doi: 10.1186/1746-6148-2-4

Furukawa S., Akiyoshi Y., O'Toole G .A., Ogihara H., Morinaga Y. 2009. Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **138**: 179-180.

.

G

Gentry H., Cope S. 2005. Using silver to reduce catheter-associated urinary tract infections. *Nurs. Stand.* **19**:51–54.

Goller C.C, Romeo T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 322: 37- 66

Gram L., Bagge-Ravn D., Ng Y. Y., Gyomai P., Vogel B. F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* **18**: 1165–1171.

Références bibliographiques

Gundogan N, Citak S, Turan E .2006. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. *Food Cont.* 17:389-392.

H

Hadjiev D., Dimitrov D., Martinov M., Sire O. 2007. Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme . Microbial Technol.* **40**: 840–848.

Hall-stoodley L., Stoodley P.2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.***11**, 1034-1043.

Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. 2004. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology.* 54:213-225.

Hamadi F., Latrache H. 2005. “Comparison of Contact Angle Measurement and Microbial Adhesion to Solvents for Assaying Electron Donor-Electron Acceptor (Acid- Base) Properties of Bacterial Surface,” *Colloids and Sur- faces B: Biointerfaces*, Vol. 65, No. 1, 2005 pp. 134-139.

Hamilton W.A. 1987. Biofilms: microbial interactions and metabolic activities, in *Ecology of Microbial Communities*, Fletcher M, Gray TR, and Jones JG, Eds., Oxford University Press, Oxford, 361.

Hashimoto H. 2001. Evaluation of the anti-biofilm effect of a new antibacterial silver citrate/lecithin coating in an in-vitro experimental system using a modified robins device. *J. Jp. Assoc. Inf. Dis.* **75**: 678–685.

Helke D.M., Somers E.B., Wong A.C.I. 1993. Attachment of listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*, 56, 479-484

Heloísa M., Ângelo J., Rita D. C., Eglypto Queiroga, Ana C., Vieira D. C, Isabella M. B., Maria L d .C., Evandro L.2012. Adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food processing plants as affected by growth medium, surface type and incubation temperature *Journal of Pharmaceutical Sciences* , n. 4,P 742.

Références bibliographiques

Henerici A. T. 1932. Studies of freshwater bacteria i. a direct microscopic technique, *Journal of bacteriology*, **25**.

Hennekinne J. 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi infections alimentaires a staphylocoques a coagulase positive. Thèse de doctorat : de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).183p.

Henriques M., Azeredo J., et Oliveira R. 2004. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **33**, 235–241.

Herrera J. J. R., Cabo M. L., Gonzalez A., Pazos I., Pastoriza L. 2007. Adhesion and detachment kinetics of several strains of strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food. Microbiol.* **24**: 585–591.

Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. J., Moser C., Jensen P., Bjarnsholt T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65.

Hornstra L. M., Leeuw P. L. A., Moezelaar R., Wolbert E. J., de Vries Y. P., de Vos Abee T. 2007. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 367–371.

J

Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L., Shitiliff M.E. 2008. Complicated Catheter-associated urinary tract infectious due to *E. coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* **21**, 26-59.

Jain A, Agarwal A. 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiology and Methods.* **76**: 88–92.

Jain A., Marsili E., Bhosle N. B. 2011. The Biofilm Returns: Microbial Life at the Interface, *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85.

Références bibliographiques

Jana T.K., Srivastava A.K., Csery K., Arora D.K. 2000. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in nonspecific adhesion. *Can. J. Microbiol.* 46: 28–37.

Jones J. G., Pickup R.W. 1989. The effect of organic carbon supply in water on the antibiotic resistance of bacteria. *Aqua.* 33: 131–135.

Jones S.M, Morgan M, Humphrey T.J. 2001. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet*, 357: 40- 41.

Joshi P., Wadhvani T., Bahaley P., Kothari V. 2010. Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing, *The IUP Journal of Life Sciences.* Vol. 4 No. 1, pp. 59-72.

Jullien C., Bénézech T., Carpentier B., Leuret V., Faillie C. 2003. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *J. Food. Eng.* 56: 77-87

K

Klueh U., Wagner V., Kelly S., Johnson A., Bryers J. D. 2000. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J. Biomed. Mater Res.* 53: 621–631.

Kloos W.E., Veron M. 1990. Bactériologie Médicale «*Staphylococcus et Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.

Krukowski H., Szymankiewicz M., Lisowski A. 2008. Slime production by *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis *Pol. J. Microbiol.* 57 (3):253-255.

L

Lechevallier M. W., Cawthon C. D., Lee R. G. 1998. Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:649-654.

Lee S. H., Frank J. F. 1991. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes*. Hypochlorite and heat. *J. Food Prot.* 54: 4–6.

Références bibliographiques

Leyral G, Vierling E. 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4^{ème} éditions. France : Editions Doin, 287p

Le Loir Y., Baron F., Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar 31;2(1):63-76.

Lelievre C., Antonini G., Faille C., Benezech T. 2002. Cleaning-in-place— modelling of cleaning kinetics of pipes soiled by bacillus spores assuming a process combining removal and deposition. Food Bioprod. Process. **80**: 305– 311.

Lister J.L., Horswill A.R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, **4**,178.

Lui A., Maniglio D., Brugnara M., Anderle M. 2004. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. Biomater. **25**: 2029– 2037.

M

Macfarlane S., Dillon J. F. 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* ; 102:1187-1196.

Mamo W., Rozgonyi F., Brown A., Hjertén S., Wadström T. 1987. Cell surface hydrophobicity and charge of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Appl Bacteriol.* 62(3):241-9.

Marchal M. 2010. Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat En aspects moléculaire et cellulaires de la biologie. Université de Strasbourg, France.

Martinez L.R., Casadevall A. 2007. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology.* 4592- 4601.

Références bibliographiques

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-29

Mattila-Sandholm T., Wirtanen G. 1992. Biofilm formation in the industry: A Review. *Food Rev. Inter.* **8**: 573-603.

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-29

Miller M.B., Bassler B.L.2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, **55**, 165-199

Muatapha A., Liewen M. B. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.* **52**: 306-311.

N

Nasr S.A., AbuShady H. M., Hussein H.S. 2012. Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 1110-8630.

Nehal M., Zuel - Fakkar M.D., Mona H.,El. Shokry M.D.2010 Study of Erythroderma and psoriasis Exacerbation by staphylococcal superantigene.j. *Egypt women Dermatol.soc.*7,113-117.

Nitschke M.,Costa S.G.V.A.O.2007.Biosurfactants in food industry. *Food science and Technologie.* **18**: 225-259.

Nobbs A. H., Lamount R. J., Jenkinson H. 2009. Streptococcus adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73 No. 3, pp. 407-505.

O

Ogston A. 1882. *Micrococcus* poisoning. *J Anat.* **17**: 24-58.

Références bibliographiques

Oliveria K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M., Oliveira R. 2006. Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella Enteritidis* Serotypes to materials 317 used in Kitchens. *Journal of food Protection*, 69, 2352-2356.

Ophir T., Gutnick D.L. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60 (2)**: 740-745.

O'Toole G. A., Kaplan H.B., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*. 54: 49- 79.

Otto M .2008 Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 207- 228.

Otto M. 2012. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinant of pathogenicity. *Review of Medicine*. 64:1-14.

P

Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 577–588.

Pan J., Ren D.2009. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2009, 19, 1581-1601

Pakar S.G., Flint S.H., Palmer J.S., Brooks J.D. 2001. Factors influencing attachment of *thermophilic bacilli* to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 901-908.

Park A. I., Daeschel M. A., Zhao Y. 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J. Food. Saf.* **69**: 215–221.

Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 11–18.

Références bibliographiques

Poulsen L. V. 1999. Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **32**: 321-326.

Pratt L. A., Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia Coli* biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285-293.

R

Rassoni E.M.M., Gaylarde C. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol.*,61(1), 81-85.

Rosenbach F.J. 1884. *Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen, Wiesbaden.*

Rosenberg M., Gutnick G., Rosenberg E .1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters.* 9:29-33.

Rosmaninho R., Santos O., Nylander T., Paulsson M., Muller-Steinhagen H., Melo L. 2007. Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – evaluation of fouling by milk components. *J. Food. Eng.* **80**: 1176–1187.

Rubio C., Costa D., Bellon-Fontaine M.N., Relkin P., Pradier C.M., Marcus P. 2002. Characterisation of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the *Pseudomonas Fragi* K1 adhesion. *Colloids and surfaces B*, 24, 332 193-205.

Ruzicka F., Hola V., Votava M.2004. Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* **2004**;49(5):596-600.

S

Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. 2009. Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science.* 14: 65-68.

Références bibliographiques

Salaun S. 2009. Interaction entre la macroalgue brune *Laminaria Digitata* et ses epibiontes bactériens : étude moléculaire et spectroscopique et capacité d'adhésion et formation de biofilm. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud. 265P.

Sheng X. X., Ting Y. P., Pehkonen S. O. 2007. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. *J. Colloid. Interface. Sci.* **310**: 661–669.

Simões M., Bennett R. N., Rosa E. A. S. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports.* **26**: 746–757.

Simões M., Simões L. C., Machado I., Pereira M. O., Vieira M. J. 2006. Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing.* **84**: 338–345.

Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* **417**: 552–555.

Spormann A.M. 2008. Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 5208- 5218.

Speers J.G.S., Gilmour A. 1985. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *Journal of Applied Microbiology,* 325-332.

Speranza G., Gottardi G., Pederzoli C., Lunelli L., Canteri R., Pasquardini L., Carli E., Lui A., Maniglio D., Brugnara M., Anderle M. 2004. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomater.* **25**: 2029– 2037.

Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods.* 40: 175–179.

Sutherland I. W. 2001. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology.* 9: 222–227.

Références bibliographiques

T

Talaro, Kathleen, Park .2008, *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York.

Tenke,P.Kovacs,B.,Jackel,M.et Nagy,E.(2006).The role of biofilm infection in urology.World J Urol 24,13-20.

Teixeira P., Silva S., Araújo F., Azeredo J., Oliveira R. 2007. Bacterial Adhesion to Food Contacting Surfaces. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pp 13-20.

Trautner B.W., Darouiche R.O.2004.catheter-associated infection.pathogenesis affects prevention.Arch Intern Med 164-842-850.

Tremblay Y.D., Hathroubi S. Jacques M.2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.*, 2014, **78**, 110– 116.

V

Vasudevan P., Nair M.K.M., Annamali T., Venkitanarayanan K.S.2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92:179-185.

Vidal D. R., Ragot C., Thibault F. 1997. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* **55**: 49–54.

Vieira M. J., Melo L., Pinheiro M. M. 1993. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling.* **7**: 67–80.

Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P. 2009. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.

W

Références bibliographiques

Weng Y. M., Chen M. J., Chen W. 1999. Antimicrobial food packing materials from poly(ethylene-co-methacrylic acid). *LWT – Food. Sci. Technol.* **32**: 191–195.

Wilson D. I. 2005. Challenges in cleaning: recent developments and future prospects. *Heat Transfer Engineering.* **26**: 51–59.

Whitehead K. A., Collington J. S., Verran J. 2004. The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.* **54**: 143–151.

Whitehead K. A., Collington J., Verran J. 2005. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **41**: 129–138.

Wirtanen G., Mattila-Sandholm T. 1992. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **25**: 50–54.

Wirthlin M. R., Chen P. K., Hoover C. I. 2005. A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. *J. Periodontology.* **9**: 1443–1449.

Wong A.C.I. 1998. Biofilm in food processing environments. *Journal Dairy Science,* **81**,2765–2770.

Y

Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* **78**:110-116.

Z

Zhang S., Iandolo j.j., Stewart G.C.1998.The enterotoxin D plasmid of staphylococcus aureus encod second enterotoxin ,determinant(sej).*FEMS Microbial. Lett.*168,227-223

Zhao Q., Liu Y.2006. Modification of stainless steel surfaces by electroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion. *J. Food. Eng.* **72**: 266–272.

Références bibliographiques

Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. 2001. Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.

Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:125-148.

ANNEXES

Annexe

Milieux de culture

1-Milieu de Chapman :

Composition:

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g
pH=7,6	

Préparation : 111g par litre d'eau distillée. stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

2. Bouillon cœur-cervelle (BHIB) :

Composition :

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5.0g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g
Phosphate disodique.....	5.0g
Eau distillé.....	1L
pH= 7.4	

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

3. Bouillon nutritif

Composition :

Peptone	15,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Chlorure de sodium	6,0 g
D(-) glucose.....	1,0g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,2 ± 0,2.

4. Rouge Congo Agar :

Composition :

Saccharose.....	50g
B HIB.....	37g
Rouge Congo.....	0.8g
Agar	10g
Eaux distillée.....	1000ml

5. Bouillon TSE (tryptone sel eau) :

Composition :

Tween.....	0.2g
Tryptone	1 g
Chlorure de sodium	8.5 g
Eau distillée	1000ml

6. Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) à 0,1M, pH= 7,2± 2 :

Composition :

KH ₂ PO ₄	0,29 g
K ₂ HPO ₄	1,19 g
NaCl	4,93 g

Dans un litre d'eau distillée. Eau distillée (qsp) 1 L

7. Cristal Violet :

Composition :

Cristal violet.....	2g
Eau distillée.....	100ml