

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement Faculté**

**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 biologiques**  
**Mémoire de fin d'étude**  
**En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en sciences biologiques**  
**Spécialité: Microbiologie Appliquée**

**Thème :**

**Evaluation de la capacité des bactéries isolées d'une usine  
laitière lors d'une saison chaude laitière à former des  
biofilms**

**Présenté par :**  
**Djalab sara**  
**Ben akil bouchra**

**Devant le jury :**

**Melle Lattab**  
**Mr Achek. R**  
**Mme DIDOUH N**

**MAB**  
**MCB**  
**MCB**

**Présidente**  
**Examineur**  
**Promotrice**

**UDB Khemis miliana**  
**UDB Khemis miliana**  
**UDB Khemis miliana**

**Année universitaire : 2019/2020**

## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions notre créateur « Allah » tout puissant qui nous avoir, donné la force, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail et arriver à ce stade scientifique.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Madame **NASSIMA DIDOUH**, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par :*

***M<sup>elle</sup> Lattab** pour avoir accepté de présider notre jury et consacré de son temps à la lecture de notre mémoire pour y apporter les meilleurs perfectionnements.*

***Mr Achek R** pour d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Un grand merci à l'équipe de l'université Djilali Bounaama **KHMIS MILIANA** et un spécial merci au responsable de laboratoire Microbiologie **Aicha, Afef**, pour nous avoir soutenus et encouragés tout le long de notre travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs et enseignants du département de Microbiologie Appliquée de l'université Djilali Bounaama **KHMIS MILIANA**, qui n'ont ménagé aucun effort pour nous avoir permis d'acquérir toutes ces connaissances durant les cinq ans de notre formation.*

*On tient à remercier nos parents sans eux on ne serait pas là, merci pour votre soutien le long de la route, merci de nous avoir encouragés et de nous avoir poussés à montrer notre mieux.*

*On tient à remercier tous nos amis pour leur support et leur encouragement spécialement **Bouchra et Meriem**.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

*Merci à toutes et à tous.*

# *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut,  
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude l'amour,*

*Le respect, la reconnaissance...*

*Je commence ma dédicace au nom du dieu et le salut sur Mohamed le messager de dieu.  
J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :*

*A mes parents,*

*Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre amour et vos sacrifices. **Maman, Papa** merci d'être la lumière dans ma vie, les étoiles de mon ciel je vous aime infiniment.*

*A mes chères soeurs **Loubna** et **Fethia**, pour leurs disponibilités, leurs soutiens moral, leurs encouragements incessants et pour leurs compréhension, et surtout leur amours.*

*A mes frère **Mostapha El Amin** et **Mohammed Islam**, pour leur appui et leur encouragement, que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.*

*A toute la famille **BEN AKIL** et **TEURKIA** de près et de loin, un spéciale merci de votre soutien sans faille..*

*Spéciale dédicace à mon binôme et ma partenaire dans ce Mémoire :**SARA** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*A tous mes camarades de promotion de master II Microbiologie Appliquée.*

*A tous ceux qui m'a appris un mot et à tous ceux qui ont sacrifié leur temps pour savoir et pour sauver les autres.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin.*

**BOUCHRA**

# *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut,  
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude l'amour,  
Le respect, la reconnaissance...*

*Avant tout, je remercie premièrement Dieu tout Puissant, de m'avoir donné la force, le courage et la volonté durant tout mon cursus des études et d'avoir réalisé mon travail.*

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :*

*A ma plus belle étoile **ma mère ZAHIA** , qui m'a accompagnée durant les moments les plus dures de ce long parcours de mon éducation, celle qui a fait preuve d'aide dans mes nombreux projets pour me permettre de goûter le fardeau de ce monde et de chercher la voie de ma vie avec ces précieux conseils.*

*Au plus beau et le plus bon de tous les Pères, **mon père LARBI** qui a sacrifié sa vie afin de me voir grandir et réussir et pour que je puisse franchir toutes mes années d'études, Que dieu me le garde en très bonne Santé.*

*A mes chères soeurs **FELLA et INES** et ma nièce **ISRAA**, pour leurs disponibilités, leurs soutiens moral, leurs encouragements incessants et pour leurs compréhension, et surtout leur amours.*

*A l'unique frère que j'ai au monde **RIADH**, que dieu le protège.*

*A ma cousine **IMANE FERHAT***

*A toute la famille **DJALAB ET FERHAT** de près et de loin, un spéciale merci de votre soutien sans faille..*

*A toutes mes copines et surtout **IMANE , MARWA , CHERIFA , KAWTHER.***

*Spécialement à mon binôme et ma partenaire dans ce Mémoire : **BOUCHRA** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail*

*A tous mes camarades de promotion de master II Microbiologie Appliquée.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin.*

**SARA**

## Table des matières :

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

<b>Introduction générale :</b> .....	1
<b>Partie I : Synthèse bibliographique :</b> .....	3
I.1 .Historique:.....	3
2 .Définition: .....	4
3. Les étapes de formation des biofilms .....	4
3.1 Etape 01 : Le conditionnement de la surface .....	5
3.2 Etape 02 : transport des cellules bactériennes vers la surface .....	5
3.3 Etape 03 : Adhésion réversible et adhésion irréversible .....	6
3.3.1 Adhésion primaire réversible et non spécifique .....	6
3.3.2 Adhésion permanente irréversible et spécifique .....	6
3.3.2.1 Substances polymériques extracellulaires (EPS) .....	7
3.4 Etape 04 : La maturation du biofilm .....	7
3.5 Etape 05 : Détachement des cellules .....	8
4. Communication cellulaire : Quorum Sensing .....	8
5. Composition du biofilm .....	9
6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm .....	10
6.1 Caractéristiques de la surface .....	10
6.1.1 Géométrie de la surface .....	10
6.1.2 Rugosité de la surface du support .....	10
6.1.3 Propriétés physico-chimiques de la surface .....	11
6.1.4 Présence d'un film protéique sur la surface .....	11
6.2 Influence des conditions environnementales .....	11
6.2.1 Forces hydrodynamiques d'un flux .....	11
6.2.2 La température .....	12
6.2.3 Le pH .....	12
6.2.4 Composition du milieu .....	12
6.3 Influence des propriétés bactériennes .....	13

7. Le biofilm en industrie laitière .....	14
7.1 La microflore bactérienne du biofilm en industrie laitière .....	15
8. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières .....	16
9. Elimination de biofilm .....	18
<b>Partie II : Matériel et méthodes</b> .....	20
II.1. L'identification bactérienne des isolats par la technique MALDI-TOF MS.....	20
II. 2. Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> : Méthode de culture sur microplaque (TCP) sous différents conditions .....	20
II. 2.1.Souches bactériennes et des conditions de croissance .....	21
<b>Partie III : Résultats et Discussion</b> .....	24
Conclusion et perspective .....	36
<b>Références bibliographiques</b> .....	38
Références bibliographiques .....	39
<b>ANNEXES</b> .....	54
Annexes 01 .....	54

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm. ....	3
<b>Figure 2</b> : biofilm sur les appareils du production de lait ( <b>Amgar, 2012</b> ). ....	4
<b>Figure 3</b> : Cycle de vie d'un biofilm et les facteurs influençant sa forme ( <b>Toyofuku et al., 2016</b> ). ....	5
<b>Figure 4</b> : mécanismes de détachement du biofilm ( <b>Alfred B. Cunnighram et all. ,2008</b> ). ...	8
<b>Figure 5</b> : Equipement laitiers. (A) : tanks de stockage du lait, (B) : système de canalisation (lactoducs), (C) : un échangeur thermique à plaque ( <b>Malek ,2013</b> ). ....	15
<b>Figure 6</b> : formation de biofilm en microplaque ( <b>Bellifa, 2014</b> ). ....	22
<b>Figure 7</b> : Capacité des souches bactériennes à former des biofilms dans le milieu BN à une température de 37°C. ....	29
<b>Figure 8</b> : Capacité des souches bactériennes à former des biofilms dans le milieu BN à une température de 55°C. ....	29
<b>Figure 9</b> : Capacité des souches bactériennes à former des biofilm dans le milieu TSB à une température de 37°C. ....	30
<b>Figure 10</b> : Capacité des souches bactériennes à formes de biofilm dans le milieu TSB à une température de 55°C. ....	30
<b>Figure 11</b> : répartition des souches bactériennes selon leur capacités à former des biofilms sur le polystyrène. ....	31

## **Listes des tableaux :**

<b>Tableau 1 :</b> composition d'un biofilm bactérien.( <b>Muhsin <i>et al.</i>, 2015</b> ).....	09
<b>Tableau 2 :</b> Facteurs et propriétés impliqués dans la formation de biofilm. ( <b>Donlan, 2002</b> ). 14	
<b>Tableau 3 :</b> Répartition des isolats obtenues de différents sites de prélèvement au niveau de la laiterie pendant la saison chaude. ....	23

## Liste des abréviations:

BN : Bouillon nutritif.

°C : Degré Celsius.

CIP : cleaning-in-place.

DO : Densité optique.

EPS : Extracellular polymeric substances (Exo polysaccharides).

GIPLAIT: Groupe Industriel des Production Laitières.

LPS :lipo-polysaccharides.

MALDI-TOF: Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight.

PBS : Phosphate buffered saline.

pH : Potentiel hydrogéné.

PS : Plaque polystyrène.

QS : Quorum-Sensing.

TCP : Plaque de Culture de Tissus.

TSB: bouillon tryptone soja.

UFC : Unité(s) formant colonie(s).

## Résumé :

Les biofilm laitiers comportent un écosystème microbien (microbiote) complexe qui inclut des microorganismes pathogènes ou d'altération. Ces micro-organismes indésirables sont responsables de rejet des produits, même des maladies d'origine alimentaire. Le but de cette étude est d'identifier une collection de souches isolées des canalisations post et pré pasteurisation d'une industrie laitière par la technique MALDI-TOF et d'évaluer la capacité à former un biofilm sur des surfaces en polystyrène par la technique TCP. Les 41 souches identifiées par MALDI-TOF étaient composées : *Enterobacter cloacae*(17), *Enterobacter xiangfangensis*(1), *Enterococcus faecium*(7), *Enterococcus casseliflavus*(5), *Bacillus cereus*(7), *Bacillus subtilis*(1), *Acinetobacter schindleri*(2), *Raoultella ornithinolytica*(1). L'évaluation de la capacité des souches à former le biofilm montre que 25 souches sont incapables, 11 faiblement, 03 modérément formatrices du biofilm, et 02 souches sont fortement formatrices du biofilm. L'identification de la microflore des canalisations post et pré pasteurisation présente sur les surfaces en acier inoxydable a révélé une biodiversité bactérienne. Enfin, Cette étude souligne que la connaissance des microorganismes attachés aux surfaces laitières peut aider au développement de stratégies pour améliorer les paramètres opérationnels optimaux (Temps / T C°) pour les processus de pasteurisation.

Mots clés : Biofilm, TCP, MALDI-TOF, polystyrène, pasteurisation.

## **Abstract:**

Dairy biofilms have a complex microbial ecosystem (microbiota) that includes pathogenic or spoilage microorganisms. These unwanted microorganisms are responsible for product rejection, even food borne illnesses. The aim of this study is to identify a collection of strains isolated from post and pre-pasteurization pipelines of a dairy industry by the MALDI-TOF technique and to assess the ability to form a biofilm on polystyrene surfaces by the TCP technique. The 41 strains identified by MALDI-TOF consisted of: *Enterobacter cloacae* (17), *Enterobacter xiangfangensis* (1), *Enterococcus faecium* (7), *Enterococcus casseliflavus* (5), *Bacillus cereus* (7), *Bacillus subtilis* (1), *Acinetobacter schindleri* (2), *Raoultella ornithinolytica* (1). The assessment of the capacity of the strains to form biofilm shows that 25 strains are incapable, 11 weakly, 03 moderately biofilm-forming, and 02 strains are strongly biofilm-forming. The identification of the microflora of the post and pre-pasteurization pipes present on the stainless steel surfaces revealed bacterial biodiversity. Finally, this study underlines that knowledge of microorganisms attached to dairy surfaces can help the development of strategies to improve the optimal operational parameters (Time / T C °) for pasteurization processes.

Keywords: Biofilm, TCP, MALDI-TOF, polystyrène, pasteurization.

## ملخص :

تحتوي الأغشية الحيوية لمنتجات الألبان على نظام بيئي ميكروبي معقد (ميكروبيوتا) يتضمن الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض أو التالفة. هذه الكائنات الدقيقة غير المرغوب فيها هي المسؤولة عن رفض المنتج ، وحتى الأمراض المنقولة بالغذاء. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد مجموعة من السلالات المعزولة من أنابيب ما بعد البسترة وما قبل البسترة في وتقييم القدرة على تكوين غشاء حيوي على أسطح البوليسترين باستخدام MALDI-TOF صناعة الألبان باستخدام تقنية TCP . تتكون السلالات 41 التي حددتها MALDI-TOF من:

*Enterobacter cloacae*(17), *Enterobacter xiangfangensis*(1) , *Enterococcus faecium*(7) , *Enterococcus casseliflavus*(5) , *Bacillus cereus*(7) , *Bacillus subtilis*(1) , *Acinetobacter schindleri*(2) , *Raoultella ornithinolytica*(1).

يُظهر تقييم قدرة السلالات على تكوين غشاء حيوي أن 25 سلالة غير قادرة ، و 11 سلالة ضعيفة ، و 03 سلالة تكون غشاء حيويًا معتدلاً ، و 02 سلالة تشكل غشاءً حيويًا بقوة. كشف تحديد البكتيريا الدقيقة لأنابيب ما بعد البسترة الموجودة على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ عن التنوع البيولوجي البكتيري. أخيرًا ، تؤكد هذه الدراسة أن معرفة الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بأسطح الألبان يمكن أن تساعد في تطوير استراتيجيات لتحسين المعلمات التشغيلية المثلى (الوقت / درجة مئوية) لعمليات البسترة.

الكلمات الرئيسية Biofilm , TCP , MALDI-TOF ، بوليسترين ، بسترة.

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**

### Introduction générale :

En industrie laitière, la contamination disséminée à partir des surfaces industrielles est largement reconnue. L'environnement des laiteries est propice au développement des biofilms. La nature des espèces qui composent ces écosystèmes microbiens est largement influencée par les conditions des processus technologique (**Malek ,2013**).

la qualité et la sécurité des produits laitiers et de réduire considérablement leur durée de conservation (**Austin et Bergeron, 1995; Chmielewski et Frank, 2003; Salustiano et al., 2009**). En raison de leur résistance aux traitements thermiques et aux agents antimicrobiens, les biofilms développés sur les chaînes de transformation laitière sont également difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection acceptables (**Bore et Langsrud, 2005; Bremer et al., 2006; Brooks et Flint, 2008**) . De plus, une recontamination bactérienne des surfaces des chaînes de transformation des aliments a été signalée à nouveau lors des procédures de nettoyage en place, en raison du phénomène de ré adhésion (**le Gentil et al., 2010**). Un problème récurrent dans l'industrie laitière est la qualité microbienne du lait pasteurisé. Ce produit est exposé à des traitements thermiques moyens qui n'assurent pas la destruction complète à la fois les bactéries d'altération et les bactéries pathogènes. Malgré l'amélioration de la technologie laitière, la contamination du lait pasteurisé, en particulier par les bactéries aérobies sporulantes, demeure une barrière biologique spécifique qui limite la durée de conservation et la qualité du produit (**Novak et al., 2005 ; Huck et al., 2007 ; Ranieri et al ., 2009**). De nombreuses études ont été menées à travers le monde pour résoudre ce problème afin de prolonger la durée de conservation du lait pasteurisé. Cependant, le facteur limitant varie d'un pays à l'autre en fonction des conditions du processus. Différentes sources potentielles de contamination du lait pasteurisé sont signalées: le lait cru (**Lin et al., 1998; Bartoszewicz et al., 2008 ; Ranieri et Boor, 2009**), les surfaces des équipements (**Sharma et Anand, 2002; Svensson et al., 2004 ; Salustiano et al., 2009**) et les matériaux d'emballage (**Simon et Hanson, 2001; Zygoura et al., 2004 ; Petrus et al., 2010**).

Ce mémoire entre dans ce contexte. Il a pour principal objectif : est d'identifier la microflore bactérienne qui contamine les canalisations pré et post-pasteurisation du lait d'une usine laitière et de déterminer la capacité de ces bactéries à former des biofilms sur des surfaces en polystyrène.

Ce mémoire est structuré en trois parties:

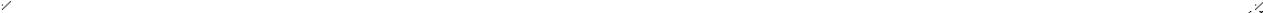
1. Une mise au point bibliographique traitant du biofilm, ses étapes de formation, les problèmes causés par le biofilm en industrie agroalimentaire ainsi que des procédés de control et d'élimination de biofilm.
2. Une partie expérimentale comprenant : l'identification d'une collection de souches isolées à partir des canalisations d'une usine laitière, et la détection de la capacité de ces souches à formé des biofilms par 02 méthodes expérimentaux : MALDI TOF , TCP .
3. La troisième partie consacrée aux résultats et discussion donne des résultats très pertinents et très clairement argumentés. Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail. Les futures recherches devraient se concentrer sur la structure ainsi que le comportement des communautés bactériennes des canalisations des usines laitières.



# Partie I



# Synthèse bibliographique



## Partie I : Synthèse bibliographique :

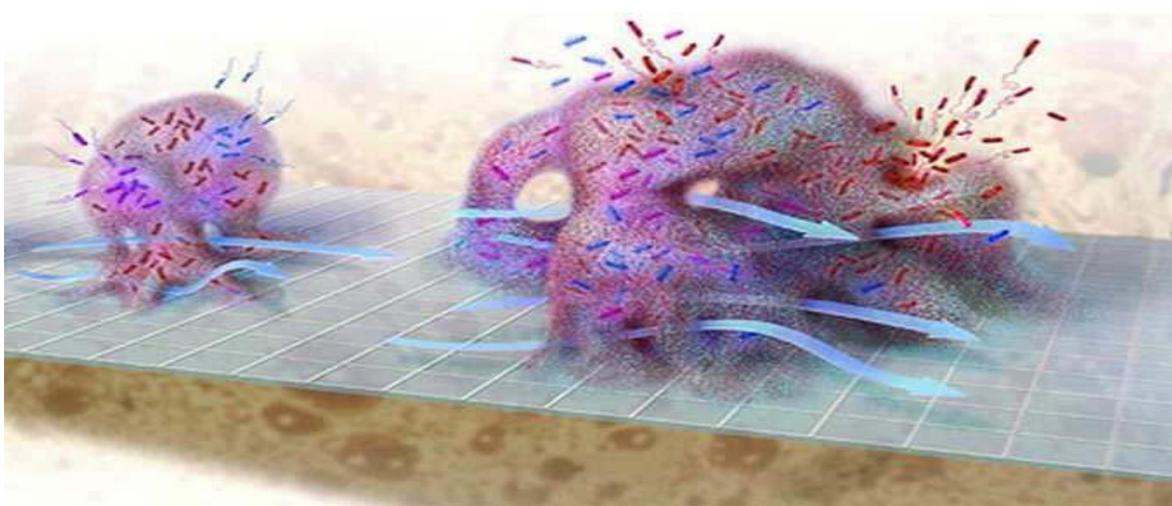
### I.1 .Historique:

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, le premier qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés microbiennes adhérentes à la surface des dents (**Roux et Chigo, 2006**).

En 1932, Henerici observa des communautés bactériennes fixées sur des lames de verre placées dans un aquarium. Selon cet auteur, la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (**Trautner *et al.*, 2009**).

En 1978, **Costerton *et al.***, ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé la théorie de «biofilms», qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique (**Branger *et al.*, 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014**).

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (**Donlan, 2002**).



**Figure 01** : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm

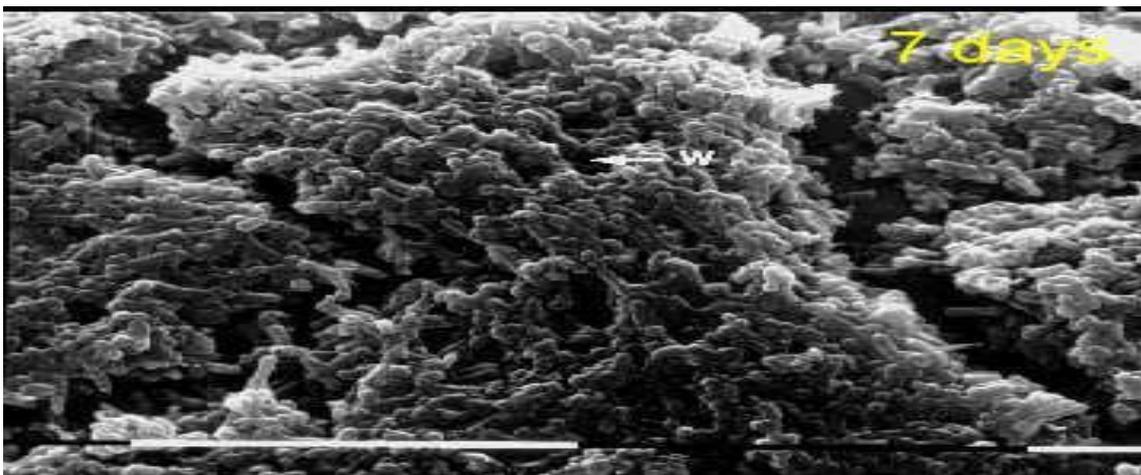
(**Rosyn ,2016**).

## 2 .Définition:

Le biofilm est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes qui forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro-colonies associées entre elle et à des surfaces biotiques ou abiotiques (Myriam , 2012). L'adhérence de ces micro-organismes à une surface est marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice qui lie fortement le biofilm à cette surface (Phillips *et al* ., 2010).

Ces surfaces peuvent prendre plusieurs formes ; minérales (roche) ou organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (Branger *et al* ., 2007; Bellifa, 2014).

Le biofilm est une structure dynamique en évolution constante, constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (Espinasse *et al* ., 2010).



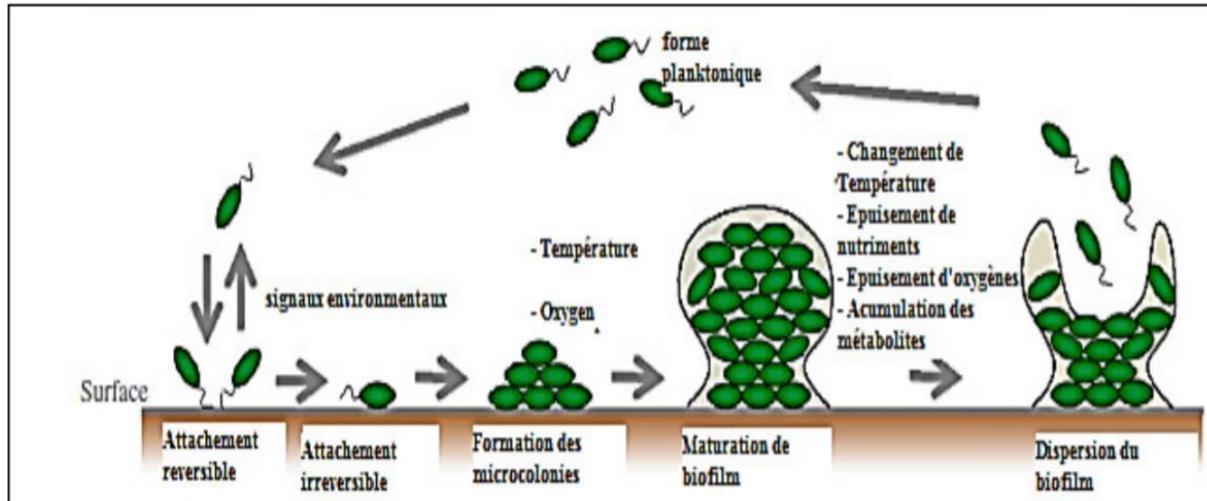
**Figure 02 :**biofilm sur les appareils du production de lait (Amgar, 2012).

## 3. Les étapes de formation des biofilms :

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 (Talaro, 2008). La formation de biofilm commence lorsque des cellules planctoniques hautement mobiles adhèrent à une surface. Les cellules subissent des changements physique qui impliquent une régulation négative de l'appareil de motilité et des

facteurs de virulence tout en régulant positivement la production d'une matrice extracellulaire riche en exopolysaccharides (Eve Maunders et Martin Welch, 2017). On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm (Talaro, 2008).



**Figure 03:** Cycle de vie d'un biofilm et les facteurs influençant sa forme (Toyofuku *et al.*, 2016).

### 3.1 Etape 01 : Le conditionnement de la surface :

Le conditionnement de surface est la première étape de la formation du biofilm, au cours de laquelle cette surface est le siège d'une adsorption spontanée de composés du milieu (molécules organiques et ions) dans les premiers instants suivant l'immersion (La Barre et Haras, 2007). Ceci conduit à la formation d'un film de conditionnement qui modifie les propriétés physico-chimiques de la surface externe du matériau en modifiant la charge nette et l'énergie libre de surface. Ce conditionnement permet d'influencer défavorablement le comportement des bactéries approchant ces surfaces, ou au contraire de créer des micro-niches favorables à l'adhésion et aux interactions spécifiques (La Barre et Haras, 2007).

### 3.2 Etape 02 : transport des cellules bactériennes vers la surface :

Le transfert des bactéries vers la surface est le résultat de phénomènes de nature physicochimique et biologique.

Plusieurs facteurs physiques peuvent expliquer ce transfert :

- les mouvements browniens ou transport diffusif.
- la sédimentation, qui est liée à la différence de gravité entre la cellule bactérienne et le fluide dans lequel elle se trouve. .

le transport convectif, dû aux caractéristiques hydrodynamiques du fluide environnant (régime statique, turbulent ou laminaire). Ce type de transport semble être particulièrement important pour l'attachement des cellules. Un régime d'écoulement turbulent favoriserait

l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre une cellule bactérienne et une surface (**Squinazi, 2013**).

Le facteur biologique prédominant dans la phase de transfert est la chimiotaxie. Ce système permet à la bactérie de reconnaître dans son environnement des substances chimiques attractives, dont les nutriments, ou répulsives et d'orienter son déplacement sur de courtes distances. L'activité flagellaire est alors modifiée de manière à orienter le déplacement bactérien vers les zones favorables (**Pratt et al., 1998**).

### **3.3 Etape 03 : Adhésion réversible et adhésion irréversible :**

#### **3.3.1 Adhésion primaire réversible et non spécifique :**

L'adhésion réversible est un phénomène au cours duquel les cellules s'adhèrent à une surface (**Madoda, 2014**) avec une intervention des mécanismes comme le chimiotactisme et la mise en place d'appendices générateurs de mouvement tels que les flagelles (**Cournet, 2010**) et elle est facilitée par les adhésines qui sont des récepteurs membranaires (**Madoda, 2014**). Ce phénomène d'adhésion microbienne aux surfaces est conditionné par un certain nombre de facteurs, y compris les espèces de bactérie, la composition de la surface des cellules, la disponibilité des éléments nutritifs,... (**Alnasouri, 2010**). Au cours de cette adhésion, les bactéries établissent des interactions faibles avec la surface conditionnée telles que les forces de Van der Waals, les forces acide-base de Lewis et les forces électrostatiques (**Planchon, 2006 ; Parot, 2007 ; Othmani, 2014 ; Madoda, 2014 ; Aye, 2015**). De nombreux facteurs environnementaux comme le pH (Potentiel d'hydrogène), la température, l'osmolarité du milieu, la viscosité et les charges ioniques vont également influencer sur cette étape (**Othmani, 2014**) qui ne dure que 4 à 10 heures selon les bactéries (**Boutaleb, 2007**).

#### **3.3.2 Adhésion permanente irréversible et spécifique :**

L'adsorption irréversible est une adhésion permanente des bactéries avec une augmentation des capacités d'ancrage et perte de motilité flagellaire (**Irimes, 2010**). Des interactions de plus fortes énergies sont mises en jeu durant cette phase qui sont les liaisons hydrogènes, les liaisons covalentes ou interactions hydrophobes fortes (**Parot, 2007 ; Othmani, 2014 ; Aye, 2015**) grâce aux macromolécules de surface bactérienne: les polysaccharides, les protéines et les lipo-polysaccharides (**Aye, 2015**). Cette phase est plus lente que la phase d'adsorption réversible (**Boutaleb, 2007**) avec production d'EPS (ExoPolymeric Substances) qui vont renforcer l'adhésion des bactéries, les protéger de l'action d'agents antimicrobiens et aussi faciliter le piégeage des éléments nutritifs indispensables pour leur croissance (**Othmani, 2014**).

Différents appendices bactériens sont nécessaires à l'adhésion des bactéries tout en n'étant pas indispensables au maintien du biofilm. Pour les bactéries à Gram-négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix et pour les bactéries à Gram-positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix (**Van Houdt et Michiels, 2005**).

Les pili de type I et les flagelles sont essentiels à l'attachement initial à la surface et les pili de type IV ont un rôle dans le déplacement de la bactérie sur la surface. (**La Barre et Haras, 2007**).

### 3.3.2.1 Substances polymériques extracellulaires (EPS) :

Les substances polymériques extracellulaires sont des biopolymères produits par divers microorganismes : archées, bactéries et eucaryotes. Dans le cas des systèmes qui nous intéressent, les EPS sont des biopolymères d'origine microbienne dans lesquels les microorganismes du biofilm sont incorporés. Ces EPS sont soupçonnées de jouer un rôle important dans le développement du biofilm. Les EPS sont caractérisées par leur apparence gélatineuse. Ils sont responsables de la morphologie, la structure, la cohésion et l'intégrité fonctionnelle des biofilms. Leur composition détermine la plupart de leur propriétés physico-chimiques et biologiques (**Wingender et al.,1999**). Les EPS contribuent également de manière significative à la pathogénicité, à la résistance aux antifongiques, à la protection contre le système immunitaire de l'hôte et à l'intégrité structurale des microbes (**Payal Gupta et al.,2019**).

Les substances polymériques extracellulaires bactériennes (EPS) comportent des protéines, des acides nucléiques, des lipides simples, des phospholipides, des substances humiques, des homopolysaccharides et des hétéropolysaccharides, ces derniers sont en particulier à base de glucose, de fructose, de mannose, de galactose, de pyruvate, d'acide glucuronique et mannuronique (**Jorand et al., 1998 ; Sand et Gehrke,1999 ;Flemming et al.,2007**).

La composition de la matrice varie selon l'espèce et les conditions de croissance (**Hatroubi et al., 2014 ; Muhsin et al., 2015**).

### 3.4 Etape 04 : 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, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Auger, 2012**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des

tissus environnants de l'hôte et permet ainsi la libération de nutriments (Jacobsen *et al.*, 2008).

### 3.5 Etape 05 : Détachement des cellules :

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur. Cette dernière étape se produit lors du vieillissement du biofilm, ou lors de certains stress ou carences. En 2003, Davey a également rapporté que la production de biosurfactants (rhamnolipides) pourrait aussi favoriser la dispersion des cellules de la matrice du biofilm. La dispersion des cellules du biofilm mature pourrait aussi être sous l'influence du système de communication intercellulaire où une augmentation de la concentration en molécules inductrices serait responsable de la régulation de la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (lyase) (Stoodley *et al.*, 2002). Par exemple, La dispersion des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* est la plus étudiée (Goller, 2008). Pour ces derniers, une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement massif de plus de 80% des cellules constituant le biofilm (Sauer, 2004). Aussi les *Streptococcus spp* peut synthétiser des enzymes qui hydrolysent ses liaisons avec les protéines de surface. Retournant à l'état planctonique dans le liquide, les bactéries peuvent coloniser alors des milieux plus propices (Bouchard, 2015).



Figure 04: mécanismes de détachement du biofilm (Alfred *et al.*, 2008).

### 4. Communication cellulaire : Quorum Sensing :

Durant la formation du biofilm plusieurs espèces bactériennes sont capables de communiquer entre elles par le mécanisme du quorum sensing (QS) (Naves *et al.*, 2010; Gad, 2018). C'est un système qui stimule l'expression coordonnée avec d'autres cellules et la réponse dépend de la densité de leur population locale. Pendant le QS, les molécules signales se fixent à des récepteurs bactériens conduisant ainsi à un changement dans l'expression des

gènes chez la cellule réceptrice. Cela est constaté chez les mono-espèces bactériennes et aussi chez les hétéro-espèces (Miller et Bassler, 2001).

Le mécanisme de QS chez les Gram négatifs implique la production des petites molécules inductrices appartenant à la familles des N-acyles homo-sérines lactones ou molécules acylées (AHLs) (Fuqua *et al.*, 1994; Fuqua et Greenberg, 2002; Czajkowski et Jafra, 2009).

La voie de communication cellulaire chez les bactéries à Gram positif fait impliquer des molécules signales peptidiques, dont la protéine précurseur est secrétée dans le milieu extracellulaire et commencent à s'accumuler. Une fois le taux d'accumulation atteint une concentration seuil, une zone d'auto-induction est créée. Les molécules peptidiques "signal" interagissent avec l'histidine kinase portée par un récepteur membranaire (Kleerebezem *et al.*, 1997; Waters et Bassler, 2005; Bose et Ghosh, 2016).

### 5. Composition du biofilm :

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm, incluant des protéines, des enzymes, des polysaccharides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des lipides, des glycolipides et des cations (Flemming et Wingender, 2010). En plus de ces composants, l'eau est le composant majeur, avec plus de 97%, responsable du flux des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm (Sutherland, 2001). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (Yannick *et al.*, 2014).

**Tableau 01** : Composition d'un biofilm bactérien (Muhsin *et al.*, 2015).

Composés	Pourcentage dans la matrice
Cellules microbiennes	2-5%
Protéines	1-2%
Polysaccharides	<1-2%
ADN/ARN	<1-2%
Eau	Supérieur à 97%

## 6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs qui peuvent être répartis en trois catégories :

- Les caractéristiques des surfaces à coloniser.
- Les conditions environnementales.
- Les propriétés bactériennes (**Branger et al., 2007**).

### 6.1 Caractéristiques de la surface :

N'importe quelle surface en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm (**Chalvet de Rochemonteix, 2009**).

#### 6.1.1 Géométrie de la surface :

La géométrie de la surface externe du support, à savoir sa forme tridimensionnelle, sa porosité, ses irrégularités de surface, détermine la localisation de l'adhésion bactérienne. (**Campanac, 2002**).

Les bactéries colonisent préférentiellement les supports poreux et se regroupent en général au niveau des aspérités, des ruptures de courbure, des coins. L'accumulation des biofilms à la surface des supports se réalise de fait dans les zones où la circulation des fluides environnants est freinée par les frottements sur les parois (**Campanac, 2002**). Par exemple *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus acidophilus* adsorbées sur des surfaces en verre produisaient des biosurfactants capables de réduire de 77% le nombre de cellules adhérentes d'*Enterococcus faecalis* (**Velraeds et al., 1996**).

#### 6.1.2 Rugosité de la surface du support :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante. Néanmoins, certaines souches bactériennes colonisent aussi des surfaces lisses (**Characklis, 1990 ; Donlan et Costerton, 2002**). **Hilbert et al., (2003)** ont montré que la rugosité n'avait pas affecté de manière significative l'attachement à la surface d'acier inoxydable dans la gamme de la valeur  $R_a$  (rugosité moyenne arithmétique) de 0.01 à 0.9  $\mu\text{m}$  /pour des espèces de *Pseudomonas*, de *Listeria monocytogenes* et de *Candida lipolytica*. **Boulangé-Petermann et al.,(1997)** n'ont trouvé aucun rapport clair entre le paramètre de rugosité et le nombre de *Streptococcus thermophilus* adhérentes à des surfaces d'acier inoxydable ayant des valeurs de  $R_a$  entre 0.015 et 1.04  $\mu\text{m}$ . L'adhérence microbienne sur la surface d'acier inoxydable est probablement régie par divers facteurs physiques, chimiques, et biochimiques (**Ortega et al., 2010**).

### 6.1.3 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 Téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

### 6.1.4 Présence d'un film protéique sur la surface :

La présence de polymères sur un support 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**). Par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* expriment à leur surface des molécules, les MSCRAMM11 capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine (**Patti, 1994**).

## 6.2 Influence des conditions environnementales :

Les facteurs environnementaux tels que la température, la concentration bactérienne, l'existence de flux, la qualité et la quantité des substances nutritives environnantes affectent l'adhésion bactérienne et la formation d'un éventuel biofilm. Ainsi, certaines souches bactériennes incapables de s'organiser en biofilm *in vivo*, peuvent présenter cette faculté *in vitro* dans des conditions expérimentales propices. De même, une souche bactérienne isolée à partir d'un biofilm développé à la surface d'un dispositif biomédical peut, *in vitro*, perdre cette propriété du fait de conditions expérimentales trop éloignées des conditions physiologiques (**Baillif et al., 2010**).

### 6.2.1 Forces hydrodynamiques d'un flux :

Les forces hydrodynamiques sont considérées comme étant les facteurs environnementaux les plus susceptibles d'affecter l'adhésion bactérienne et le développement du biofilm bactérien (**Baillif et al., 2010 ; Bellifa, 2014**).

En effet, la répartition bactérienne sur un support est modélisée par l'intensité d'un flux : si celui-ci est laminaire, les bactéries auront tendance à s'organiser en agrégats amorphes alors qu'en cas d'écoulement turbulent, elles auront plutôt tendance à adopter une disposition en fins serpentins placés dans le sens du courant (**Baillif et al., 2010**). *Pseudomonas aeruginosa* pourrait être éloignée du support s'il existe une simple agitation ou une modification de sa composition ou une modification de la température. Des différents types de

forces s'exercent entre la surface du support et la bactérie elle-même: les forces d'attraction de Van der Waals, les forces électrostatiques (Zadeh, 2009; Cournet, 2010; Rasamiravaka *et al.*, 2014).

### 6.2.2 La température :

Elle 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 (Dumas, 2007). Par exemple, la température optimale de croissance de *S. aureus* est comprise entre 30 et 37°C (Beaudry, 2011). Dans le cas d'une bactérie marine *Deleya Marianna*, on a observé une adhérence maximale à une surface hydrophile à 25°C c'est-à-dire à la température optimale de la croissance, alors que l'adhérence était plus faible à 19°C et à 37°C (Shea *et al.*, 1991). De même, la température de l'adhésion sur le polystyrène, de *P. fluorescens*, *E. cloacae* et *Chromobacterium sp* était maximale entre 20°C et 30°C, tandis que, l'adhésion de *Flexibacter sp* était maximale à 20°C et diminue progressivement avec l'augmentation de la température. (McEldowney et Fletcher., 1988). Aussi les biofilms formés par *A. flavithermus* et *G. stearothermophilus* se forment principalement à des températures élevées compris entre 40–65 °C (Sadiq *et al.*, 2017).

### 6.2.3 Le pH :

Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Hamadi *et al.*, 2004 ; Boutaleb, 2007). *L. monocytogenes* est capable de se multiplier à des pH de 4,6 à 9,6, à l'optimum thermique. Cependant, des variations de croissance ont été observées en fonction de la nature du milieu et de l'acide ainsi que de sa concentration (Pearson et Marth, 1990 ; Augustin *et al.*, 2005). De même, *Pseudomonas fragi* a montré une adhérence maximale sur des surfaces d'acier inoxydable à la gamme de pH optimale pour son métabolisme c'est-à-dire des pH de 7 à 8 (Stanley, 1983).

### 6.2.4 Composition du milieu :

La composition du milieu nutritif, tant au niveau qualitatif que quantitatif, est capable de moduler l'adhésion bactérienne (Bellifa, 2014). Ainsi la présence de calcium et de magnésium semble faciliter l'adhésion réversible de la bactérie à un support. La synthèse du slime est favorisée par un excès de carbone, une addition de glucose, ou une déplétion en nitrogène, potassium et phosphate (Baillif *et al.*, 2010).

La concentration en nutriments joue un rôle majeur : un milieu riche en substrats favorise l'adhésion et la croissance bactériennes. En cas d'appauvrissement du milieu environnant les bactéries encore planctoniques auront tendance à être attirées par le biofilm qui représente alors une réserve en substrats (**Bellifa, 2014**). Par exemple, la plupart des souches de *S. thermophilus* sont capables de croître en présence d'un mélange de glutamine, de méthionine, de leucine, d'isoleucine, de valine et d'histidine, comme seules sources d'acides aminés, il est probable que les voies de biosynthèse des autres acides aminés sont entièrement fonctionnelles (**Hols et al., 2005**).

### **6.3 Influence des propriétés bactériennes :**

Pour une surface donnée, l'adhésion bactérienne sera en fonction de l'espèce bactérienne et même de la souche bactérienne utilisée du fait de caractéristiques physicochimiques différentes. Toute modification des caractéristiques de surface des microorganismes peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne (**Baillif et al., 2010**).

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'EPS influencent l'attachement des bactéries sur une surface (**Donlan, 2002**).

**Cerca et al., (2005)** ont trouvé que l'adhésion de souches de *S. epidemidis* était plus forte aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles. L'augmentation de l'hydrophobicité du téflon et de l'acier inoxydable a induit l'augmentation l'adhésion des spores de *B. cereus* (**Shakerifard et al., 2009**).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae et certaines protéines semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les EPS et les lipo-polysaccharides(LPS) sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

Tableau 2. Facteurs et propriétés impliqués dans la formation des biofilms (Donlan, 2002).

Propriétés de la surface /support	Propriétés du milieu	Propriétés de la cellule
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Texture de la surface</li> <li>➤ Rugosité de la surface</li> <li>➤ Hydrophobicité de la surface</li> <li>➤ Présence d'un film conditionnant à la surface</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Vitesse du flux</li> <li>➤ pH</li> <li>➤ Température</li> <li>➤ Cations présents dans le milieu (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>...)</li> <li>➤ Concentration en Fer et en nutriments</li> <li>➤ Sources de carbone disponibles</li> <li>➤ Disponibilité en oxygène dans le milieu</li> <li>➤ Présence d'agents anti-microbien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hydrophobicité de la surface des cellules</li> <li>➤ Présence d'appendices (fimbriae, flagelles)</li> <li>➤ Molécules de surface</li> </ul>

## 7. Le biofilm en industrie laitière :

La capacité de certains micro-organismes à former des biofilms continue de constituer un défi majeur pour différentes industries. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms. En effet les principales sources de contamination des produits laitiers sont souvent dues à un mauvais nettoyage et de désinfection de l'équipement (Srey *et al.*, 2013).

Dans les usines de productions laitières, la formation de biofilms peut avoir lieu dans différentes sites de la chaîne de transformation du lait (Parker *et al.*, 2004), ceci comprend les réservoirs de stockage du lait, et les canalisations, autour des joints. De même les surfaces de contact du produit dans les appareils de traitement telles que les pasteurisateurs et des évaporateurs (Figure 05), sont considéré comme une source importante de contamination du produit dans la ligne de transformation du lait. La croissance des biofilms laitiers conduit à

l'augmentation des possibilités de contamination microbienne des produits laitiers transformés. Ces biofilms peuvent contenir des micro-organismes pathogènes et de détérioration (**Parkar et al.,2004**).

Les bactéries dans les biofilms sont protégées contre les désinfectants en raison de la coopération multi spécifique et de la présence des substances polymériques extracellulaires (EPS), qui favorise leur survie et leur contamination ultérieure des produits laitiers (**Marchand et al .,2012**). En effet, les biofilms sont composés d'espèces spécifiques qui sont bien adaptés pour survivre à des facteurs d'extrinsèque (chaleur, froid) et d'intrinsèques (pH, sel) qui sont associés à la transformation du lait (**Marchand et al.,2012**).

Les biofilms laitiers sont dominés par les bactéries, les substances polymériques extracellulaires (EPS) et les résidus de lait, pour la plupart des protéines et de phosphate de calcium. La formation de biofilms sur les équipements de l'industrie laitière peut conduire à de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques en raison de la détérioration des aliments et à la dépréciation d'équipement. Les micro-organismes dans les biofilms catalysent des réactions chimiques et biologiques responsables de la corrosion des métaux dans les tuyauteries et les réservoirs, et ils peuvent réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épaisses: échangeurs à plaques et des pipelines. (**Simões et al.,2010**).



**Figure 05:** Equipement laitiers. (A) : tanks de stockage du lait, (B) : système de canalisation (lactoducs), (C) : un échangeur thermique à plaque (**Malek ,2013**).

### 7.1 La microflore bactérienne du biofilm en industrie laitière :

La flore constitutive du biofilm en industrie laitière peut-être variée et comprendre de nombreuses espèces aussi bien Gram+ que Gram-, telles que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas* et certaines entérobactéries (**Burgess et al., 2010**). Néanmoins certains groupes de bactéries sont considérés comme inféodés au biofilm dans l'environnement des laiteries en raison de conditions sélectives et propices à la croissance de ces taxons. Il s'agit

notamment de *Streptococcus thermophilus* (Flint *et al.*, 1997), des bacilles thermophiles (Parkar *et al.*, 2004 ; Rueckert *et al.*, 2005 ; Seale *et al.*, 2008 ; Burgess *et al.*, 2010 ) et des membres du groupe *B.cereus* (Wijman *et al.*, 2007 ; Shaheen *et al.*, 2009 ; Salutiano *et al.*, 2010 ; Didouh *et al.*, 2015).

La variation de la flore est due à des pression sélectives , la chaleur, les résidus alimentaires, le pH et l'activité de l'eau. Les bactéries qui forment le biofilm sur l'acier inoxydable, peuvent être former d'une monocouche dans les usines qui régulièrement font des cycles de nettoyage au niveau des sites où les forces de cisaillement sont élevées (Burgess *et al.*, 2010).

Les bactéries dans les biofilm sont protégées contre les désinfectants en raison de la coopération multi spécifique et de la présence des substances polymériques extracellulaires (EPS), qui favorise leur survie et leur contamination ultérieure des produits laitiers (Marchand *et al.*, 2012). En effet, les biofilms sont composés d'espèces bactériennes spécifiques qui sont bien adaptés pour survivre à des facteurs d'extrinsèque (chaleur) et d'intrinsèques (pH, sel) qui sont associés à la transformation du lait (Marchand *et al.*, 2012).

Il est bien documenté que les bactéries fréquemment rencontrées dans l'environnement laitier capables de former des biofilms appartiennent au genre *Enterobacter* , *Listeria* (Vilar *et al.*, 2007), *Bacillus spp.*, y compris l'espèce *B. cereus* (Fernandes *et al.*, 2014 ; Didouh *et al.*, 2015), *Pseudomonas spp.*, incluant *P. fluorescens* (Aswathanarayan et Vittal, 2014), *Serratia spp*, *Staphylococcus sciuri* et *Stenotrophomonas maltophilia* (Cleto *et al.*, 2012), *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* (Michu *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014 ), *Klebsiella* (Garedew *et al.*, 2012), *Proteus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Moraxella*,), *Enterococcus spp.*, y compris *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,» *L.monocytogenes* (Latorre *et al.*, 2010 ; Fernandes *et al.*, 2015), *Bacillus licheniformis* et *Lactobacillus paracasei* (Dat *et al.*, 2012).

## 8. 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, la persistance des équipements est due à la formation de spores et de biofilms. Ces derniers sont impliqués dans les problèmes de contamination croisée qui affectent la qualité des produits transformés et limitent leur durée de conservation (Malek, 2019). 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 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Costerton *et al.*, 1995 Lechevallier *et al.*, 1998**), 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**).

### **9. Elimination de biofilm :**

Dans l'industrie agroalimentaire l'attachement microbien aux surfaces des équipements est rapide, par conséquent, il est impossible de nettoyer et de désinfecter assez souvent pour éviter l'attachement. Néanmoins une fréquence suffisante de désinfection devrait permettre d'éviter la maturation du biofilm et l'accumulation des résidus de produit. (**Houdet et Michels, 2010**).

L'objectif principal d'un processus de nettoyage est l'élimination des résidus de produits, qui est un premier point critique dans l'élimination, et le contrôle de biofilms. En effet, l'élimination incomplète des résidus alimentaires favorise la ré-adhésion des bactéries et la formation du film conditionnement point de départ d'un nouveau biofilm. En outre, les désinfectants sont moins efficaces lorsque des particules alimentaires ou de souillure sont présentes sur les surfaces (**Sinde et Carballo, 2000**). De même les méthodes de nettoyage standard utilisées dans de nombreuses industries agroalimentaires, tel que le nettoyage standard utilisées dans de nombreuses industries agroalimentaires, tel que le nettoyage acido-alcalin du CIP n'est pas suffisant pour éliminer la matrice organique de biofilm. Les paramètres des processus cinétique efficaces, comprennent des formulations appropriées, concentrations, temps, température et doivent être optimisés pour cibler l'élimination d'un biofilm (**Parker *et al.*, 2004**). Celle-ci est également considérablement facilitée par l'application de force mécanique (comme le brossage et le frottement) de la surface pendant le nettoyage (**Houdt et Michiels., 2010; Malek, 2013**).

---

# Partie II

## Matériel et méthodes

**Partie II : Matériel et méthodes**

Dans ce travail, nous essayeront d'étudier le potentiel de formation de biofilm des souches isolées de la région de Tlemcen au niveau d'une laiterie GIPLAIT, par la méthode de plaque de culture de tissu (TCP). Les souches ont été identifiées et caractérisées par la technique MALDI-TOF.

Ce travail a été réalisé au niveau d'unité de bactériologie du laboratoire d'analyse médicale ABADNI de AIN- DEFLA durant la période allant de 20 février jusqu'au 22 mars 2020, au niveau des laboratoires pédagogique de l'université de DJILALI BOUNAAMA khemis miliana.

**II.1. L'identification bactérienne des isolats par la technique MALDI-TOF MS :**

L'identification des espèces bactériennes a été réalisée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) selon la procédure de **Bezzini et Greub, (2010)**. Une suspension bactérienne cultivées (300 µL) a été précipité avec 900 µL d'éthanol (96% vol / vol) et centrifugé pendant 5 min à 10 000 x g. Le culot a été remis en suspension dans 50 µL d'acide formique à 70% (vol / vol), suivi par l'ajout de 50 µL d'acétonitrile, le mélange est mis en centrifugation pendant 5 min à 10000 × g, puis 1,5 µL du surnageant a été déposé sur un MTP 384 plaque poli en acier TF et séchée à l'air. L'extrait séché a été recouvert de 2 µL d'une solution saturée d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (dans une solution à 50% d'acétonitrile, 2,5% d'acide trifluoroacétique) et laissé sécher à l'air à une température ambiante. L'analyse des spectres et des données a été acquise respectivement avec un instrument Ultraflex et le logiciel Biotyper 3.1.

**II. 2. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* : Méthode de culture sur microplaque (TCP) sous différents conditions :**

La production de biofilms sur la surface polystyrène a été déterminée en utilisant des microplaques PS à 96 puits, en suivant la méthode quantitative décrite par **Stepanović et al, (2000)** avec des modifications mineures.

Afin de comparer la capacité des souches isolées à former des biofilms sur des surfaces de polystyrène avec différents milieux, toutes les souches ont été soumises à un test de biofilm sur des surfaces de PS en présence de bouillon nutritif recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits. ou bouillon tryptone de soja. Pour mesurer le potentiel de formation de biofilm des

souches à différentes températures, toutes les souches ont été soumises à un essai de biofilm sur les surfaces PS à 37° C et 55° C, respectivement.

### II. 2.1.Souches bactériennes et des conditions de croissance :

Les souches isolées qui ont été maintenues à -80 °C dans du TSB contenant 50% glycérol mélangé et cultivé en TSB à 37 ° C pendant 18 h pour atteindre la phase stationnaire. Les organismes étaient récoltés par centrifugation à 2350 g, 4 °C pendant 10 min, puis lavé deux fois par une solution saline stérile tamponnée au phosphate (PBS, pH 7,4) et remis en suspension dans du BN stérile frais et TSB (concentration finale d'environ 10<sup>6</sup> UFC / ml) selon les éléments suivants expériences.

Un volume de 200 µl de la suspension bactérienne est déposé dans les puits de microplaques en polystyrène stériles de 96 puits en forme "U",chaque culture bactérienne a été utilisé en 3 fois pour assure une exactitude des résultats. Parallèlement, un même volume de 200 µl du TSB additionné à 1% ou du BN non ensemence est déposé dans trois puits et servant comme contrôle négatif, la microplaque est incubé à 37°C pendant 24h sans agitation. Après la durée d'incubation, Les puits ensemencé de la microplaque sont ensuite vidés et la suspension bactérienne est éliminée. Suivie de 3 rinçages par le Phosphate Buffered Saline (PBS pH=7.4) afin d'éliminé les bactéries non adhérent, puis la microplaque est séché à une température ambiante en position inversé pendant 30 min.

Les puits de la microplaque séchées sont ensuite coloré par 200µl de Crystal violet à 1% dans chaque puit, après 15min le colorant Crystal violet est éliminé et les puits sont rincé 3 fois à l'eau distillé stérile pour éliminer toute trace de colorant non fixé, les plaques sont ensuite séché à une température ambiante en position inversé. Enfin les puits sont rempli encore une fois avec 200µl d'éthanol à 95% pour le processus de solubilisation du Crystal violet contenu dans le biofilm formé dans les puits.

La densité optique est mesuré à 600nm par le lecteur de microplaque (ELISA) (model SafasmonacoMP96) couplé a un ordinateur.

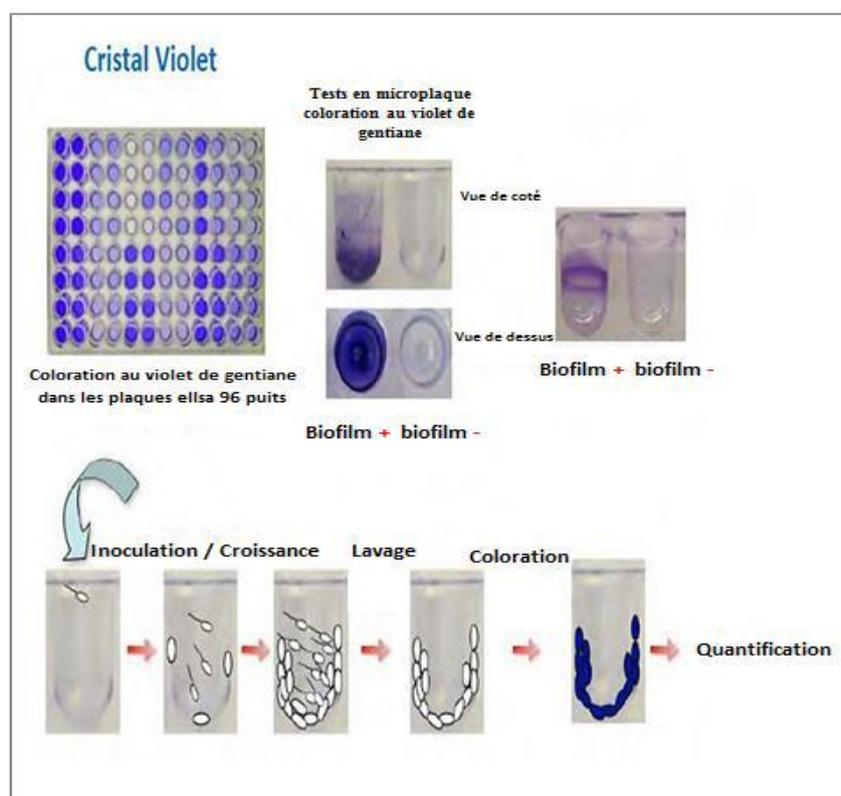
les souches compte tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en quatre catégories : non adhérentes, faiblement adhérentes, modérément adhérente et hautement adhérente (Stepanović *et al.*, 2000; Stepanović *et al.*, 2007):

\*aucune production de biofilm ( $DO_{570} \leq OD_{control}$ )

\* faible ( $DO_{control} < DO_{570} \leq 2DO_{control}$ )

\* modérée ( $2DO_{control} < DO_{570} \leq 4DO_{control}$ )

\* forte productrice de biofilms ( $DO_{570} > 4DO_{control}$ )



**Figure 06 :**Formation de biofilm en microplaque (Bellifa,2014).

# Partie III

# Résultats et discussion

**Partie III : Résultats et Discussion :**

Dans la présente étude, la possibilité de contamination bactérienne au niveau des surfaces des lignes de transformation du lait de vache a été étudiée. L'objectif de notre étude est de caractériser la microflore bactérienne au niveau des canalisations post et pré – pasteurisation des canalisations de lait de vache par la technique MALDI-TOF et leurs capacités à former des biofilms. 41 isolats ont été obtenus à partir de 6 prélèvements réalisés au niveau d'une laiterie GIPLAIT. La répartition des isolats en fonction des sites de prélèvements est donnée par le tableau 03.

Le tableau 03 ci-dessous présente les résultats des prélèvements de la saison chaude.

**Tableau 1 :** Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvement au niveau de la laiterie pendant la saison chaude.

Numéro du Prélèvement	Nombre d'isolats	Les espèces avant pasteurisation	Les espèces après pasteurisation
1 et 2	24 isolats	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> (1)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1)
		<i>Enterobacter cloacae</i> (8)	<i>Enterococcus faecium</i> (1)
		<i>Enterococcus faecium</i> (4)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)
		<i>Acinetobacter schindleri</i> (2)	
		<i>Bacillus cereus</i> (4)	
		<i>Bacillus subtilis</i> (1)	
3 et 4	11 isolats	<i>Enterobacter cloacae</i> (4)	<i>Bacillus cereus</i> (1)
		<i>Enterococcus faecium</i> (1)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1)
		<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)
		<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)
5 et 6	06 isolats		<i>Enterobacter cloacae</i> (2)
		<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> (1)
		<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1)

D'après nos résultats, on remarque la dominance des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif. Cette dominance est représentée par du genre

*Enterobacter* présenté par les espèces suivantes : *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter xiangfangensis* suivi par le genre *Acinetobacter* présenté par l'espèce *Acinetobacter schindleri*.

Nos résultats sont en concordance avec **Salmeron et ses collaborateurs ,(2002)** qui ont trouvé une dominance des bactéries à Gram négatif présenté par le genre *Enterococcus* (24 souches), et une absence totale des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* dans les échantillons étudiés. Avec une présence presque équivalente des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* (6 souches pour chaque genre). Cette composition n'est pas trouvée dans la bibliographie.

**Beleberki et Douha,(2019)** ont trouvé la dominance des bactéries à Gram négatifs par rapport aux bactéries à Gram positifs. Cette dominance est représentée par le genre *Myroides/Chryseobacterium indologenes* avec 3 biotype différents (17 isolats), suivi par le genre *Aeromonas* présenté par l'espèce *Aeromonas salmonicida* spp *salmonicida* (3 biotype) (6 isolats) et le genre *Enterobacter* présenté par l'espèce *Enterobacter cloacae* (4 biotype) (6 isolats).

**Zoua et Liua ,(2018)** ont isolé quarante-cinq souches qui ont été identifiées comme *Acinetobacter* spp.(8) *Bacillus* spp.(22), *Clostridium* spp. (1), *Enterobacter* spp. (2), *Microbacterium oxydans*.(1), *Micrococcus* spp. (2), *Moraxella* spp. (2), *Pseudomonas* spp. (2),*Serratia marcescens* (3) et *Staphylococcus epidermidis* (2).

**Cherif –antar et al.,(2015)** ont isolé soixante-dix isolats à Gram-positifs qui ont été identifiés comme *Enterococcus faecalis* (33), *Bacillus cereus* (26), *Staphylococcus hominis* (8), *Staphylococcus saprophyticus* (2) et *Staphylococcus epidermidis-Staphylococcus aureus* (1) espèce. Cinquante-cinq isolats à Gram-négatifs ont été identifiés à l'espèce *Escherichia coli* (18), *Klebsiella pneumoniae* (13), *Acinetobacter calcoaceticus* (6), *Serratia marcescens* (6), *Enterobacter* spp. (5), *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Escherichia vulnérans* (2) et *Proteus mirabilis* (1). Ces résultats sont en concordance avec nos résultats.

L'étude de **Rückert et al.,(2004)** a permis d'identifier comme espèces majoritaires: *Anoxybacillus flavithermus* à (43%), suivi par *Bacillus licheniformis* à (37%) et *Geobacillus stearothermophilus* à (11%).

Nos résultats montrent que :

-La persistance de l'espèce *Bacillus cereus* le long de la saison chaude par sa présence au niveau des canalisations post et pré-pasteurisation. Ce genre bactérien est responsable de l'altération des produits laitiers. Les espèces les plus incriminées sont *Bacillus*

*licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. Cette altération est due principalement aux activités enzymatiques des souches contaminant les produits et qui peuvent introduire des anomalies dans le lait (la coagulation du lait) (**Christieans et Zagorec, 2013**). Ces bactéries sporulées présentent une très forte résistance aux traitements thermiques, comme la pasteurisation. Elles peuvent être extrêmement difficiles à éradiquer d'une laiterie (**Flint et al., 1997**). Les spores sont résistantes à la chaleur, à la perturbation mécanique et à une grande variété de produits chimiques (**Ponce et al., 2008**) ce qui rend très difficile leur destruction dans les produits laitiers par les procédés de fabrication (**Gleeson et al., 2013**).

Plusieurs études ont montrés que les bactéries aérobies sporulées appartenant au genre *Bacillus* et aux genres étroitement apparentés ont été liées de façon répétée à la détérioration du lait cru et pasteurisé et des produits laitiers (**Meer et al., 1991 ; Ternstroöm et al., 1993 ; Crielly et al., 1994 ; Cosentino et al., 1997 ; Cempirkova., 2002 ;**). Même dans le lait stérilisé, des dégâts causés par des espèces de *Bacillus* ont été signalés, bien que cela soit principalement causé par des enzymes protéolytiques et lipolytiques thermostables ou par la recontamination du lait stérilisé pendant le traitement (**Westhoff et al., 1981 ; Chen et al., 2003 ; Janstova et al., 2004**).

-La persistance de l'espèce *Enterobacter cloacae* le long de la saison chaude par sa présence au niveau des canalisations post et pré-pasteurisation.

-La persistance de l'espèce *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus* le long de la saison chaude par sa présence au niveau des canalisations post et pré-pasteurisation.

La flore de contamination est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

Les contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Microcoques*, *Corynébactéries*, *Bacillus*, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière. Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (**Leyral et Vierling, 2007**).

Ces bactéries sont parmi celles qui résistent mieux dans les conditions défavorables. Les coliformes résistent à la réfrigération, à la congélation, au chauffage, à la salaison et à la dessiccation (Cuq, 2007). La présence des entérocoques dans les aliments d'origine animale indique généralement une contamination d'origine fécale ou bien que l'aliment est fabriqué dans des mauvaises conditions d'hygiène (Hammad *et al.*, 2015). Néanmoins, des études antérieures ont souligné que les fromagers ainsi que l'équipement de leurs fabrications étaient les sources principales de contamination de ce produit par les entérocoques et que la contamination du lait cru par des entérocoques d'origine bovine est faible (Hammad *et al.*, 2015). Des études récentes confirment la contamination par les entérocoques d'une large gamme de produits alimentaires, incluant les fromages, les saucisses, le lait et les céréales (Yilmaz *et al.*, 2016). Les différentes espèces varient en fonction l'aliment, du mode de fabrication et de l'origine des matières premières: on note une prédominance d'*E. faecium* dans les fromages, d'*E. faecalis* dans les poissons, et des 2 espèces dans les viandes, mais on retrouve également, en plus petite proportion, de nombreuses espèces telles que *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*. La présence de ces entérocoques dans les aliments s'explique par le fait que ce genre bactérien, particulièrement robuste, est parfois capable de survivre à la pasteurisation, et pourrait même se multiplier à des températures de 6°C dans certains aliments (Lavigne *et al.*, 2005).

De plus, il est démontré que des *Enterococcus faecium* supportent de fortes concentrations de sel et de nitrites ainsi qu'un pH acide, au delà même des niveaux appliqués dans la production alimentaire habituelle. (Houben, 2003).

-La persistance du genre *enterobacter* le long de la saison chaude par sa présence soit au niveau des canalisations post ou pré-pasteurisation.

Certaines bactéries ou groupes bactériens mis en évidence peuvent être considérés comme témoins de contamination d'origine fécale et indiquent la présence possible de germe pathogène (Sutra *et al.*, 1998). Parmi eux, nous avons : les coliformes, Il s'agit d'un groupe disparate non défini sur le plan taxonomique qui comprend les genres *Escherichia* (avec espèces *coli*, *intermedium*, *freudii*), *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Cuq, 2007).

Leur développement est freiné par l'abaissement du pH et leur croissance stoppée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Ils sont peu résistants à la chaleur (Le Minor et Richard, 1993).

-La présence du genre *Raoultella* uniquement dans les canalisations pré-pasteurisation.

-La présence du genre *Acinetobacter* uniquement dans les canalisations post pasteurisation.

On conclut que le protocole standard de pasteurisation appliqué est insuffisant dans cette laiterie non seulement pour l'élimination des bactéries à Gram positif (*Bacillus*) mais également pour certaines bactéries à Gram négatif (*Enterobacter*). Par conséquent, il peut être nécessaire de développer des approches pour réduire la contamination dans les élevages laitiers et par la suite dans le lait cru ou de mettre en œuvre des paramètres de pasteurisation température-temps conformément aux charges microbiennes présentes dans le lait cru. Sachant que par le biais de méthodes de typage et caractérisation, une relation entre les agents pathogènes provenant des excréments de vaches et l'environnement et ceux contaminant le lait pasteurisé a été observée par **VanKessel et al., (2011)**.

La capacité de formation de biofilm d'un microbiote varié composé à la fois des bactéries à Gram positif et de Gram négatif sur les microplaques de titration dans la présence de TSB et/ou BN à 37 °C et/ou 55°C.

Le protocole d'essai TCP décrit par **Christensen et al.,(1985)** est le plus largement utilisé a été considéré comme la norme d'essai pour la détection de la formation de biofilm. La formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits, est analysée par une simple observation à l'oeil nu des puits après une coloration au cristal violet. Cette coloration est considérée comme l'une des techniques indirectes d'estimation de la production de biofilm sur des différents types de substrats (**Djordjevic et al.,2002**).

Cette technique de quantification est une méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (**Djordjevic et al., 2002**). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (**Musk et al., 2005**).

D'après les résultats de **Bellifa et al., (2013)** ; **KaraTerki et al., (2013)**, la technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm in vitro. Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (**Racha et al.,2012**) .

La capacité de formation de biofilm des 41 souches cultivées sur (polystyrène) PS en présence de BN à 37 °C et 55 °C est montrée sur la figure08 et la figure 09 respectivement.

Des biofilms sur de PS en présence de TSB à 37°C et 55°C, respectivement.

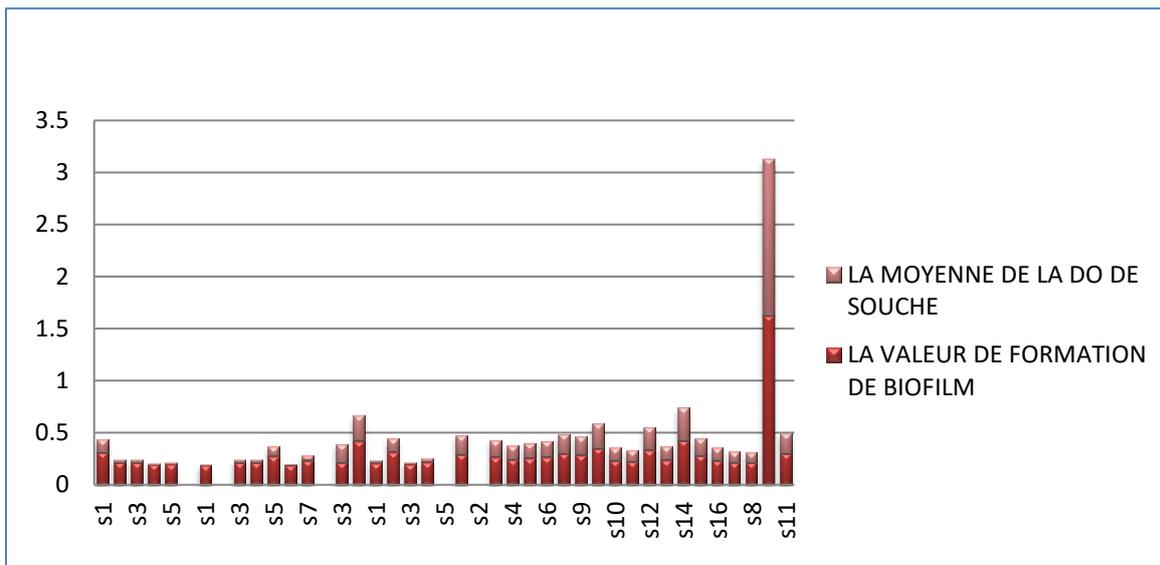


Figure 7: Capacité des souches bactériennes à former des biofilms dans le milieu BN à une température de 37°C.

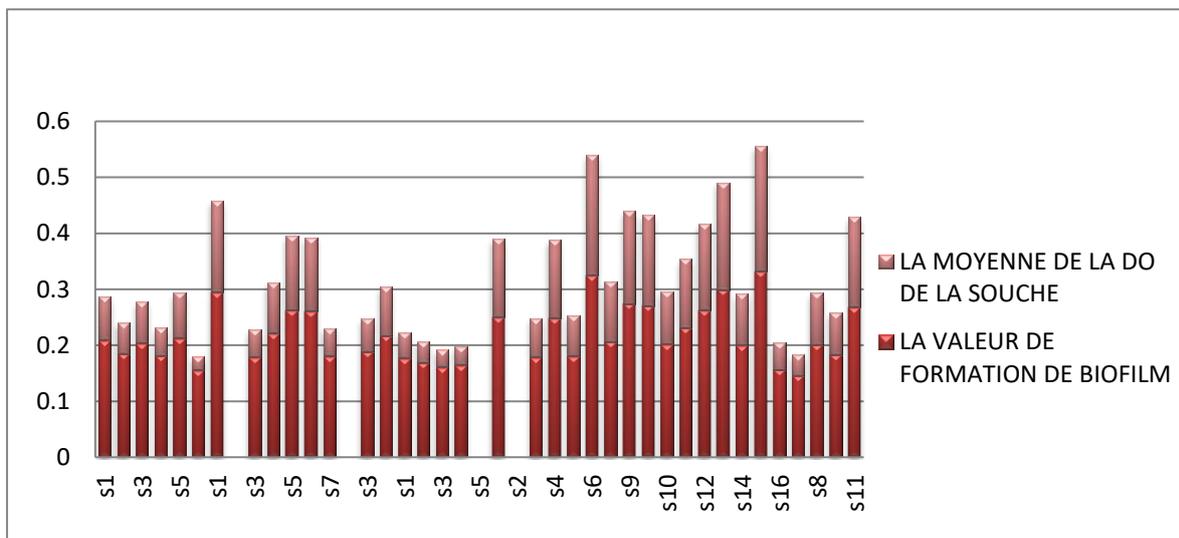
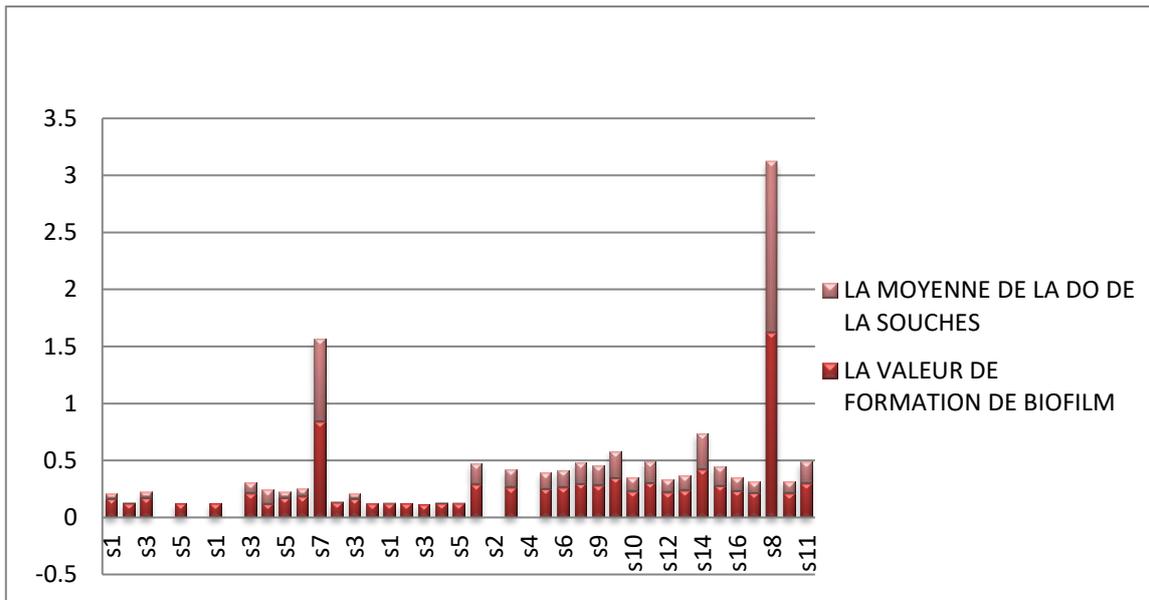
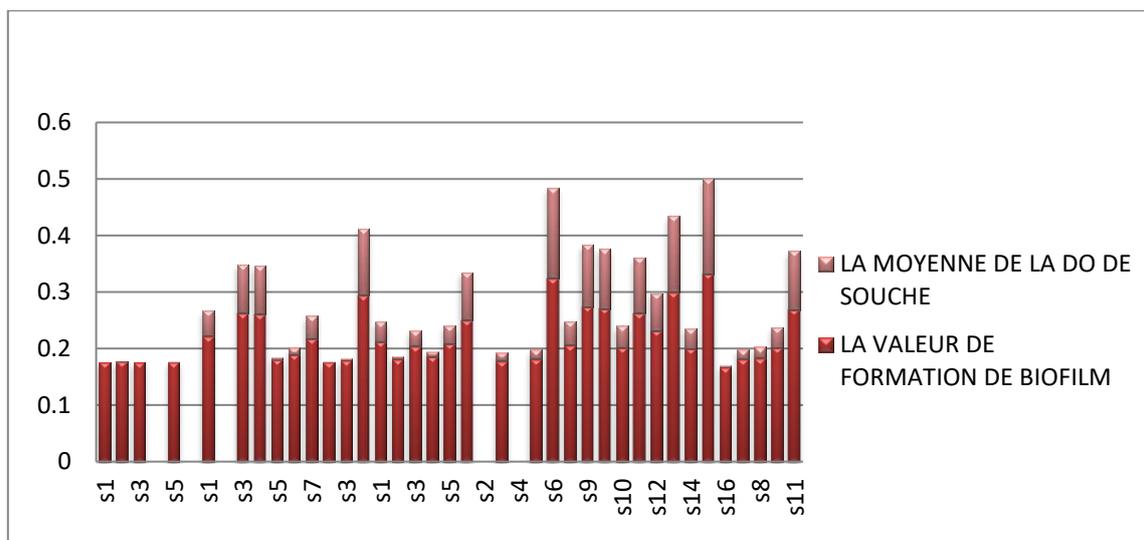


Figure 8: Capacité des souches bactériennes à former des biofilms dans le milieu BN à une température de 55°C.

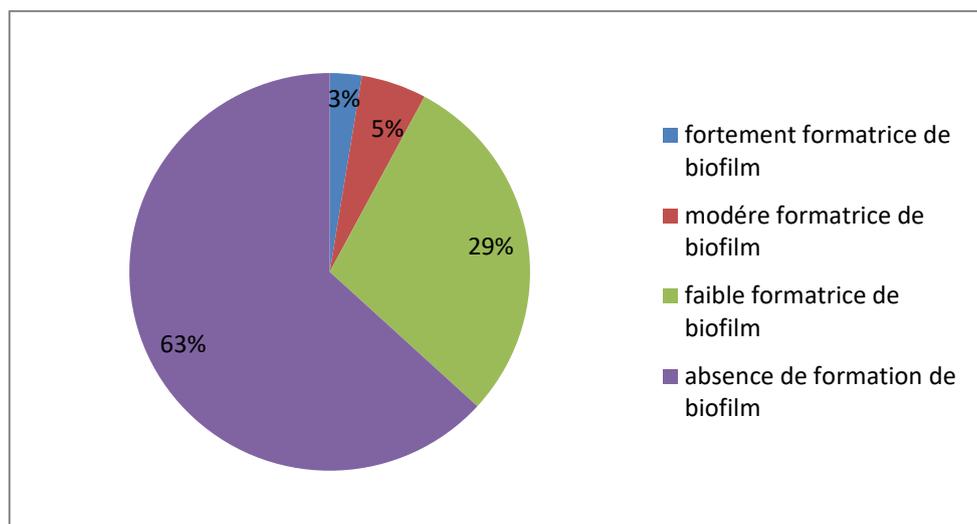


**Figure 09:** Capacité des souches bactériennes à former des biofilm dans le milieu TSB à une température de 37°C.



**Figure 10:** Capacité des souches bactériennes à formes de biofilm dans le milieu TSB à une température de 55°C.

La figure 11 ci-dessous présente les résultats de répartition des souches bactériennes selon leurs capacités à former des biofilms sur le polystyrène.



**Figure 11** : répartition des souches bactériennes selon leurs capacités à former des biofilms sur le polystyrène.

En outre, les résultats des tests de formation de biofilms sur des surfaces PS en présence de TSB et BN montrés que la  $DO_{570}$  du contrôle était égale à  $1,51 \pm 0,54$ .

La plupart des souches ont montré une faible capacité à former des biofilms sur PS en présence de NB à la fois à 37 °C et 55 °C (Fig. 07 et Fig. 08). À 37 °C, sur le total des souches, une seule souche appartenant à *Enterococcus faecium* a montré une forte capacité à former des biofilms sur PS dans la présence de NB, et deux souches ont montré une capacité modérée à former des biofilms sur PS dans les mêmes conditions. Le reste des souches ont montré des capacités faibles ou l'incapacité à former des biofilms sur PS sous les mêmes conditions.

Dans le cas de 55 °C (Fig. 08), deux souches appartenant à *Acinetobacter schindleri* et *Bacillus cereus* ont montré une forte capacité à former des biofilms sur PS en présence de BN. Onze (11) souches ont montré une faible capacité à former de biofilm sur PS. Le reste des souches ont montré l'incapacité à former des biofilms sur PS dans les mêmes conditions.

De même, dans le cas du TSB, la plupart des souches présentaient une faible capacité de formation de biofilm sur PS à 37 °C et 55 °C (Fig. 09 et Fig. 10). À 37 °C, *Bacillus cereus* a montré une forte capacité à former de biofilm sur PS en présence du TSB avec une  $DO_{570}$  de 0,723667. Onze souches (11) ont montré une faible capacité de formation de biofilm. Deux

souches d'*Enterobacter cloacae* ont montré une capacité modérée de formation de biofilm sur PS en présence de TSB. Le reste des souches a montré l'incapacité à former des biofilms sur PS dans les mêmes conditions.

Dans le cas de 55 °C (Fig.10), une seule souche d'*Enterobacter cloacae* a montré une faible capacité à former des biofilms sur PS en présence de TSB. Le reste des souches a montré l'incapacité à former des biofilms sur PS dans les mêmes conditions.

Les bactéries ont montré des capacités de formation de biofilm plus élevées dans le milieu BN par rapport à TSB sur PS à 55C°.

Nos résultats ont montré que la formation de biofilm est plus importante à 37C° par rapport à 55C°.

la plupart des souches ont montré l'incapacité de formation du biofilm (absence de formation) avec un pourcentage de (64%), de plus (29,33%) des souches sont faiblement formatrice de biofilm, (5,33%) sont moyennement formatrice de biofilm, le reste des souches (1,33%) ont montré une forte capacité de former un biofilm. Nos résultats sont en concordance avec celle de **Zoua et Liua. (2018)** qui ont trouvé que (71%) des souches ont montré l'incapacité ou faible formation de biofilm sur les surfaces PS.

En 2013, **Ouchar et ses collaborateurs** ont trouvé que parmi les (50) souches étudiées, 12 (24%) ont montrée une faible production, 16 (32%) une production modérée, 10 (20%) une forte production, pour un total de 38 (76%) souches productrices et 12 (24%) souches non productrices.

**Cherif –Antar et al.,(2015)** ont trouvé que, sur une collection de 38 souches, 27 souches ont été considérées comme non productrices de biofilm sur les surfaces en polystyrène.

Parmi les six souches de *Bacillus spp*, cinq souches de *Bacillus cereus*, deux ont montré une incapacité de formation de biofilm (absence de formation) sur le PS en présence de BN et TSB, et deux souches ont montré une faible capacité à former de biofilm sur PS en présence de BN, une souche montrée une capacité moyenne à former des biofilms. Une souche de *Bacillus subtilis* a montré une faible capacité à former de biofilm.

**Zoua et Liua. (2018)** , ont trouvé que parmi les treize souches de *Bacillus cereus* ,neuf souches ont montré un biofilm faible et quatre souche ont montré un biofilm modère dans les mêmes conditions appliquées dans notre étude.

**Ouchar et ses collaborateurs. (2013)**, ont trouvé que sur les 12 souches de *Bacillus cereus*, 3 (25%) présentent une faible production, 4 (33,33%) une production modérée, 2(16,67%) une forte production et 3 (25%) non productrices, pour un total de 9 (75%) souches productrice.

De plus, parmi les six souches d'*Enterococcus spp.* Cinq souches d'*Enterococcus faecium*, trois ont montré une incapacité à former de biofilm, deux ont montré une faible capacité à former de biofilm. Une souche d'*Enterococcus casseliflavus* présente une incapacité à former de biofilm. Une étude menée par **Kubota et al. (2008)** sur la capacité d'adhésion de quarante-six souches, appartenant aux différents genres de bactéries lactiques, dont *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lc. lactis* et *En. faecium*, a révélé qu'elles étaient capables moyennement ou fortement à former des biofilms sur microplaques de polystyrène; et ceci après 24 à 48 h d'incubation à 35°C, sous des conditions aérobies et anaérobies.

Les deux souches d'*Acinetobacter schindleri* ont montré une capacité faible à former des biofilms sur le PS en présence de BN à 37C°. **Zoua et Liua. (2018)** qui ont trouvé que parmi les huit souches d'*Acinetobacter spp* , une souche isolée de la surface intérieure du tanks du lait pasteurisé ont montré une incapacité à former de biofilm sur le PS à 37 °C en présence de NB, et une souche a montré une forte capacité à former des biofilms sur PS dans les mêmes conditions. Le reste d'entre eux ont montré de faibles capacités à former des biofilms sur PS dans les mêmes conditions appliquées dans notre étude.

Parmi les vingt-et-un souches de *Enterobacter spp*, seize souches de *Enterobacter cloacae*, une seule souche a montré une capacité modérée à former des biofilms sur PS, dix souches ont montré une faible capacité à former de biofilm, cinq souches ont montré des incapacités à former des biofilms sur PS. Parmi les cinq souches d'*Enterobacter xiongfangensis* , une seule souche a montré une faible capacité à former des biofilms , quatre souches ont montré des incapacités à former des biofilms sur PS.

*E. cloacae* est également liée à la sécurité alimentaire en raison de sa forte capacité de formation de biofilm (**Wang et al., 2017 ; Liu et al., 2018 ; Ramos-Vivas et al., 2019 ;Zurob et al., 2019**).

*Raoultella ornithinolytica* montré une incapacité à former de biofilm sur le PS.

Nos résultats montrent que les bactéries à Gram négatif tels que le genre *enterobacter* et *Acinetobacter* présenté par les espèces *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter xiongfangensis*, *Acinetobacter schindleri* ont une capacité à former des biofilms par rapport aux bactéries à Gram positif de genre *Bacillus* et *Enterococcus*.

# CONCLUSION

### Conclusion et perspective :

Le lait et les produits laitiers renferment une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle. L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait par les germes pathogènes, des flores de contamination diverses liées à des manutentions soit être endogène (poudre du lait) ou exogène (équipements de l'usine laitier) en appelle cette communauté microbienne \* un biofilm\*qui se forme sur toutes les types de surfaces des systèmes technologiques dans l'industrie laitière. L'ensemble des procédés de traitement et de transformation du lait peut freiner la multiplication des germes éventuellement présents ou au contraire favoriser leur développement.

Dans cette étude, on a réalisé un ensemble d'analyses microbiologiques et moléculaires de la microflore qui contaminent les canalisations pré et post-pasteurisation de lait et déterminer leur potentiel de production de biofilm. Une diversité microbienne spécifique très élevée a été trouvée parmi les bactéries isolées. La microflore identifiée était composée : *Enterobacter cloacae* , *Enterobacter xiangfangensis* , *Enterococcus faecium* , *Enterococcus casseliflavus* , *Bacillus cereus* , *Bacillus subtilis* , *Acinetobacter schindleri* , *Raoultella ornithinolytica* . La capacité des souches a formé du biofilm à été évalué par la méthode TCP. Les résultats montre que la plus grande partie des souches ne sont pas capables de former un biofilm (63%) et (29%) sont faiblement formatrice du biofilm,(05%) sont moyennement formatrice du biofilm, et (03%) sont fortement formatrice du biofilm sur le TCP.

La formation de biofilm est l'un des problèmes majeurs en milieu industriel. Plus précisément dans l'industrie laitière, la capacité des bactéries à s'attacher aux surfaces de contact d'équipement laitière fournit un réservoir de contamination pour les agents pathogènes avec des conséquences sur la santé humaine.

Nos données suggèrent clairement que le lait cru est un foyer potentiel important des bactéries d'altération. La présence d'un grand nombre de bactéries à Gram négatif devrait être prise en compte pour la mise en œuvre de fortes procédures d'hygiène. Afin de minimiser le risque de formation de biofilm et d'intoxication alimentaire du à la présence des bactéries qui ont été présent au niveau du biofilm et qui vont devenir présents au niveau de l'aliment, il serait intéressant d'explorer des techniques qui permet d'inhiber l'adhésion bactériens sur la surface qui ont en contact avec les aliments serait également une voie à prospecter.

Les principales perspectives de notre travail sont :

- ✓ L'étude de la thermorésistance des souches appartenant au genre *Bacillus* et l'identification et la quantification des enzymes lipolytiques et protéolytiques.
- ✓ La caractérisation moléculaire des isolats bactériens de cette étude notamment les souches thermorésistantes.
- ✓ L'étude de la thermorésistance des souches afin d'optimiser les paramètres de pasteurisation les plus adéquats dans l'élimination des micro-organismes.
- ✓ La mise en place du système HACCP afin de réduire les sources de contamination.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

### Références bibliographiques :

#### A

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.

Alfred, B., Cunnigham., John, E., Lennox., and Rockford., J., Ross., Eds., 2001-2008. (book) version 3.2.

Allnasouri, M., 2010. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. [Thèse de doctorat : Ressources Procédés Produits Environnement]. Lorraine : Université de Limoges, 161p.

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.

Asma, Cherif-Antar., Boumediene, Moussa–Boudjemâa., Nassima, Didouh., Khadidja, Medjahdi., Baltasar, Mayo., Ana, Belén Flórez., 2015. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. INRA and Springer-Verlag France.

Aswathanarayan, J.B., Vittal, R.R., 2014. *Food Sci Biotechnol.*, 23: 1903.

Austin, J.W., Bergeron, G., 1995. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J. Dairy Res.*, 62: 509-519.

Aye, A.M., 2015. Mise en évidence du système de communication Quorum Sensing impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. [Thèse de Doctorat : Microbiologie/Biochimie]. Toulon : Université de Toulon ; 245p.

#### B

Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., Kodjikian, L., 2010. Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du matériau. *Journal français d'ophtalmologie.* 33 : 210-221.

## References bibliographiques

---

Beaudry , F.M ., 2011. Etude sur les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez le porc à l'abattoir au Québec Canada. [Mémoire de Master : Microbiologie]. Montréal : Université de Montréal ; 96p.

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

Belemerki ,mouna ., Douha ,sara ., 2019. Isolement et identification de la microflore bactérienne des canalisations pré et post-pasteurisation de lait recombinaé d'une usine laitière.

Bellifa, S., Hassaine, H., M'hamed, I., Kara ,Terki I., Lachachi ,M., Didi ,W., 2013.Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Woekschop on Biotechnology. Tlemcen Algeria.

Bellifa ,S., 2014. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat .Université aboubekr belkaid, Tlemcen.

Bellon-Fontaine, M.N ., t Cerf O ., 1991. Mechanisms of microorganisms adhesion to surfaces: factors influencing the adhesion. *Journal des Industries Alimentaires et agricoles*. 108: 13-17.

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.Vn .,1982. Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 814–818.

Bizzini ,A., Durussel ,C ., Bille, J ., Greub, G ., Prod'hom, G., 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* ; 48: 1549– 54.

Bore, E ., Langsrud ,S ., 2005. Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *J. Appl. Microbiol.*, 98(1): 96-105.

## References bibliographiques

---

Branger ,A ., Richer ,M.M ., Roustel ,S ., 2007. Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.

Bremer,PJ ., Fillery, S ., McQuillan, AJ., 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 Microbial., 106: 254-262.

Bouchard,P., 2015. Odontologie Parodontologie Dentisterie implantaire vol.1.medecine parodontale, Lavoisier paris.

Boulangé-Petermann,L.,Rault,J.,Bellon-Fontaine,M.N.,1997. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. Biofouling. 11: 201–216.

Boutaleb ,Nr., 2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. [Thèse de Doctorat : Chimie]. Bretagne-Sud : Université de Bretagne-Sud ; 153p.

Burgess ,S ., Lindsay, D ., Flint, S,H ., 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology 144:215-225.

### C

Campanac ,C ., 2002. Biofilms bactériens : intérêts dans l'évaluation de l'activité détergente. Approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. Thèse de l'université Paul Sabatier, Toulouse, France.

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.

Chalvet de Rochemonteix ,A ., 2009. Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.

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

Chen ,L ., Coolbear ,T ., Daniel ,R.M ., 2003. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* spp. isolated from milk powder production lines, Int. Dairy J. (14) 495–504.

Christensen ,GD ., Simpson, WA ., Bisno ,AL ., Beachy ,EH ., 1985. Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. Infection and Immunity 37: 318-326.

## References bibliographiques

---

Christieans, S., Zagorec ,M ., 2013. Flores protectrices pour la conservation des aliments. Editions Quae. p. 52.

Cempirkova, R ., 2002. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples, *Vet. Med. Czech* (47) 227–233.

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

Cleto ,S., Matos ,S ., Kluskens ,L ., Vieira ,MJ ., 2012. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE* 7:e40189.

Cosentino ,S., Mulargia ,A.F., Pisano, F., Truveri, P., Palmas, F., 1997. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products, *Int. J. Food Microbiol.* (38) 235–238.

Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.G .,1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 35: 299-324.

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

Cournet,A ., 2010. Etude de la catalyse microbienne de la réduction électrochimique du dioxygène [Thèse de Doctorat : Ingénieries Microbienne et Enzymatique]. Toulouse : Université Toulouse III – Paul Sabatier ; 151p.

Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton,A ., 1994. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 256–263.

Cuq, JL ., 2007. Microbiologie Alimentaire, Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, 103104.

### D

Dat, N. M., Hamanaka, D., Tanaka, F., & Uchino, T., 2012. Control of milk pH reduces biofilm formation of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus paracasei* on stain-less steel. *Food Control*, 23, 215e220.

Davey,M. E ., 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 185 (3): 1027-1036.

## References bibliographiques

---

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.

Djordjevic, D., Wiedmann, M . And Mclands borough ,L .A ., 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*. 68: 2950– 2958.

Docteur Fabien, SQUINAZI ., Edition 2013 (fabien .[squinazi@gmail.com](mailto:squinazi@gmail.com)).

Donlan, RM ., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8 (9), 881-890.

Donlan ,R.M ., Costerton, J.W., 2002. Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 : 167- 193.

Dreeszen ,P.H ., 2003. The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking water Systems. Ed. *Edstrom Industries Inc.* «[http://www.edstrom.com/DocLib/4230-DS3100 CompleteBiofilm.pdf](http://www.edstrom.com/DocLib/4230-DS3100%20CompleteBiofilm.pdf) ». Consulté le 05/10/2013.

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

### E

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

Eve,Maunders.,and Martin,Welch FEMS., 2017. *Microbiology lettres* ,Volume 364,numéro ,fnx120 .

### F

Fernandes, M ., Morel, B ., Corral-Lugo, A ., and Krell, T., 2015.Identification of a Chemoreceptor that specifically mediates chemotaxis toward metabolizable purine derivatives. *Mol Microbiol* doi: 10.1111/mmi.13215 (in press).

Flemming ,H.C ., et Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 623-633.

Flint, S.H. P ., J. Bremer ., J. D. Brooks ., 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, Vol. 11, issue 1: 81-97.

## References bibliographiques

---

Fuqua ,C., et Greenberg, E. P., 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Molecular cell Biology*, 3: 685-695.

Fuqua ,W. C ., Winans ,S. C ., et Greenberg, E. P ., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxRLuxI family of cell density -responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*,176(2): 269-275.

### G

Ganesh Kumar, C ., et Anand ,S.K ., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42 : 9–27.

Gardew ,L ., Berhani ,A ., Mengesha ,D ., Tsegay ,G ., 2012 .identification of gram negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gonder town and it suburbs, Ethiopia.BMC Public Health PP.12-950.

Gleeson , David ., Aine ,O'Connell ., and Kieran Jordan ., 2013. "Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. "Irish Journal of Agricultural and Food Research.p. 217-227.

Goller ,C.C ., Romeo,T ., 2008. Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top.Microbiol. Immunol*. 322: 37- 66.

### H

Hall-Stoodley ,L ., Costerton, J.W ., Stoodley ,P ., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology*, 2(2): 95–108.

Hamad, S ., Dieng, M ., Ehrmann, A ., et Vogel, R ., 1997. Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J. Appl. Microbiol*, 83, 764-770.

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.

Hammou-Tani ,Souaad ., 2017.Identification des bactéries formant dans le lait de vache pasteurisé .

Hathroubi ,S ., Tremblay, Yannick D.N ., Jacques ,M ., 2014. Les biofilms Bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The canadian Journal of Veterinary Research* ; 78:110-116.

## References bibliographiques

---

Hilbert, L. R ., Bagge-Ravn, D ., Kold ,J ., Gram, L ., 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 52: 175–185.

Hols ,P., Hancy, F ., Fontaine, L ., Grossiord, B ., Prozzi, D ., Leblond- Bourget, N., et al ., 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 : 435–463.

Houben ,JH ., 2003. The potential of vancomycin-resistant enterococci to persist in fermented and pasteurised meat product. In *Int J Food Microbiol.* 88 (2003) 11 -1 8 126.  
Moretti ML, Bratfich OJ, Stucchi RB, Levi C, Levin AS, Duboc GM, Vormittag E, Blum-Menezes D (2004) Clonal dissemination of VanA-type glycopeptide-resistant *E. faecalis* between hospitals of two cities located 100 km apart. In *Braz J Med Biol Research* 2004 37:1339-43125.

Houdt ,R ., Michiels, C.W ., 2010. Biofilm formation and the food industry.A focus on the bacterial outer surface .*J. App Microbiol* Volume 109, Issue 4.

Huck ,JR ., Hammond BH ., Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ ., 2007. Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *J. D. Sci.* 90(10): 4872-4883.

### I

Irimes , C., 2010. Caractérisation génétique, phénotypique et formation de biofilm des souches de *Candida albicans* répondant ou non au farnésol. [Mémoire de Master : Médecine]. Montréal : Université de Montréal, 136p .

### J

Jacobsen, S., Stickler,M., Mobley,D-J., H-L., & Shirtliff,M.E., 2008. "Complicated catheter-associated urinary tract infectious due to *Escherichia coli* and proteus mirabilis" *Clin.Microbiol.Rev.*

Janstova, B., Lukasova, J., Drackova, M., Vorlova, L., 2004. Influence of *Bacillus* spp. enzymes on ultra-high temperature-treated milk proteins, *Acta Vet. BRNO* (73) 393–400.

Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J. C., Bottero ,J. Y., Villemin, G., 1998. Chemical and structural (20) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.* 29:1639-47.

## References bibliographiques

---

### K

Khalilzadeh , P. ,2009. Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. [Thèse de Doctorat]. Toulouse III : Université Paul Sabatier; 328p.

Kleerebezem ,M., Quadri ,L. E. N., Kuipers ,O. P. et De Vos W. M., 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24(5): 895-904.

Kubota, H., Shouko, S., Nomura ,N., Tokuda ,H., Hiroo ,U. ,2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106 (4): 381–386.

Kumar, CG., Anand, SK., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.

### L

La barre, S., and Haras, D. ,2005.« Encounters with marine bacteria », *Journal de la Société de Biologie* 201, 281-289.

Lavigne ,T. , Diguio, N., Tronel, H., Moulin, V., Kammerer ,L., Hartemann ,P.,2005 .Epidémie de colonisation à *E. faecium* dans un CHU: étude cas-témoin. In 25ème RICAI 2005, Paris, 1-2 Déc 2005, P,abstract 133/33G.

Le blog, d'albert amgar,. (amgar,blog ,process alimentaire,com-ISSN :2271-8311) 2012.

Lee ,A ,2014 .Global safety of fresh produce .Chapter :Commercial and novel solutions for fresh produce safety , organic acid -based sanitizers.

Le gentil ,C., Sylla ,Y., Faille ,C ,. 2010. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *J. Food Eng.*, 96: 37-42.

Le minor ,L., et Richard, C.,. 1993. Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur.

Leyral ,G.,VIERLING,E.,2001.microbiologie et toxicologie des aliments.Hygiène et sécurité alimentaire.3ème édition : Tec et Doc, Lavoisier.Paris.P :62.

Lin,S., Schraft, H., Odumeru, JA., Griffiths ,MW.,. 1998. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 43(3): 159-171.

Loeb,GI., Neihof ,RA., 1975. Marine conditioning films. *Advances Chemical Series* 145, 319–335.

## References bibliographiques

### M

Madoda ,N.D,. 2014.Étude de l'effet d'agents potentiellement perturbateurs de la structure des biofilms sur la diffusion des macromolécules dans les biofilms de *Streptococcus mutans* :cas de l'EDTA et de l'aspirine. [Mémoire de Master : Chimie]. Montréal : Université de Montréal; 73p.

Malek ,Fadila.,2019.Candian journal of microbiology 65(6),405-420, .

Malek,Fadila .,2013.Le biofilm en industrie laitière :caractérisation,facteur de développement et élimination. Cas du biofilm de bacillus cereus dans quelques laiteries de la région de Tlemcen.

Marchand, S. J., De Block, V.e., De Jonghe, A., Coorevits, M., Heyndrickx, L., Herman., 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11: 133-147.

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

Mcelandowney,S., and Fletcher,M.,1988. Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. *Microb. Ecol.* 16, 183–195.

Meer, R.R., Bakker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W., 1991. Psychotrophic Bacillus spp. In fluid milk products: a review. Journal of Food Protection 54: 969–979.

Miller, M. B., et Bassler, B. L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1): 165-199.

Mingming ,Zoua., Donghong, Liu.A., 2018. systematic characterization of the distribution, biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory . Food Research International 113 316–326.

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

Muhsin ,J., Ufaq ,T., Tahir ,H., et Saadia ,A., 2015. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4: 1-1.

Musk ,D.J., Banko ,D.A., and Hergenrother, P.J., 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Chemistry et Biology; 12: 789- 799.

## References bibliographiques

---

Myriam, Auger ., 2012. "Formation de biofilm in vitro par des souches chimiques d'*Escherichia coli*: impact de la modification des conditions expérimentales." 90: 90.

### N

Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Roderiguez –cerrato ,V., Ruiz V., Ponte ,M.C., et Soriano, F., 2010. Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-l-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Hospital Infect*, 76: 165-170.

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

### O

Ouchar Mahamati,O., Tidjani2,A .,Savadogol, A., Abakabir Mahamati, M. K., Somdal, A.S Traorel., 2013.ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES PRODUCTRICES DES BIOFILMS ISSUES DES PRODUITS ALIMENTAIRES Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 7, N°2, p : 187-210.

Ortega, M. P., Hagiwara, T., Watanabe, H., Sakiyama, T., 2010. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. *Food Control*. 21:573–578.

Othmani,A.,2014.Médiation chimique entre l’algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface. [Thèse de doctorat : Ecologie Chimique Marine]. Toulon : Université de Toulon,; 273p.

### P

Parkar ,S.G., S.H, Flint; J.D, Brooks., 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 96: 110-116.

Patti ,JM., Allen, BL., McGavin ,MJ., *et al.* 1994 MSCRAMM- mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48: 585-617.

Payal ,Gupta .,Parul A, Pruthi,. Vikas ,Pruthi, .2019.introduction à l’ingénierie des Biofilms,17-57, .

Pearson ,L-J,. Marth ,EH,. 1990.*Listeria monocytogenes* -threat to a safe supply : a review. *Journal of Dairy Science* 73: 912-928 .

Ponce, Adrian,. Stephanie A, Connon,. and Pun To Yung,. 2008. "Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens." *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. Springer New York. 481- 523.

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

## References bibliographiques

---

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 (2): 285-93.

### R

Racha, A. N., Abu Shady, H.M., Hussein ,H.S., 2012.Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic .13: 269–274.

Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M., González-Rico ,C., Fortún , R. Escudero, J., et al., 2019.Formation de biofilm par des souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de receveurs de transplantation d'organes solides Rapports scientifiques , 9 , p. 8928.

Rochemonteix ,C.A.,2009. Les biofilms et la peau. [Thèse de doctorat : Vétérinaire]. Creteil : Ecole Nationale Vétérinaire, ; 141p.

Rosyne ,Lagrafeuille,,2016. Activités anti-biofilm de Lactobacillus vis-à-vis de Klebsiella Pneumoniae. Médecine humaine et pathologie. Université d’Auvergne - Clermont-Ferrand I, .Français. NNT : 2016CLF1PP03.

Roux ,A., et Chigo ,J.M., 2006. Les biofilms bactériens. *Communication, Bull. Acad. Vêt*, 261-268.

Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. International Journal of Food Microbiology 96, 263–272.

### S

Sadiq, F. A., Flint, S., Yuan, L., Li, Y., Liu, T., & He, G., 2017. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. International Journal of Food Microbiology, 262, 89–98.

Salmeron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. and Barron, L.J.R.,2002. effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe’s milk for cheese making. Food Microbiol, 19: 167-174.

Sauer, K., Culen, MC., Rickard, AH., *et al.* 2004. Characterization of nutrient- induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.*, 186 (21): 7312- 7326.

Shakerifard ,P., Gancel, F., Jacques, P., Faille ,C., 2009. Effect of different Bacillus subtilis lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of Bacillus cereus 98/4 spores to stainless steel and Teflon. Biofouling., 25:533-41.

## References bibliographiques

---

Sharma, M., and S.K. Anand. 2002. Characterization of constitutive of microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food microbiology* 19: 627-636.

Shea C., Nunley J. W., Williamson J. C., Smith-Sommerville H. E. 1991. Comparison of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharide-defective mutant strain DMR. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3107–3113.

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.

Simon ,M., Hansen, P., 2001. Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavor of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 84(4): 767-73.

Sinde ,E., Carballo ,J.,2000. Attachment of *salmonella spp* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetraflu- orethylene: The influence of free energy and the effect of com- mercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17:439–447.

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.

Stanley, P.M., 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* 29:1493–1499.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies ,D.G., Costerton ,J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology.* 56: 187-209.

Sutherland ,J.W., 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9: 222-227.

Sutra, L., Federighi ,M., et Jouve, J.L.,1998. Manuel de bactériologie alimentaire. Edition Polytechnica. 9p.

### T

Ternstroöm, A., Lindberg ,A.M., Molin ,G., 1993. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*, *J. Appl. Microbiol.* (19) 528–540.

Toyofuku, M., Inaba T., Kiyokawa ,T., Obana N., Yawata, Y., et Nomura, N., 2016. Environmental factors that shape biofilm formation, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80: 1, 7-12.

## References bibliographiques

---

Trautner ,B.W., Darouiche ,R. O. 2009. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, 32 (3), 177–183.

### V

van houdt ,R., and Michiels, CW.,2010. « biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface », *Journal of Applied Microbiology* 109, 1117-1131.

Velraeds ,M.M.C., Van der Mei ,H.C., Reid ,G., Busscher ,H.J.j., 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (6): 1958-1963.

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

Vignola, C.,2002. Science et Technologie du lait Transformation du lait. Edition presse internationale polytechnique, CANADA. pp375.

Vilar, M. J., Yus, E., Sanjuan, M. L., Dieguez, F. J., & Rodriguez-Otero, J. L. 2007. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 5083–5088.

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

### W

Wang,H ., J. Qi ., Dong,Y., ., Y. Li ., X. Xu ., G. Zhou,G., 2017. Caractérisation de l'attachement et de la formation de biofilm par les souches d' entérobactéries transmises par la viande associées à l'altération *Lebensmittel-Wissenschaft& Technologie* , 86 , pp. 399 – 407.

Westhoff ,D.C., Dougherty, S.L., 1981. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk, *J. Dairy Sci.* (64) 572–580.

Wijman, JGE., de Leeuw, PPLA., Moezelaar, R., Zwietering, MH., Abee, T., 2007. Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Appl Environ*.

Wingender, Jost Neu., Thomas ,R., & Flemming, Hans-Curt. 1999. *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function*. Springer.

Wong ,A. C. L., 1998. Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* 81: 2765-2770.

## References bibliographiques

---

### Y

Yannick, D.N., Skander, T., Mario Jacques ,H., 2014 . Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Canadian Journal of Veterinary Research, 78:110-116.

### Z

Zurob,E., Dennett,G ., Gentil,D., Montero-Silva,F ., Gerber,U ., Naulín,P ., et al .,2019 Inhibition de la formation du biofilm d' Enterobactercloacae sauvage par des surfaces nanostructurées de graphène et de nitrure de bore hexagonal Nanomatériaux , p. 49.

**ANNEXES**

### ANNEXES:

#### Annexes 01 :

##### **BoullionTSB**

Tryptone .....	17g
Peptone papainique de Soja .....	3g
Glucose .....	2.5g
Sels biliaries .....	1.5g
Chlorure se sodium .....	5g
Phosphate dipostassique .....	4g
Novobiocine .....	0,020g
Eau distillée .....	1000ml

##### **Bouillon nutritif**

Peptone .....	10g
Extrait de levueur .....	5g
Chlorure de sodium .....	5g
Eau distillée .....	1000ml

##### **Cristal violet :**

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

##### **PBS**

Chlorure de sodium.....	8g
Chlorure de potassium.....	2g
Phosphate disodique.....	1.44g
Phosphate monopotassique.....	0.24g
Eau distillé.....	1L