

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 froide à former des bofilms

Présenté par :

Mahmoudi Bouchra
Ben hadj djilali Merieme

Devant le jury :

Mme Zaoudi N	MAA	Présidente	UDB Khemis miliana
Mr Achek R	MCB	Examineur	UDB Khemis miliana
Mme DIDOUH N	MCB	Promotrice	UDB Khemis miliana

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements :

El hamdolillah de nous avoir donné le courage la patience et la puissance pour achever ce travail modeste

*On exprime nos profonds remerciements à l'encadreuse de ce mémoire, madame **Didouh N**, pour sa grande disponibilité, son écoute et son suivi tout au long de ce travail. Ainsi que pour sa patience et sa compréhension des situations diverses et variées et son encouragement à finir ce travail.*

On espère qu'elle trouve dans ces mots toute notre reconnaissance pour leurs précieux conseils.

- *Je remercie Mme **Zaoudi N.**, maitre assistant, chargée de cours, au département de Biologie, UDB Khemis miliana, pour avoir fais l'honneur de présider le jury.*
- *Je remercie Mr **Achek R.**, maitre de conférences, chargée de cours au département de Biologie, UDB Khemis miliana, pour avoir fait l'honneur de juger et d'examiner notre travail.*
- *On tient à remercier **DR Guitarni Hassina** pour leur encouragement et sa disponibilité*

On tient à remercier nos parent sans eux on ne serait pas là, merci pour votre soutien le long de la route, merci de nous avoir encouragé e de nous avoir poussez à montrer notre mieux.

On tient à remercier tous ceux qui nous sont chères d'être dans notre vie, et de nous soutenir le long du chemin

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à ce travail de près ou de loin

Dédicace :

Je dédie se travail :

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 celle qui m'est chères au cœur **souhila,loubna** mes vrais sœur votre place sera toujours préservée dans mon coeur, merci d'être dans ma vie, merci d'être la lumière qui me guide dans les ténèbres, que Allah vous garde et vous protège.*

*A mes chères sœurs :**lamia ;latifa ;hadia ;linda** merci d'être dans ma vie*

*Sans oublie mes chères nièces :**lilia ;anias ;miral** et mon petit neveu :**youness***

*A mes chers beaux frères : **ababdelhafid ;bouabdellah***

*A mon cher ami :**nabil***

*Chère meilleure amie avant d'être binôme : **merieme***

A Mes enseignants

Bouchra

Dédicace :

*C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que
je dédie ce modeste travail qui est le fruit de ma
profonde reconnaissance à :*

Mes parents, que dieu les gardes et les protèges.

*Leur amour, leur patience, leur soutien et leurs encouragements a fait de moi ce
que je suis aujourd'hui.*

Mes chères sœurs :

Hadil , Malak .

Familles : Ben hadj djilali , Gherarba

*Chère meilleure amie avant d'être binôme : **Bouchra.***

Mes enseignants

Tous ceux que j'aime et m'aime dans le monde.

Meriem

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures et des tableaux

Introduction générale	1
Partie 1 : Synthèse BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
1. Définition :.....	2
2. Les étapes de formation de Biofilm :	2
2.1 Film de conditionnement :.....	3
2.2 L'adhérence réversible :.....	3
2.3 L'adhérence irréversible :	3
2.4 Le développement précoce du biofilm :.....	3
2.5 La maturation du biofilm :	4
2.6 Le détachement du biofilm :	4
3. Régulation de la formation des biofilms :	5
3.1 Matrice extracellulaire (EPS) :.....	5
3.2 Définition et mécanismes le quorum sensing :.....	6
4. Les constituants d'un biofilm :.....	6
5. Biofilms laitiers :.....	7
6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :	7
6.1 Caractéristiques de la surface :	7
6.1.1 Rugosité de la surface :	7
6.1.2 Propriétés physico-chimiques de la surface :.....	8
6.1.3 Présence de films protéiques sur la surface :.....	8
6.2 Caractéristiques du milieu :	8
6.2.1 Température :.....	9
6.2.2 pH :.....	9
6.2.3 Concentration en oxygène.	10
6.2.4 Concentration en fer :.....	10
6.2.5 Osmolarité :.....	10
6.2.6 Sources de carbone disponibles :	10
6.2.7 Concentrations en nutriments :.....	10
6.2.8 Concentrations en certains cations :.....	11
6.2.9 Hydrodynamique du fluide :.....	11
6.3 Propriétés des cellules :	11

7. Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières :.....	11
8. Prévention et élimination des biofilms :	13
1. Evaluation de la formation de biofilm.....	15
1.1 L'identification bactérienne des isolats :	15
1.2 Méthode de culture sur microplaque (TCP) sous différents conditions :.....	15
1.2.1. Souches bactériennes et des conditions de croissance :.....	16
Partie III: Résultats et discussion.....	18
Conclusion	27
Référence bibliographique :.....	28
Annexe :	38

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AT : Acides téichoïques
BN : bouillon nutritif
CIP: cleaning in place
DO: La densité optique
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
NaCl : chlorure de sodium
PBS: Phosphate Buffered Saline
pKa : constante d'acidité
PS : surfaces de polystyrène
Ra: rugosité moyenne arithétique
RMN : Résonance magnétique nucléaire
TCP : Méthode de culture sur microplaque
TSB : Trypticase Soja Broth
UFC: unité formant colonies

Liste des figures et des tableaux

Figure 1: Formation d'un biofilm par <i>Listeria monocytogenes</i> isolé à partir de lait cru (Chavant <i>et al.</i> , 2013).....	2
Figure 2: Les six étapes de la formation d'un biofilm (Characklis, 1990).....	4
Figure 3: la Matrice extracellulaire et Les constituants d'un biofilm (Goetz <i>et al.</i> , 2016).....	5
Figure 4: Régulation de la formation des biofilms : le quorum sensing (Steinmoen <i>et al.</i> , 2002).....	6
Figure 5: Formation de biofilm en microplaque. (Bellifa, 2014)	17
Figure 6: Principales sources de microorganismes pour le lait (schéma d'après Denis <i>et al.</i> , 2004 ; Bouton <i>et al.</i> , 2007 ; Vacheyron <i>et al.</i> , 2011).....	20
Figure 7 : la capacité de formation de biofilm dans le milieu BN à une température de 37°C.....	23
Figure 8: la capacité de formation de biofilm dans le milieu BN à une température de 55°C.....	23
Figure 9 : la capacité de formation de biofilm dans le milieu TSB à une température de 37°C	24
Figure 10: la capacité de formation de biofilm dans le milieu TSB à une température de 55°C	24
Tableau 1: Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie pendant la saison froide	18

Résumé :

La formation de biofilms par des bactéries pathogènes sur les canalisations de fabrication des produits laitiers constitue une menace importante à la sécurité de l'industrie laitière. L'objectif de cette étude était d'évaluer la diversité de la microflore adhérente aux surfaces des canalisations post et pré-pasteurisation et sa capacité à former des biofilm sur des surfaces en polystyrène. Cinquante neuf isolats ont été obtenus à partir de 6 prélèvements réalisés d'une laiterie GIPLAIT durant la saison froide. L'identification des souches a été faite par la technique MALDI-TOF. Parmi les 59 souche étudiées : 39 ont été affiliées au genre *Bacillus* ,7 au genre *Enterococcus* ,2 au genre *Staphylococcus* , 4 au genre *Enterobacter* et 1 au genre *Leclercia*. La plupart des souches ont montré l'incapacité à former des biofilms sur PS en présence de BN où TSB dans différentes température (ex, 37 ° C et 55 ° C), seulement *Enterococcus faecium* a montré une capacité modérée à former des biofilms sur PS en présence de BNet *Enterobacter cloacae* a montrée une faible capacité de formation de biofilm sur PS en présence de TSB .

Mots clés : Biofilm, BN,TSB, MALDI-TOF ,PS , TCP.

Abstract:

The formation of biofilms by pathogenic bacteria in the manufacture of dairy products poses a significant threat to the safety of the dairy industry. The objective of this study was to evaluate the diversity of the microflora attached to various surfaces of the raw milk processing lines to form a biofilm, Fifty nine isolates were produced from 6 samples taken from a GIPLAIT dairy cold saison. Strain identification was done by MALDI-TOF. Biofilm production by bacterial strains was created on polystyrene (PS) surfaces by the crystal violet staining method. In particular, the effects of temperatures (eg, 37 ° C and 55 ° C) and growth media (eg, BN and TSB) on biofilm production by these species were explored. Among the 59 strains studied, 39 were affiliated to the genus *Bacillus*, 7 to the genus *Enterococcus*, 2 to the genus *Staphylococcus*, 4 to the genus *Enterobacter* and 1 to the genus *Leclercia*. Most strains showed the inability to form biofilms on PS in the presence of BN or TSB in different temperatures (eg, 37 ° C and 55 ° C), only *Enterococcus faecium* showed moderate ability to form biofilms on PS in the presence of BN. and *Enterobacter cloacae* showed a low capacity for biofilm formation on PS in the presence of TSB.

Keywords: Biofilm, BN, TSB, MALDI-TOF, PS, TCP .

الملخص :

يشكل تكوين الأغشية الحيوية بواسطة البكتيريا المسببة للأمراض تهديداً كبيراً لسلامة صناعة الألبان. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تنوع الميكروفلورا المرتبطة بالأسطح المختلفة لخطوط تصنيع الحليب الخام لتشكيل غشاء حيوي ، تم الحصول على 59 عزلة من 6 عينات مأخوذة من منتجات ألبان GIPLAIT في منطقة تلمسان. تم تحديد السلالة بواسطة MALDI-TOF وتم تقييم إنتاج البيوفيلم بواسطة السلالات البكتيرية على أسطح البوليسترين (PS) بواسطة طريقة التلوين البلوري البنفسجي. على وجه الخصوص، تم استكشاف تأثيرات درجات الحرارة (على سبيل المثال، 37 درجة مئوية و 55 درجة مئوية) ووسط النمو (على سبيل المثال ، BN و TSB) على إنتاج الأغشية الحيوية بواسطة هذه الأنواع. من بين 59 سلالة تمت دراستها، 39 منها تنتمي إلى جنس *Bacillus* ، و 7 إلى جنس *Enterococcus* ، و 2 إلى جنس *Staphylococcus* ، و 4 إلى جنس *Enterobacter* ، و 1 إلى جنس *Leclercia* . أظهرت معظم السلالات عدم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية على PS في وجود BN أو TSB في درجات حرارة مختلفة (على سبيل المثال ، 37 درجة مئوية و 55 درجة مئوية) ، في حين أظهر *Enterococcus faecium* قدرة معتدلة على تكوين الأغشية الحيوية على PS في وجود BN . بالإضافة الى *Enterobacter cloacae* الذي أظهر قدرة منخفضة على تكوين الأغشية الحيوية على PS في وجود TSB.

الكلمات الرئيسية : بيوفيلم، تقنية زراعة الانسجة PS, TSB, BN, TCP, MALDI-TOF

Introduction générale

Introduction générale

La contamination microbienne de la surface des équipements utilisés en industrie agroalimentaire est à l'origine de problèmes d'altération de la qualité des produits alimentaires, ainsi que de la perte ou la diminution des rendements et l'augmentation des coûts de production. Ces microorganismes peuvent non seulement entraîner l'altération et la dégradation prématurée des produits au cours de la fabrication, mais également se trouver aussi dans le produit fini et par conséquent être la cause potentielle de toxi-infections alimentaires.

Cette contamination est due à l'adhésion bactérienne aux surfaces des équipements qui favorisant la formation de biofilms qui résistent aux agents antimicrobiens. Ce qui entraîne à des difficultés dans leur élimination par les systèmes de nettoyage /désinfection à partir des tuyaux et des canalisations, ce qui constituer un vrai problème en l'industrie laitière.

Parmi ces microorganismes, la flore bactérienne sporulée domine dans les entreprises qui utilisent la technologie de la pasteurisation telle que l'industrie laitière. Les spores adhèrent facilement aux divers matériaux tels que l'acier inoxydable et le polymère et sont activées par ce traitement thermique modéré. Ce qui permet leur germination, leur multiplication et la formation de biofilm et leur persistance sur les équipements laitiers **(Malek, 2013)**.

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 travail comporte trois grandes parties :

- I.** Une mise au point bibliographique permet d'étudier et traiter les connaissances actuelles sur les biofilm.
- II.** Une partie pratique comprenant : l'identification d'une collection de souches isolées à partir des canalisations d'une usine laitière durant la saison froide par la technique de MALDI- TOF , et la détection de la capacité de ces souches à formé des biofilms par la méthode TCP .
- III.** Une troisième partie rend compte des résultats expérimentaux obtenus. Enfin, nous présenterons une principale conclusion et quelques perspectives de ce travail.

Partie I

Synthèse

bibliographique

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Partie 1 : Synthèse BIBLIOGRAPHIQUE

1. Définition :

Les biofilms dans la nature sont composée principalement de micro-organismes viables et non viables, qui sont irréversiblement attachés à un substrat ou une interface ou les uns aux autres et noyés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires(EPS) qu'ils ont produites (Donlan et Costerton, 2002 ;Chmielewski et Frank, 2010). Ces biofilms sont des sources potentielles de contamination bactérienne (Høj *et al.*, 2006; Giaouris et Nychas, 2006). Dans l'industrie laitière, cette présence des biofilms a provoqué une post-contamination, qui va entraîner une réduction de la durée de conservation des produits et la transmission de maladies (Sharma et Anand, 2002).

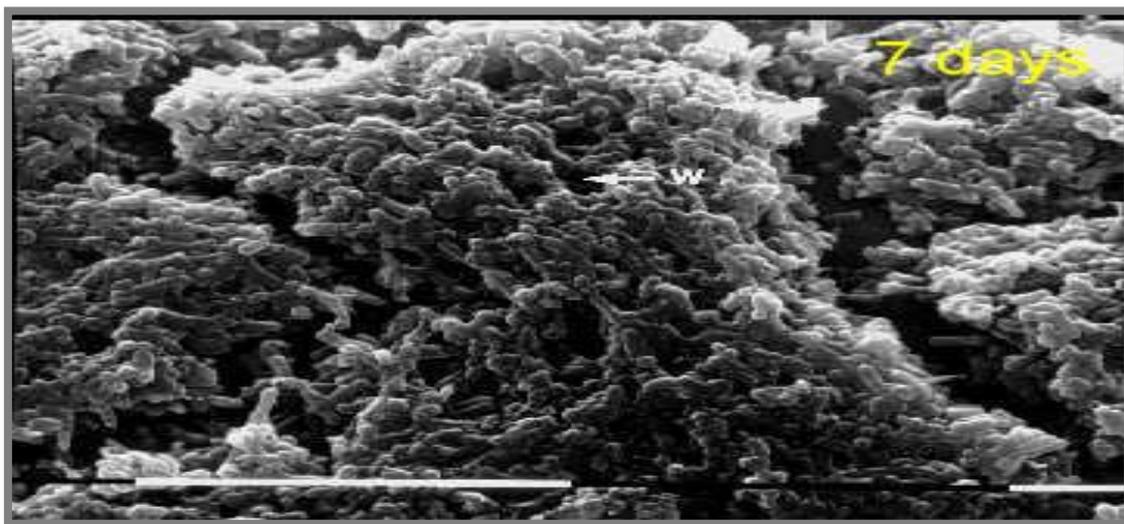


Figure 1: Formation d'un biofilm par *Listeria monocytogenes* isolé à partir de lait cru (Chavant *et al.*, 2013)

2. Les étapes de formation de Biofilm :

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (Annous *et al.*, 2009), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (Vu *et al.*, 2009). Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques et/ ou sur les équipements de l'industrie

Partie 1 : Synthèse bibliographique

agroalimentaire (**Talaro, 2008**). Les différentes étapes de contamination d'une surface sont régies par le quorum-sensing (QS) et d'autres régulateurs génétiques (**Ahmad et al., 2013**).

2.1 Film de conditionnement :

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

2.2 L'adhérence réversible :

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

2.3 L'adhérence irréversible :

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

2.4 Le développement précoce du biofilm :

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

Partie 1 : Synthèse bibliographique

2.5 La maturation du biofilm :

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

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

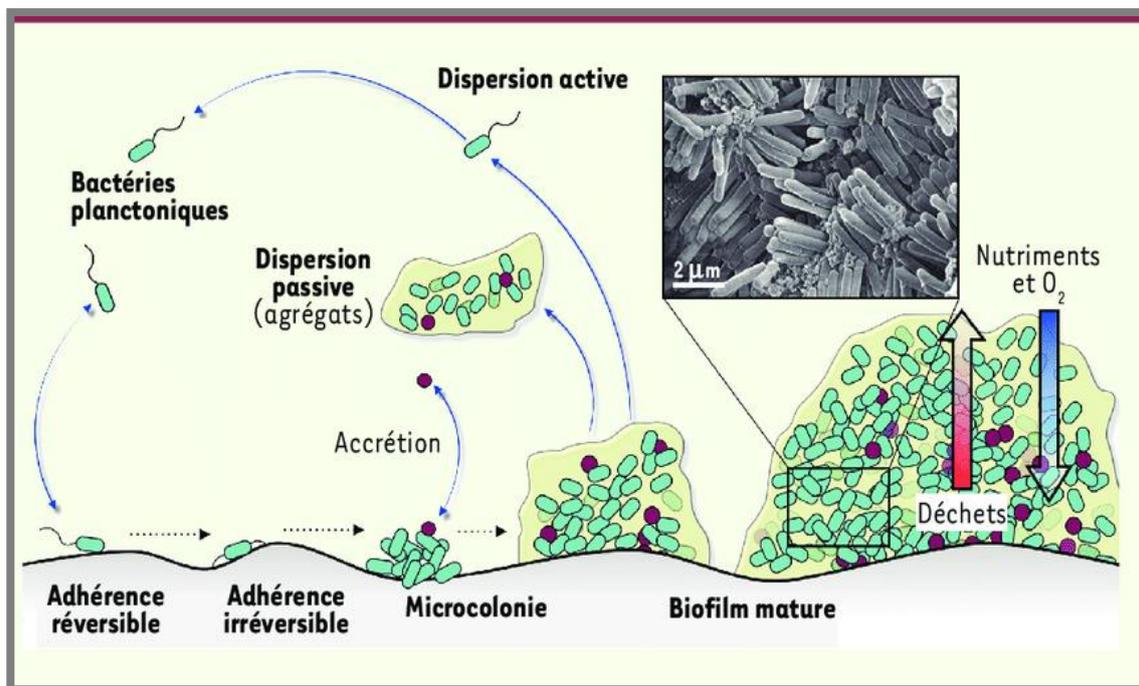


Figure 2: Les six étapes de la formation d'un biofilm (Characklis, 1990).

2.6 Le détachement du biofilm :

Les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnement après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010). Comme pour

Partie 1 : Synthèse bibliographique

les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries (Joshi *et al.*, 2010). Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi *et al.*, 2010).

3. Régulation de la formation des biofilms :

3.1 Matrice extracellulaire (EPS) :

La matrice extracellulaire est un composant important des biofilms (Colagiorgi *et al.*, 2016). Les exopolysaccharides, les protéines et ADN (Acide désoxyribonucléique) sont les principales molécules composant la matrice du biofilm de plusieurs bactéries (Flemming *et al.*, 2010). Des études axées sur la caractérisation des biofilms listériens ont montré la présence de toutes ces structures. En particulier, les acides téichoïques (AT) représentent les principaux polysaccharides, l'analyse RMN (Résonance magnétique nucléaire) ainsi que des études mutationnelles ont montré la présence d'AT dans les biofilms et leur rôle dans la formation des biofilms (Alonso *et al.*, 2014 ; Brauge *et al.*, 2016). Les EPS jouent le rôle important dans l'attachement et la colonisation des micro-organismes sur des surfaces des équipements de l'industrie agroalimentaire et jouent le rôle d'une barrière (Morton *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2005) qui protège les bactéries de toute agression extérieure telle que le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et (Goetz *et al.*, 2016).

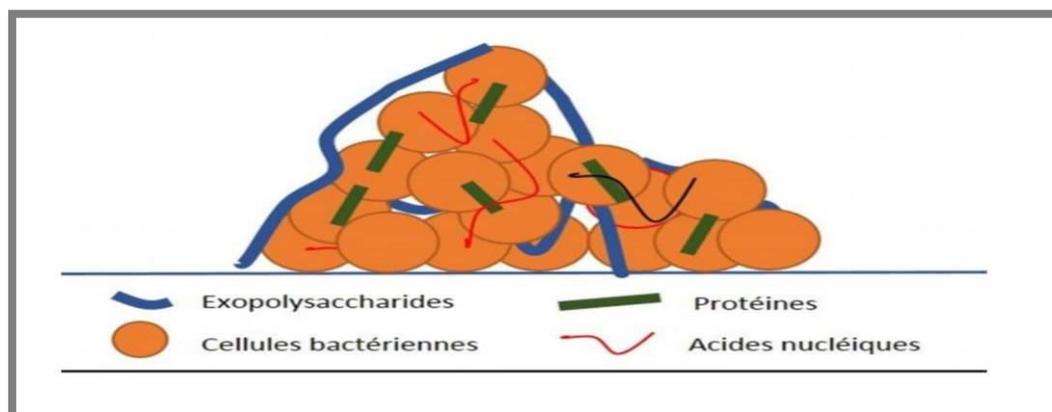


Figure 3: la Matrice extracellulaire et Les constituants d'un biofilm (Goetz *et al.*, 2016)

Partie 1 : Synthèse bibliographique

3.2 Définition et mécanismes le quorum sensing :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. Le Quorum Sensing est un mécanisme régulateur très répandu parmi les bactéries à Gram négatif. Il contrôle la sécrétion de facteurs de pathogénicité, la formation de biofilm, le mécanisme de conjugaison et la bioluminescence (Miller et Bassler, 2001).

La détection du quorum permet aux cellules bactériennes de réguler l'expression des gènes en réponse à la variation de la densité de la population cellulaire. Les cellules bactériennes produisent des signaux chimiques extracellulaires (petites molécules ou peptides), qui pourraient s'accumuler dans un environnement local à des niveaux critiques et ainsi réguler l'expression de voies spécifiques en réponse à la densité de population (Papenfort *et al.*, 2016 ;Whiteley *et al.*,2017).

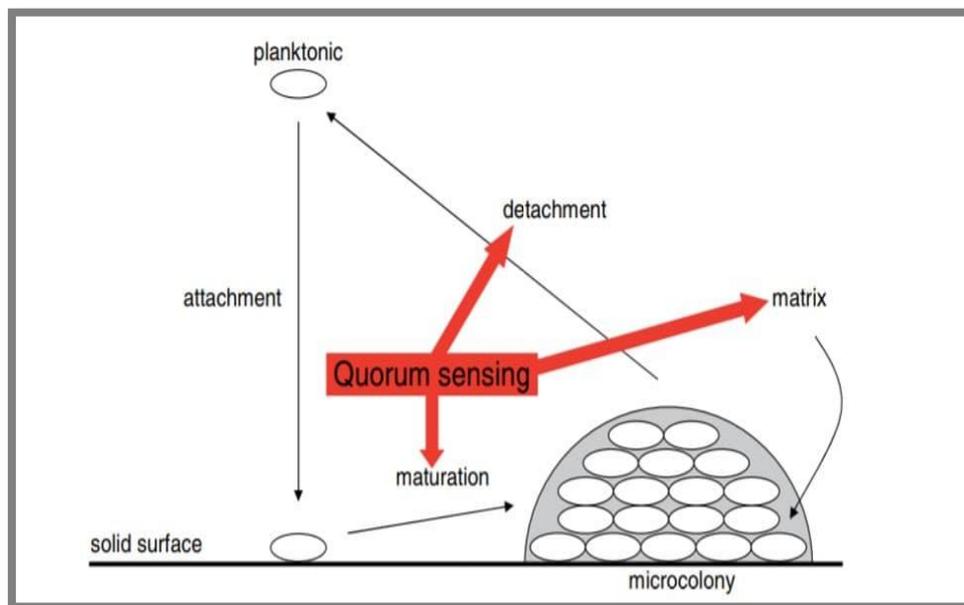


Figure 4:Régulation de la formation des biofilms : le quorum sensing (Steinmoen *et al.*, 2002).

4. Les constituants d'un biofilm :

Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes (Tremblay, 2014). Ces cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée (>90% d'eau) et composée d'exo-polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Cependant, leur répartition est fonction de l'espèce concernée. Par exemple, chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-

Partie 1 : Synthèse bibliographique

acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin »). (Aricol *et al.*,2015).

5. Biofilms laitiers :

Il existe deux types de biofilms dans l'industrie laitière. D'abord, les biofilms environnementaux sont ceux qui se développent lentement sur toutes les surfaces humides qui ne sont jamais en contact avec les produits laitiers (drains, planchers, murs, plafonds (Breme *et al.*, 2015). *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp. et *Streptococcus thermophilus*. Ces dernières sont souvent retrouvées sur les surfaces des salles de fabrication fromagère (Bokulich, 2013). Les contaminations associées à ces biofilms sont indirectes. À l'inverse, les biofilms de procédé se développent sur les surfaces internes des équipements. Ils sont généralement peu diversifiés (dominés par peu bactériennes) et se développent beaucoup plus rapidement la plus courante *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, etc trouvés dans réservoirs de lait, systèmes de filtrations opérés à froid, équipements à la température < 20 °C (Neubeck *et al.*, 2015) . Les biofilms de procédé sont les plus problématiques pour l'industrie (Bouman *et al.*, 1982) .La composition des biofilms retrouvés dans l'industrie laitière dépend fortement aux facteurs de l'environnement dans lequel ils se développent (Seale *et al.*, 2015).

6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

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

6.1 Caractéristiques de la surface :

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

6.1.1 Rugosité de la surface :

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

Partie 1 : Synthèse bibliographique

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

6.1.2 Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**). Les caractéristiques hydrophobes des spores de *B. cereus* ont comme conséquence l'adhérence sur des surfaces des matériaux fréquemment utilisés en industrie agroalimentaire comme l'acier inoxydable (**Faille et al., 2001 ; Lelievre et al., 2001; Peng et al., 2001; Faille et al., 2002 ; Tauveron et al., 2006**).

6.1.3 Présence de films protéiques sur la surface :

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

6.2 Caractéristiques du milieu :

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

Partie 1 : Synthèse bibliographique

6.2.1 Température :

La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres Physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**). L'effet de la température sur l'attachement de *Yersinia enterocolitica* et *Listeria monocytogenes* a été également montré par **Herald et Zottola, (1988a)** et **Herald et Zottola, (1988b)** qui ont signalé que *Y. enterocolitica* adhère mieux à l'acier inoxydable à 21°C par rapport à 35°C ou à 10°C et pour *L. monocytogenes* cultivé dans le Trypticase Soja Broth (TSB) à un pH de 8 à 21 ° C dans le cas des *Streptococcaceae* tels que *Streptococcus thermophilus*, qui résiste à la pasteurisation du lait, mais dont la température optimale de croissance se trouve autour de 35 °C, selon la souche (**Keren et al.,2004**). Selon **Bridge et al,(1983)** *S. thermophilus* peut se développer jusqu'à 52 °C, mais ne croît généralement pas à une température inférieure à 10 °C.

Les biofilms formés par *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus stearothermophilus* se forment principalement dans les sections à température élevée (40–65 ° C) (**Sadiq et al., 2017**). *B.licheniformis* est capable de croître à la fois mésophile et thermophile à des températures comprises entre 30–55 ° C (**Hill et Smythe, 2012**). Bien que la plupart des isolats de *Bacillus licheniformis* sont identifiés comme des agents de formation de biofilm à 37 ° C, trois isolats ont montré une tendance de formation de biofilm à 55 ° C (**Zain et al., 2015**).

6.2.2 pH :

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

Partie 1 : Synthèse bibliographique

6.2.3 Concentration en oxygène.

6.2.4 Concentration en fer :

Le fer est un élément indispensable au métabolisme bactérien. Son rôle de donneur/accepteur d'électrons lui permet de soutenir le fonctionnement de la chaîne respiratoire en conditions aérobies ou anaérobies. Ce métal agit également comme cofacteur de réactions enzymatiques et est le composant majeur de certaines protéines. Les besoins en fer des bactéries sont de l'ordre de 10⁵ ions Fe²⁺ par cellule (**Braun, 2001**). *P. aeruginosa* de très faibles concentrations en fer défavorisent la formation de biofilm. (**Singh et al., 2002**)

6.2.5 Osmolarité :

Les bactéries sont capables de vivre dans des milieux extrêmement variés car elles possèdent des systèmes de protection efficaces contre les différents stress qu'elles peuvent rencontrer. Les bactéries lactiques vivent dans des habitats où l'osmolarité est souvent élevée et varie énormément, alors que la pression osmotique intracellulaire doit rester relativement constante. Lorsqu'une bactérie subit un stress osmotique, dû à une forte augmentation de la concentration en sel dans l'environnement, sa croissance est arrêtée. (**Romeo et al., 2001**) par exemple, une augmentation de la concentration en sel dans le milieu externe entraîne un arrêt de croissance des bactéries. Ainsi, la croissance de *L. lactis* dans un milieu à 2,5 % NaCl « chlorure de sodium » (concentration proche de celle rencontrée dans certains fromages) est réduite de 25 % à 50 % par rapport à une croissance à pression osmotique normale (**Kilstrup et al., 1997**).

6.2.6 Sources de carbone disponibles :

Elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez, 2007**).

6.2.7 Concentrations en nutriments :

Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**). Pour des espèces de *Pseudomonas*, le phosphore, l'azote, et le fer peuvent exercer un effet crucial sur la structure de biofilm. (**Singh et al., 2002 ; Banin et al., 2005 ; Thompson et al., 2005 ; Monds et al., 2007**). Des souches de Staphylocoques poussent sur un milieu synthétique contenant entre autre du glucose, des sels minéraux, 14 acides aminés dont la cystéine, la vitamine B1 et l'acide nicotinique (**Couderc et al., 2014**).

Partie 1 : Synthèse bibliographique

6.2.8 Concentrations en certains cations :

L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988).

6.2.9 Hydrodynamique du fluide :

Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

6.3 Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface.

L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (Donlan, 2002). La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Les fimbriae (ou pili) de type 1 sont des adhésines protéiques filamenteuses communément exprimées à la fois par les isolats commensaux et pathogènes d'*E. coli* (Sauer *et al.*, 2000). Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre les cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries à Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes.

Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles tel que d'*E. coli* (Donlan, 2002).

7. 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). Plusieurs espèces bactériennes intéressent particulièrement

Partie 1 : Synthèse bibliographique

l'industrie agroalimentaire à cause de leur capacité à causer des infections ou des toxi-infections alimentaires chez l'homme (**Van Houdt et Michiels,2010 ; Jacques et Tremblay,2010**). Les *Campylobacter* thermophiles, *C.jejuni* et *C.coli*, sont responsables d'un grand nombre d'infections gastro-intestinales. Ces bactéries peuvent former des biofilms et survivre sur les surfaces d'équipement des usines de transformation (**Sulaeman et al., 2010**). Ils 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 thérapies antimicrobiennes conventionnelles sont souvent efficaces à moins de 50% (**Gill et al., 2006**), entraînant des pertes économiques importantes dans l'industrie laitière.

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**). En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (**Olson et al.,2002;Ceri et al., 2010**). par exemple , Les salmonelles d'un biofilm sont plus résistantes à l'action des désinfectants que les salmonelles planctoniques (**Wong et al.2010**).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance (certains auteurs préfèrent plutôt parler d'une tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens (**Anderson et O'Toole ,2008; Hall-Stoodley et Stoodley ,2009 ; Ceri et al.2010**). Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi lier certains agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient d'oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante; ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (**Lewis ,2008**). Bien que d'autres études récentes ont montré que la CSH (l'hydrophobicité de la surface cellulaire) joue un rôle crucial dans la formation de biofilms et la résistance aux agents antimicrobiens des bactéries à Gram positif (**Nithyanand et al . 2010 ; Lather et al . 2016**).

Compte tenu des différents facteurs décrits précédemment, les micro-organismes adhérentes 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 formé sur les canalisations ou d'autres surfaces dans l'environnement de traitement des denrées alimentaires

Partie 1 : Synthèse bibliographique

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**).

8. Prévention et élimination des biofilms :

Beaucoup de travaux ont cherché à améliorer l'efficacité du nettoyage en place (NEP) en étudiant le rôle des produits chimiques (**Peng et al. 2002**), de la température (**Wilson, 2005**), du temps de contact (**Lelièvre et al., 2002**), des propriétés des matériaux (**Jullien et al., 2003 ; Speranza et al. 2004; Zhao, 2004 ; Whitehead et Verran, 2006 ; Hadjiev et al.2007; Sheng et al. 2007**). **Palmer et al.2007**) ont également souligné l'importance de la conception des installations sur la facilité du nettoyage des surfaces d'équipement. En effet, l'hydrodynamique est un paramètre principal dans le nettoyage. Cependant, relativement peu d'études (**Lelièvre et al. 2002 ;Herrera et al. 2007**) ont rendu compte de la cinétique de détachement des bactéries adhérentes (**Faille et al. 2013**) . L'implémentation d'une étape de germination avant le NEP peut réduire le -nombre de spores dans la chaîne de fabrication (**Hornstra et al . 2007**).Il existe différentes stratégies permettant d'inhiber la formation du biofilm (**Richards et Melander ,2009 ; Landini et al.2010 ; Yang et al.2012**) . Celles-ci peuvent prévenir l'adhérence initiale du microorganisme, prévenir la croissance microbienne, empêcher la communication entre les cellules bactériennes, inhiber la synthèse de la matrice polymérique ou bien dégrader cette matrice. De plus en plus de recherches sur les biofilms visent à explorer comment les bactéries contrôlent leur formation et à découvrir des composés non toxiques qui peuvent atténuer la formation de biofilms sans permettre aux bactéries de développer une résistance aux médicaments (**Kim et al . 2012**). **Furukawa et al .2009**) ont montré que les esters d'acide gras et de sucre (additifs utilisés comme émulsifiants dans les aliments traités) sont des agents prometteurs pour l'inhibition de la formation de biofilm par des bactéries d'intoxication alimentaire.

Les mécanismes inhibiteurs et les modalités pratiques d'utilisation de ces esters dans les biosurfactants ont plusieurs propriétés qui pourraient être utiles dans beaucoup de domaines de l'industrie alimentaire, leur activité antiadhésive a attiré l'attention comme nouvel outil pour empêcher et perturber les biofilms formés dans des surfaces de contact alimentaire (**Nitschke et Costa, 2007**). L'argent est utilisé pour retarder ou empêcher la formation des biofilms (**Cicalini et al. 2004 ; Gentry et Cope, 2005 ; Ashraf et al. 2014**). La formation de biofilm sur les appareils médicaux implantés est une cause fréquente de rejet d'implant. Plusieurs auteurs rapportent l'inhibition de la formation de biofilm sur de tels dispositifs in vitro en les enduisant

Partie 1 : Synthèse bibliographique

d'argent (**Klueh et al. 2000 ; Hashimoto, 2001**). Les enzymes et les bactériocines sont aussi considérés en tant qu'agents améliorant l'efficacité de nettoyage et de désinfection, cependant, plus d'études devraient être effectuées pour affirmer leur efficacité contre des biofilms. Eviter la formation de biofilm par l'incorporation des produits antimicrobiens dans les matériaux extérieurs (**Weng et al. 1999 ; Park et al. 2004**), ou en modifiant les propriétés physico-chimiques de surfaces (**Whitehead et al. 2004, 2005 ; Rosmaninho et al. 2007**) est également une voie de progrès. Avec des restrictions accrues concernant l'utilisation de biocides et de conservateurs pour des applications industrielles, il existe un intérêt croissant pour la recherche de biocides naturels ou plus écologiques. Le contrôle biologique est défini comme «l'utilisation d'un organisme vivant pour faire baisser la population d'une espèce ou d'un organisme nuisible indésirable» est pratiquée dans le monde de la macro-biologie depuis de nombreuses années (**Biondi et al. ,2013 ; Boulanger ,2019**).

Partie II

Matériel et méthode

Partie II : Matériel et METHODES

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 23 mars jusqu'au 25 avril 2020, au niveau des laboratoires pédagogique de l'université de DJILALI BOUNAAMA khemis miliana.

1. Evaluation de la formation de biofilm

1.1 L'identification bactérienne des isolats :

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 μ L) a été précipité avec 900 μ L d'éthanol (96% vol / vol) et centrifugé pendant 5 min à 10 000 x g. Le culot a été remis en suspension dans 50 μ L d'acide formique à 70% (vol / vol), suivi par l'ajout de 50 μ L d'acétonitrile, le mélange est mis en centrifugation pendant 5 min à 10000 \times g, puis 1,5 μ L 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 μ L 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 .

1.2 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 de lait de vache cru isolées à partir d'une laiterie 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 polystyrène (PS) en présence de bouillon nutritif (BN) ou Bouillon Trypticase Soja (TSB). Pour mesurer le potentiel de

Partie II : Matériel et METHODES

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.

1.2.1. 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 lavés deux fois par une solution saline stérile tamponnée au phosphate nommée le Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4) et remis en suspension dans du BN stérile frais et TSB (concentration finale d'environ 10⁶ UFC (unité formant colonies) / 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 utilisée en 3 fois pour assurer une exactitude des résultats. Parallèlement, un même volume de 200 µl du TSB ou du BN non ensemencé est déposé dans trois puits et servant comme contrôle négatif, la microplaque est incubée à 37°C pendant 24h sans agitation.

Après la durée d'incubation, Les puits ensemencés 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'éliminer les bactéries non adhérentes, puis la microplaque est séchée à une température ambiante en position inversée pendant 30min.

Les puits de la microplaque séchés sont ensuite colorés par 200µl de Crystal violet à 1% dans chaque puit, après 15min le colorant Crystal violet est éliminé et les puits sont rincés 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de colorant non fixé, les plaques sont ensuite séchées à une température ambiante en position inversée. Enfin les puits sont remplis 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 DO est mesurée à 570 nm par le lecteur de microplaque (ELISA) «enzyme-linked immunosorbent assay» (model SafasmonacoMP96) couplé à 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 ($DO_{control} < DO_{570} \leq 2DO_{control}$)

Partie II : Matériel et METHODES

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

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

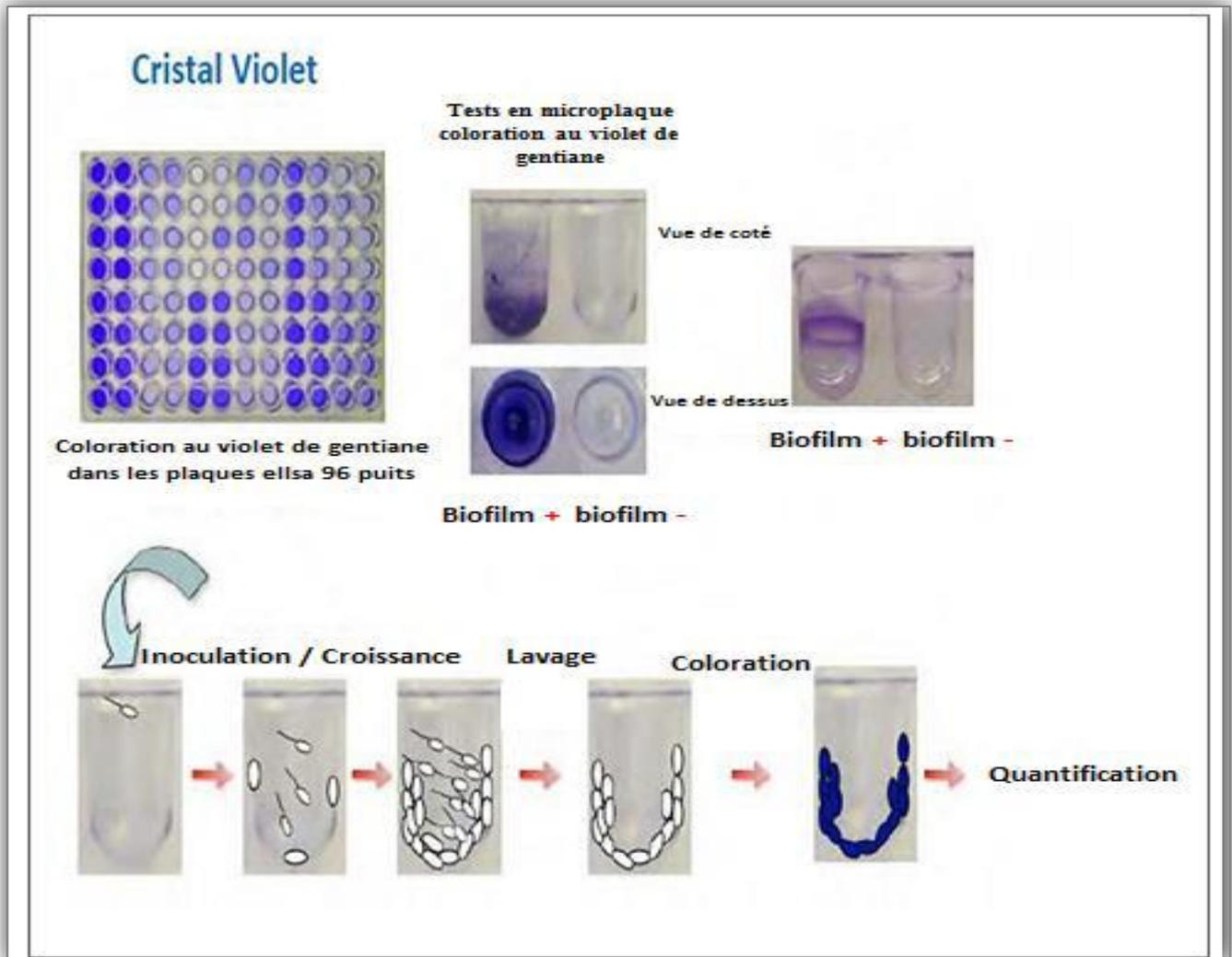


Figure 5: Formation de biofilm en microplaque. (Bellifa, 2014)

Partie III
Résultats et
discussion

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. 59 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 les tableaux 01.

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

Tableau 1: Répartition des isolats obtenus de différents sites de prélèvements au niveau de la laiterie pendant la saison froide

Numéro du Prélèvement	Nombre d'isolats	Les espèces	
		Les espèces avant pasteurisation	après pasteurisation
1 et 2	22	<i>Bacillus pumilus</i> (1)	<i>Bacillus cereus</i> (3)
		<i>Bacillus cereus</i> (7)	<i>Bacillus subtilis</i> (1)
		<i>Bacillus subtilis</i> (2)	<i>Enterococcus faecium</i> (2)
		<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (1)	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (1)
		<i>Enterococcus faecium</i> (3)	
3 et 4	19	<i>Bacillus altitudinis</i> (1)	
		<i>Bacillus cereus</i> (4)	<i>Bacillus pumilus</i> (1)
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	<i>Bacillus altitudinis</i> (1)
		<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Enterobacter cloacae</i> (4)
			<i>Enterococcus faecium</i> (1)
			<i>Bacillus cereus</i> (5)

Partie III: Résultats et discussion

Staphylococcus hominis(1)

5 et 6	18 isolats	<i>Bacillus cereus</i> (8)	<i>Bacillus subtilis</i> (2)
		<i>Bacillus subtilis</i> (3)	<i>Bacillus cereus</i> (4)
			<i>Enterococcus faecium</i> (1)

D'après nos résultats, on remarque la dominance des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cette dominance est représentée par le genre *Bacillus* présenté par les espèces suivantes : *Bacillus cereus* (29), *Bacillus subtilis* (7), *Bacillus weihenstephanensis* (1) , *Bacillus pumilus* (1) , *Bacillus altitudinis* (1) . suivi par le genre *Enterococcus* présenté par l'espèce *Enterococcus faecium* (7) et en fin le genre *Staphylococcus* présenté par les espèces suivantes : *Staphylococcus hominis*(1), *Staphylococcus epidermis* (1). les bactéries à Gram négatif sont représentées par du genre *Enterobacter* présenté par l'espèce *Enterobacter cloacae* (4), suivi par le genre *Leclercia* présenté par l'espèce *Leclercia adecarboxylata* (1).

Nos résultats montrent que :

- La persistance de l'espèce *Bacillus* le long de la saison froide par sa présence au niveau des canalisations post et pré-pasteurisation
- La persistance de l'espèce *Enterococcus faecium* le long de la saison froide par sa présence soit au niveau des canalisations post ou pré-pasteurisation.
- La présence du genre *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermis* uniquement dans les canalisations pré-pasteurisation.
- La présence du genre *Leclercia adecarboxylata* uniquement dans les canalisations post pasteurisation.

Les souches du genre *Bacillus*, *Enterobacter cloacae*, ont été détectées avant pasteurisation et après pasteurisation, cela suggèrent que ces souches étaient résistantes à la pasteurisation. Tandis que *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudinis* , *Staphylococcus hominis* , *Staphylococcus*

Partie III: Résultats et discussion

epidermis ont été détectées uniquement avant pasteurisation, ce qui indique qu'elles ont été sensibles au traitement thermique appliqué lors de la pasteurisation.

Le lait et les produits laitiers renferment une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle à l'origine de la diversité des produits. L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes ou d'altération varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes ou d'altération peut être d'origine endogène (mammite) ou exogènes (eau, air, matériel de traite) cette figure englobe la majorité de sources de contamination.

La figure 6 ci-dessous montre les sources de contamination du lait cru.

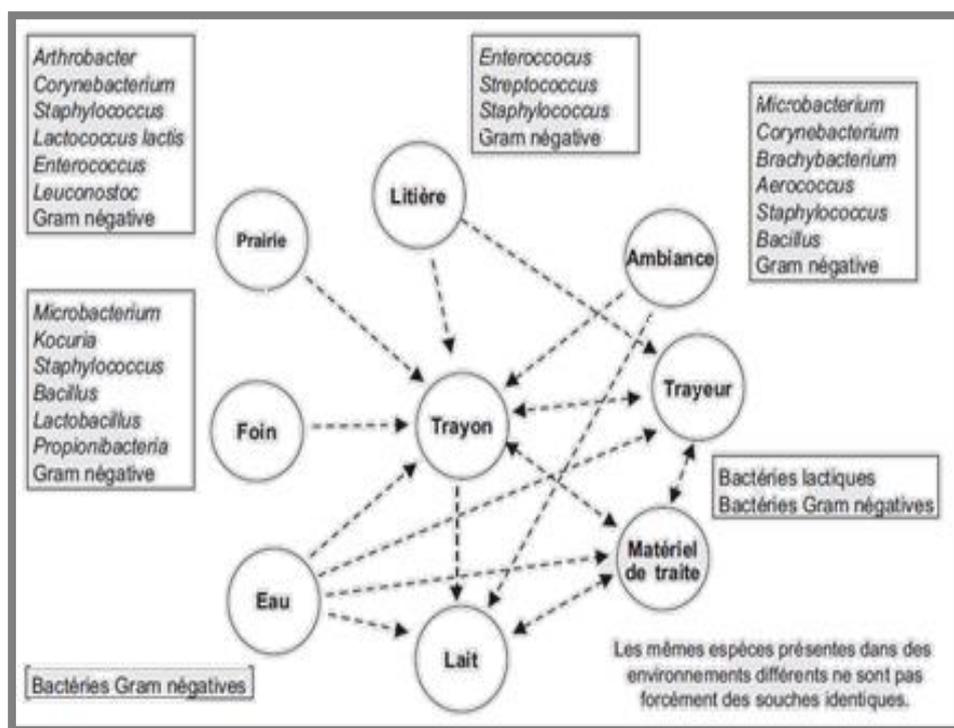


Figure 6: Principales sources de microorganismes pour le lait (schéma d'après Denis *et al.*, 2004 ; Bouton *et al.*, 2007 ; Vacheyron *et al.*, 2011)

La microflore bactérienne du biofilm de la canalisation du lait cru est intéressante sur le double plan quantitatif et qualitatif. Les groupes microbiens présents sur les canalisations post et pré pasteurisation laitiers sont affiliés à des genres comprenant des espèces potentiellement pathogènes avec des biotypes différents cela montre une diversité inter- et intra-spécifiques. Il s'agit des genres *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Ochrobacterium*, *Kocuria*, *Myroides*, *Pantoea*, *Leclercia*, *Brukholderia*, *Rahnella*, *Ochrobacterium*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* en témoignent les résultats obtenus, par

Partie III: Résultats et discussion

plusieurs études (**Hantsis-Zacharov et Halpern ,2007 ; Singh et al., 2011 ; Cleto et al., 2012 ;Cherif-Antar et al., 2015**).

Les biofilms formés sur les surfaces des équipements dans les établissements de transformation des aliments reflètent une microflore diversifiée .Elle représente la flore interne ou « in-house-microflora » propre à chaque entreprise alimentaire (**Bagge-Ravn et al., 2003**).

La présence de ces bactéries sur les surfaces laitières doit être considérée comme une cause de préoccupation, car elles peuvent aussi contaminer le lait transformé dans ces conditions (**Bennett et al., 2013**).

Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* sont capables de former des spores qui sont une forme de résistance, les cellules végétatives de *B. cereus* forment des spores lorsqu'elles se trouvent en conditions environnementales défavorables. Ces spores peuvent rester à l'état latent pendant de nombreuses années voire des milliers d'années, attendant ainsi le retour des conditions favorables (**Abbas, 2014**). Ce pathogène alimentaire peut ainsi causer de sérieux problèmes tels que le changement de texture et le développement de saveurs indésirables dans l'industrie alimentaire. Aussi, compte tenu de sa psychrotolérance, cette bactérie constitue un potentiel pathogène émergent des produits réfrigérés prêts à la consommation (**Merzougui et al., 2013**).

Cette bactérie a des activités enzymatiques peuvent être responsables de l'acidification, la coagulation ou la protéolyse du lait. Les traitements thermiques peuvent, de plus, déclencher la germination des spores et favoriser leur multiplication (**Merzougui et al., 2013**). Parmi les bactéries pathogènes qui peuvent se retrouver dans le lait de vache les entérocoques qui peuvent se multiplier à des températures comprises entre 4 °C et 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C et à un pH compris entre 4,6 et 9,5. , certaines y sont habituellement à un très faible niveau et ont peu de chance de s'y développer. D'autres sont à des niveaux appréciables et peuvent se multiplier. C'est le cas, entre autres, les entérocoques qui provient généralement de la peau des mamelles (**Richard et al., 1985**). Son implantation dans le matériel de traite est inhabituelle. Certaines souches, heureusement -rarement présentes, lorsqu'elles sont à un haut niveau dans le lait de vache ou dans les fromages, peuvent produire des gastro-entérites dues à la production de toxines.

Les entérobactéries peuvent se multiplier à des températures comprises entre 5 °C et 45°C avec un optimum à 35 °C-37 °C et à des pH de 4,5 à 9 avec un optimum compris entre 6,4 et 7,5 ; il semblerait que la contamination ait lieu plus fréquemment à partir du milieu extérieur,

Partie III: Résultats et discussion

de l'environnement ou par contact avec les animaux infectés au moment de la traite que par voie intra mammaire (**Martel et al. , 1994**). En effet, il a été démontré que certaines pouvaient résister au traitement thermique de lyophilisation (**Donagh, 1968**).

D'après l'analyse des résultats et par comparaison des différentes valeurs de densité optique (DO) pour chacune des souches étudiées avec la DO de témoin (control négatif), la densité optique obtenue par 2/59 souches (1.96%) est élevée à celle de témoin, ce qui traduit leur potentiel de former un biofilm. La DO de 1/59 souches (1.47%) présentaient une DO comprise entre ($DO_{nc} < DO_{lue} \leq 2XDO_{nc}$) pour chaque souche, indiquant une faible formation de biofilm, ces souches sont considérées comme des souches faiblement formatrices de biofilm.

La DO des 51/59 souches (96.22%) était moins que celle du témoin ($DO_{lue} \leq DO_{nc}$) ce qui traduit leur incapacité de former un biofilm (absence de formation).

La capacité de formation de biofilm des souches cultivées sur PS en présence de BN à 37 ° C et 55 ° C est montrée sur la figure 01 et la figure 02 respectivement. La figure 03 et la figure 04 montrent les résultats obtenus à partir d'essais de la formation de biofilm sur de PS en présence de TSB à 37 ° C et 55 ° C, respectivement. La DO_{570} du contrôle était égale à 0.128 ± 0.111 .

La plupart des souches ont montré une capacité faible ou l'incapacité à former des biofilms sur PS en présence de BN à la fois 37 ° C et 55 ° C (Fig 01. Fig 02). À 37 ° C, sur le total des souches, une seule souche d' *Enterococcus faecium* a montré une capacité modérée à former des biofilms sur PS dans la présence de BN avec un $OD_{570} = 0,139$. Par contre à 55°C, les résultats ont montré une incapacité de former un biofilm dans les mêmes conditions.

De même, dans le cas du TSB, la plupart des souches présentaient une incapacité à former des biofilms sur PS à 37 ° C et 55 ° C . À 37°C, seulement *Enterobacter cloacae* a montré une faible capacité de formation de biofilm sur PS en présence de TSB avec un $OD_{570} = 0,223$. Par contre à 55°C, les résultats ont montré une incapacité à former un biofilm dans les mêmes conditions.

Partie III: Résultats et discussion

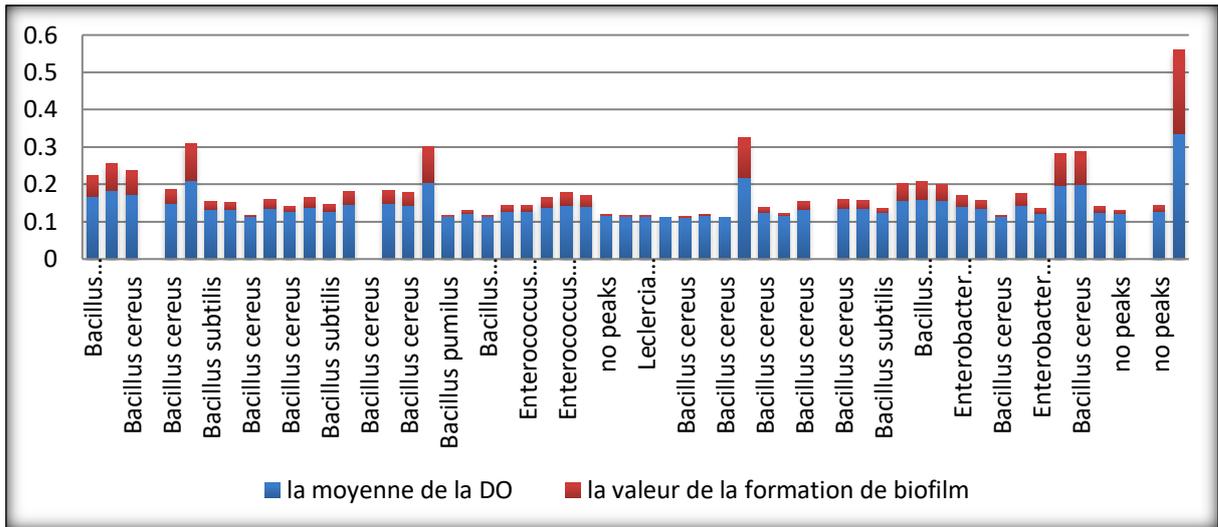


Figure 9 : la capacité de formation de biofilm dans le milieu TSB à une température de 37°C .

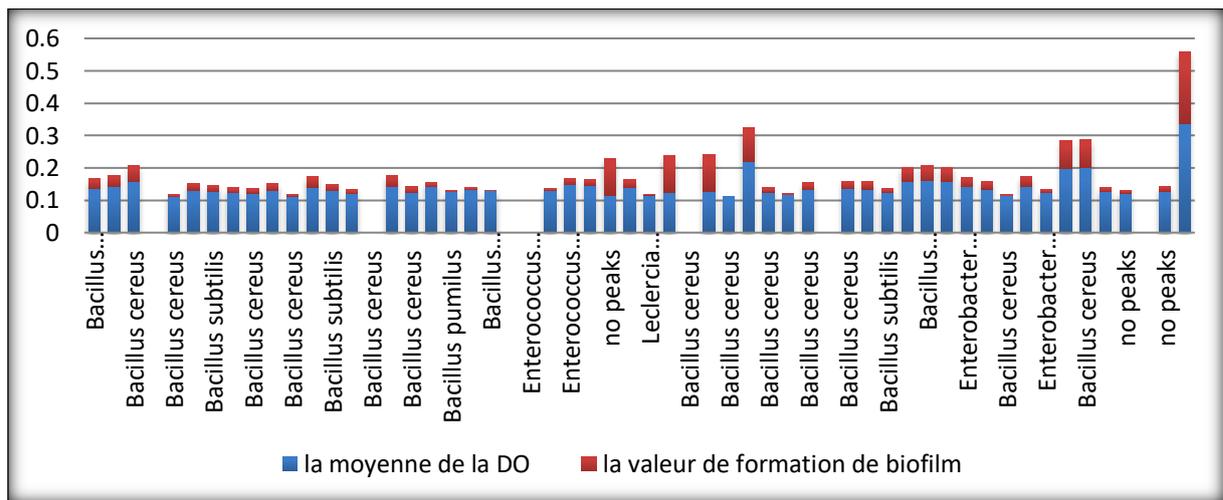


Figure 10: la capacité de formation de biofilm dans le milieu TSB à une température de 55°C .

Dans cette étude, la possibilité de contamination bactérienne sur les surfaces d'une usine laitière a été étudiée. L'échantillonnage été en deux catégories: pré-pasteurisation et post -pasteurisation. La capacité de formation de biofilm de cette microflore varié composé à la fois de Gram-positif et de Gram-négatif appartenant à 9 espèces sur les coupons PS a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet. En particulier, les effets des températures (par

Partie III: Résultats et discussion

exemple, 37 ° C et 55 ° C) et milieux de croissance (par exemple, BN et TSB) sur la production de biofilms par ces espèces sur PS ont été explorées.

Nos résultats sont en concordance avec celle de **Cherif-antar et ses collaborateurs. (2015)** où ils ont trouvés que les souches de *B. cereus* n'étaient pas des producteurs de biofilm, même si des isolats de ces espèces constituaient une population majoritaire dans tous les échantillons. Contrairement à la conclusion de **Kumari et Sarkar, (2014)** la plupart des souches de cette étude ont montré la capacité à former des biofilms lors de la croissance sur les surfaces PS et en présence de TSB à 37° C. De plus, la majorité des *Bacillus cereus* étaient les producteurs de biofilm modérés ou les forts producteurs de biofilm sur les surfaces en acier inoxydable (**Faïle et al., 2001; Lin et al., 2017**). Les membres du genre *Bacillus* sont parmi les bactéries les plus couramment trouvées dans les fermes laitières et les usines de transformation (**Sharma et Anand, 2002 ; Simoes et al., 2010**). Car ces bactéries peuvent produire des endospores résistantes à la chaleur qui jouent un rôle important dans la persistance bactérienne et l'établissement du biofilm dans l'environnement laitier (**Ostrov et al., 2016**).

Même observation était pour *Staphylococcus spp.* , alors que les biofilms plus puissants ont été formés par certaines souches dans des conditions de haute valeur nutritive (TSB), comme *S. epidermidis*, qui concordaient avec les résultats de études antérieures (**Møretro et al., 2003 ; Hamanaka et al., 2012**). Par contre selon notre étude pour *S. epidermidis* a montré une capacité négative à former des biofilms. Contrairement à Cherif –antar et ses collaborateurs (2016) où Les souches de staphylocoques présentaient une capacité modérée à forte à former des biofilms.

Dans ce contexte, Pour *E. faecalis* étaient des producteurs de biofilm modérés ces résultats concordent avec ceux d'études précédentes qui ont montré que plusieurs isolats d' *E. faecium* d'origine alimentaire étaient des producteurs de biofilm faibles, modérés ou forts, tandis que certains isolats ne formaient aucun biofilm (**Gomes et al., 2008 ; Jahan et Holley , 2014**). De plus **Cherif –antar et ses collaborateurs (2016)** ont trouvés que Les souches d'*E. faecalis* analysées dans leur travail ont pu former des biofilms sur du polystyrène surfaces.

les cellules bactériennes des biofilms développent facilement une résistance aux agents antimicrobiens en raison de la protection de la matrice du biofilm (**Liu et al., 2018**). Une fois que les agents pathogènes d'origine alimentaire forment des biofilms dans les environnements de transformation des aliments ou les produits alimentaires, il est difficile de les éliminer en raison de la protection de la matrice extrapolymeraie du biofilm (**Liu et al., 2017**). *E. cloacae* est également liée à la sécurité alimentaire en raison de sa forte capacité de formation de biofilm (**Wang et al.,**

Partie III: Résultats et discussion

2017 ; Liu *et al.*, 2018 ; Ramos-Vivas *et al.*, 2019 ; Zurob *et al.*, 2019). Par contre les résultats de notre étude montrent qu'ils étaient des faibles producteurs de biofilm. D'autres études ont montré une proportion similaire ou légèrement plus élevée de souches d'*Enterobacter* pouvant former des biofilms (Nyenje *et al.* , 2013 ; . Kovacs *et al.*, 2013). Ramos-Vivas et ses collaborateurs (2019) ont trouvés que les souches d'*Enterobacter* ont une capacité modérés à former de biofilm.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

La présence de biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments affecte négativement la qualité et la sécurité des produits de l'industrie laitière. Ces biofilms peuvent en effet contenir un nombre considérable de micro-organismes à la fois d'altération et pathogènes (**Giaouris et al., 2014**).

Dan cette étude, nous avons tout d'abord mis en évidence l'installation, sur les canalisations laitiers, d'une flore persistante impossible à éviter connaissant la source de contamination initiale. Ceci a été possible via la caractérisation moléculaire et évaluation de la capacité de formation de biofilm sur des surfaces en polystyrène à différentes conditions nutritionnelles et environnementaux.

Une diversité microbienne inter et intra spécifique très élevée a été trouvée parmi les bactéries récoltées dans les deux différents points d'échantillonnage et à des différentes saisons, La flore aérobie mésophile identifiée était composée des groupe d'espèces d'espèces *Bacillus cereus* , *Bacillus subtilis* , *Bacillus weihenstephanensis* , *Bacillus pumilus* , *Bacillus altitudinis* , *Enterococcus faecium* , *Staphylococcus huminis* , *Staphylococcus epidermis* , *Enterobacter cloacae* , *Leclercia adecarboxylata* .

La capacité de formation de biofilm est influencée par le type de souche, la température d'incubation. Malgré cela, la présence d'un nombre élevé et de différentes types de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif doit être pris en compte pour mettre en œuvre des routines d'hygiène plus strictes afin d'améliorer la qualité globale du lait et la sécurité de l'usine laitière .

Les principales perspectives de notre travail sont :

*L'étude de la thermorésistance des souches afin d'optimiser les paramètres de pasteurisation les plus adéquats dans l'élimination des micro-organismes.

*La détection moléculaire des gènes qui confèrent aux bactéries leur pouvoir de formation de biofilm.

* Optimiser des protocoles de nettoyage et de désinfection basés sur les protocoles déjà établi pour la lutte contre les biofilms.

References

Bibliographiques

Référence bibliographique

Référence bibliographique :

A

Abbas A.A. (2014). Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. 12-29

Ahmad I., Wigren E, Le Guyon S, Vekkei S, Blanka A, El Mouali Y, Anwar N, Chuah M,L, Lunsdorf H, Frank R, Rhen M, Liang Z, X, Lindqvist Y, Romling U.(2013). The EAL-like protein STM1697 regulates virulence phenotypes, motility and biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 90: 1216-1232.

Alonso AN, Perry KJ, Regeimbal JM, Regan PM, Higgins DE. (2014) .Identification of *Listeria monocytogenes* Determinants Required for Biofilm Formation. *PLoS ONE* .9(12): e113696.

Anderson GG, O'Toole GA.(2008).Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:85–105.

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

B:

Bagge-Ravn D., Ng Y., Hjelm M., Christiansen J.N., Johansen C., and Gram L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries — analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 239–250.

Bassam,A.,annous,Pinam fratmico,James,L.smith (2009). Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *journal of food science* 74 :24–37.

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

Beloin C., Roux A., Ghigo J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* .322:249–289

Biondi .A., L., Zappala , JD. Stark , N. (2013). DesneuxLes biopesticides affectent-ils les caractéristiques démographiques d'une guêpe parasitoïde et ses services de lutte biologique par des effets sublétaux? *PLOS One* .8: article e76548

Référence bibliographique

Bizzini .A. , Jatou K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G .(2010) MALDI-TOF Mass Spectrometry as an alternative to 16S rDna sequencing for identification of difficult to identify bacterial strains. J Clin Microbiol. doi:10.1128/JCM.01463-10

Bouman.S.,D.B lund,F.Mdriessen,D.G(1982). Growth of Thermoresistant Streptococci andDeposition of Milk Constituents on Plates of Heat Exchangers During Long Operating Times. J Food Prot (1982) 45 (9): 806–812

Bourne, D. G., Høj, L., Webster, N. S., Swan, J., & Hall, M. R.(2006). Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*,260 : 27–38.

Boutaleb N.(2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud UFR science et science de l'ingénieur.194 -195

Brauge, T.; Sadovskaya, I.; Faille, C.; Benezech, T.; Maes, E.; Guerardel, Y.; Midelet-Bourdin, G.(2016) .Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. *FEMS Microbiol.* 363:229.

Bremer.P., Steve Flint, John Brooks, John Palmer.(2015). Overview of the Problems Resulting from Biofilm Contamination in the Dairy Industry.4:51-64

C:

Cerf O. (2002). ;Risques bactériens liés aux produits laitiers. *Revue Française des Laboratoires*.348 : P :67-69.

Ceri H, Olson ME, Turner RJ. .(2010);Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*;11:1233–1237.

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

Characklis W.G., Bryers J.D., Trulear M. G., Zilver N. .(1980). Biofouling film development and its effects on energy losses: a laboratory study. In *Condenser Biofouling Control* (Edited by Garey J F et al) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. 49-76.

Référence bibliographique

Cherif Antar, A. (2015). Identification et caractérisation de la flore mésophile constitutive des biofilms inféodés aux lignes de production de lait de vache pasteurisé. Doctorat en Biologie Moléculaire et Biochimie. Univ. De Tlemcen. 101-103

Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. ; (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science and Technology*, 96:27-38.

Chmielewski, R. A. N., and Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2:22–32

Cleto. S., Matos. S, Kluskens L, Vieira MJ (2012) Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant. *PLoS ONE* 7(6): e40189.

Colagiorgi, A.; di Ciccio, P.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Ianieri, A. (2016). A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms* .4(3):22.

Costerton J. W., Lappin-Scott H. M. (1989). bacterial biofilm and surface fouling .*biofouling* .1:323-342.

D :

Donlan, RM et Costerton, JW (2002) Biofilms: mécanismes de survie de micro organismes cliniquement pertinents .*clinical microbiology reviews* 15:167 - 193

Dumas C. (2007) Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 53 : 468-473

F :

Faille, C., Fontaine, F., & Bénézech, T. (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines . *journal of applied Microbiology* .90:892-900

Flemming, H.-C., and Wingender. j. ,2002. *Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance*, *Encyclopedia of environmental microbiology*, 3 : 1223-1231.

Référence bibliographique

Folkesson .A., Haagensen JAJ, Zampaloni C, Sternberg C, Molin S (2008). Biofilm Induced Tolerance towards Antimicrobial Peptides. PLoS ONE 3(4): e1891

FX Boulanger , S. Jandricic , K. Bolckmans , FL Wackers , A., (2019) . Pekas Optimiser le biocontrôle des pucerons avec le prédateur *Aphidoletes aphidimyza*, basé sur la biologie et l'écologie Pest Manag Sci , 75:1479-1493.

G :

Giaouris, E. D., & Nychas, G. J. (2006). The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, 23:8747-752.

Gill, JJ , Sabour, PM , Leslie, KE et Griffiths, MW. (2006) protéines bovine lactosérum inhibent l'interaction de *Staphylococcus aureus* et K bactériophage . *J Appl Microbiol* 101 , 377 - 386

Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., Jacques, M.(2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: une revue bibliographique.HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, 13(6), 469–477

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

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

H :

Hall-Stoodley L, Stoodley P. (2009).Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* . 11:1034–1043

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

Référence bibliographique

Hamanakaa, D., Genkawa, T., Tanaka, F., & Uchino, T. (2012). Effects of temperature and nutrient concentration on the structural characteristics and removal of vegetable associated .24:165-170

HANTISIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M.(2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. Appl. Environ. Microbiol.,73:7162-7168.

Hill, B. M., & Smythe, B. W. (2012). Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: An industrial perspective. Food Reviews International . 28: 299–312.

Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. J., Moser C., Jensen P., Bjarnsholt T. (2011).The clinical impact of bacterial biofilms, International Journal of Oral Sciences 3:55-65.

J :

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

Jacques M, Tremblay YDN.(2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance.animal health review .11 :97-121

Jahan M, Holley RA (2014). Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25 °C and 37 °C. Int J Food Microbiol 170:65–69

Joshi P., Wadhvani T., Bahaley P., Kothari V. (2010).Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing. Journal of Life Sciences.4: 59-72.

K:

Keren, I. , Shah, D. , Spoering, A. , Kaldalu, N. et Lewis, K. (2004) . Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli* . journal of bacteriology. 186 , 8172 - 8180 .

Référence bibliographique

Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F.K.(1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*, Appl. Environ. Microbiol. 63: 1826–1837

Kim, YG , Lee, JH , Kim, CJ , Lee, JC , Ju, YJ , Cho, MH et Lee, J. (2012) .Activité antibiofilm de *Streptomyces sp.* BFI 230 et *Kribbella sp.* BFI 1562 contre *Pseudomonas aeruginosa* . Appl Microbiol Biotechnol .96 :1607 - 1617 .

Kirisits.MJ., , MB Emelko , AJ.(2019). Pinto Appliquer la biotechnologie à la biofiltration de l'eau potable: faire progresser la science et la pratique Curr Opin Biotechnol , 57:197- 204.

Kovacs bela , Sandrine le Gall-David, Pascal Vincent , Hervé Le Bars , Sylvie Buffet-Bataillon , Martine Bonnaure-Mallet , Anne Jolivet-Gougeon .(2013) . Is biofilm formation related to the hypermutator phenotype in clinical *Enterobacteriaceae* isolates?.FEMS Microbiology Letters .347: 116–122.

Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology . food control . 36:153-158.

L:

Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R.(2010).Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. Appl Microbiol Biotechnol. 86:813-823.

Lather, P. , Mohanty, AK , Jha, P. et Garsa, AK . (2016) . Contribution de l'hydrophobicité de la surface cellulaire à la résistance de *Staphylococcus aureus* contre les agents antimicrobiens . Biochem Res Int 2016:1091290 .

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

Lewis K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Curr Top Microbiol Immunol. 322:107–131.

LG Terry , RS .(2018). Summers Matière organique biodégradable et performance des biofiltres à débit rapide: un examen Water Res . 128:234 - 245

Référence bibliographique

Lin, Y., Ren, F., Zhao, L., & Guo, H. (2017). Genotypes and the persistence survival phenotypes of *Bacillus cereus* isolated from UHT milk processing lines .food control .82:48-56

Liu.F. , F. Wang , Du .L.,T . Zhao , PM Doyle ,Wang.D . (2018). Activité antibactérienne et antibiofilm de l'acide phényllactique contre *Enterobacter cloacae* Contrôle alimentaire , 84 :442 – 448.

Liu.f. , L. Du ,Zhao.T. , Zhao.P. , MP.(2017). Effects of phenyllactic acid as sanitizing agent for inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilms 78 :72-78

M:

Martel J.-L. (1994). Les salmonelloses bovines et la filière agroalimentaire. Bull. mens. Soc. vét. prat. Fr., 78:307-319.

Martinez L.R., Casadevall A.(2007).Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Applied and Environmental Microbiology. 73:4592- 4601.

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

Merzougui S., Lkhider M. and Cohen N. (2013) .Bacillus cereus, un réel problème pour l'industrie agro alimentaire?. ScienceLib Editions Mersenne. 5, 130915. Microbiol alimentaire. , 19:627 - 636

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

Morton L. H. G., Greenway D. L. A., Gaylarde C. C., Surman S. B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. Inter Biodeterior. Biodegrad. 41: 247–259.

Référence bibliographique

MØRETRØ, Trond ; HERMANSEN, Lene ; HOLCK, Askild L ; SIDHU, Maan S ; RUDI, Knut ; LANGSRUD .(2003).Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments., *Solveig Applied and environmental microbiology (Print)*,69: 5648-5655

N:

Nithyanand, P. , Thenmozhi, R. , Rathna, J. et Pandian, SK (2010) Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm formation by coral-associated *actinomycetes* . *Curr Microbiol* 60:454 - 460 .

Nobbs A. H., Lamount R. J., Jenkinson H. (2009). *Streptococcus* adherence and colonizationl, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*,73:407-505.

Nyenje, M. E., Green, E. & Ndip, R. N.(2013) Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules (Basel, Switzerland)* 18:9582–9593.

O:

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

Onita D Basu , Sahil Dhawan ,Black K.(2016). Applications of biofiltration in drinking water treatment - a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* .91:585-595

Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR.(2002)Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 66:86–92.

Ostrov I, Harel A, Bernstein S, Steinberg D and Shemesh M (2016) Development of a Method to Determine the Effectiveness of Cleaning Agents in Removal of Biofilm Derived Spores in Milking System. *Front. Microbiol.* 7:1498.

P:

Papenfort, K. & Bassler, B. L.(2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*14:576–588.

Référence bibliographique

Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. (2001). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 11–18.

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

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

Pratt L. A., Kolter R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **30**:285-293

R:

Ramos-Vivas, J., Chapartegui-Gonzalez, I., Fernandez-Martínez, M., Gonzalez-Rico, C., Fortún, J., Escudero, R., et al. (2019). Biofilm formation by multidrug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. *Scientific Reports*, **9**, 8928.

Richard J. & Braquehay C. (1985). - Origine et nature des bactéries coliformes du lait cru. In *Colloque Société française de microbiologie. Sci. Aliments*, **5** (5), 21-24.

Richards JJ, Melander C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem*. **10**:2287-2294

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

S :

Seale.B., Phil Bremer, Steve Flint, John Brooks, John Palmer,(2015): Overview of the problems resulting from biofilm contamination in the dairy industry. *Biofilms In The Dairy Industry*. 49-64.

Sharma M, Anand SK (2002) Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol* **19**:627–636

Référence bibliographique

Simões M., Pereira M. O., Vieira M. J. (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res.* 39: 5142–5152.

Simoës.M., Lc.Simoës,Mj.Vieira(2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-FOOD science et technologie* .43 :573-583.

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

Spormann A.M. (2008). Physiology of Microbes in Biofilms. Part of the Current Topics in Microbiology and Immunology book series .322 :17-36

Stanga, M. (2010). Sanitation: cleaning and disinfection in the food industry. 126:239–250.

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*, 40:175–179.

Sulaeman S, Le Bihan G, Rossero A, Federighi M, Dé E, Tresse O.(2010) Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using Biofilm Ring Test. *J Appl Microbiol*.108:1303–131.

T:

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

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

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

V:

Van Houdt. R., Michiels CW.(2010).Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*. 109:1117–1131

Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules*. 14:2535-2554.

W:

Référence bibliographique

Wong HS, Townsend KM, Fenwick SG, Trengove RD, O’Handley RM. (2010). Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella Typhimurium* biofilms to disinfectants. J Appl Microbiol. 108:2222–2228.

Wang .H, J. Qi, Y. Dong, Y. Li, X. Xu, G. Zhou Characterization of attachment and biofilm formation by meat-borne *Enterobacteriaceae* strains associated with spoilage Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 86 :399-407,

Y:

Yang Liang ; Yang Liu ; Hong Wu ; Zhijun Song ; Høiby, Niels ; Molin, Soren ; Givskov, Michael .(2012) . Combating biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol. 65:146-157.

Z:

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

Zurob.E, G. Dennett, D. Gentil, F. Montero-Silva, U. Gerber, P. Naulín, *et al.* (2019), Inhibition of Wild *Enterobacter cloacae* Biofilm Formation by Nanostructured Graphene- and Hexagonal Boron Nitride-Coated Surfaces. 9(1) : 49

Annexe:

Annexe

Annexe :

Bouillon TSB

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

Bouillon nutritif

Peptone	10g
Extrait de levure	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