



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana

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



Département des sciences 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 souches de *Pseudomonas*
spp à formé un biofilm sur différentes surfaces**

Réalisé par : DIKES Souhir

Les jurys :

Mr ACHEK R.	MCB	Président	UDB Khemis-miliana
Mme ZAOUADI N.	MAA	Examinatrice	UDB Khemis-miliana
Mme DIDOUH N.	MCB	Promotrice	UDB Khemis-miliana

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur, beaucoup de sacrifices et d'obstacles ; mes remerciements vont d'abord au Créateur de l'univers « Allah » qui m'a doté du courage et de patience, et m'a maintenue en santé pour mener à bien ce mémoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma Directrice de mémoire Madame DIDOUH Nassima. Je vous remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé. Ainsi que d'avoir été patiente et compréhensive le long de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

Mes remerciements les plus respectueux aux membres de jury : **Mr Achek R** pour avoir accepté de présider notre jury et consacré de son temps à la lecture de notre mémoire pour y apporter les meilleurs perfectionnements. **M^{me} Zaouadi N** pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un grand merci à l'équipe de l'université Djilali Bounaama Khemis-Miliana et un spécial merci au responsables des laboratoires de l'université pour leur guidance et leur patience.

Je tiens à remercier Docteur Noureddine HOUTI de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire malgré toutes les difficultés durant cette période de pandémie.

Je remercie énormément mes chers parents, mon mari et mes sœurs pour leur soutien et encouragement.

Dédicace

A ma grand-mère ; qui nous à quitter durant cette pandémie, qu'Allah lui accorde le plus haut degré du paradis, et guérisse tous les malades au monde entier.

Je dédie ce travail à ma chère et adorable maman qui a toujours fait le possible pour m'éduquer et à m'élever de respecter les autres, à mon unique papa ; tu es mon idole, merci pour ton humour et ton originalité qui mon rendus optimiste et persévérante envers mes études.

A mon mari, merci pour ta patience et ton soutien psychologique. Je souhaite également remercier mes sœurs de m'avoir aidé, m'encourager et me pousser pour atteindre mon but.

Table de matières

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Résumé.

Introduction..... 1

Partie I: synthèse bibliographiques

1. Définition	4
2. Les étapes de formation d'un biofilm	5
2.1. Adhésion primaire réversible et non spécifique	5
2.2. Adhésion secondaire irréversible et spécifique	5
2.3. Formation de micro-colonies et production d'EPS	6
2.4. Maturation du biofilm	6
2.5. Dispersion du biofilm	7
3. Composition d'un biofilm	8
4. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	10
4.1. Caractéristiques de la surface	10
4.1.1. Rugosité de la surface	10
4.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface	11
4.2. Caractéristiques du milieu	11
4.3. Propriétés des cellules	13
5. Organisation d'un biofilm	14
5.1. Structure des biofilms	15
6. Le quorum sensing	15
6.1. Définition et mécanismes	15
6. 2. Les molécules du quorum sensing	16
7. Transfert d'information génétique au sein du biofilm	16
8. Le biofilms de <i>Pseudomonas</i> dans les installations de production alimentaire	17
9. Elimination du biofilm en industrie alimentaire	19

Partie II: Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude	24
2. Origine des souches	24
3. Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne par la technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon)	24
4. Evaluation de la formation de biofilm <i>in vitro</i> : Méthode de culture sur microplaque (TCP) sous différents conditions	24
4.1.Souches bactériennes et des conditions de croissance	25
5. Evaluation de la formation de biofilm sur acier inoxydable sous différents conditions	27
5.1. Traitement des lames d'acier inoxydable	27
5.2. Formation du biofilm sur des lames en acier inoxydable	27
Partie III: Discussion des résultats antérieurs.....	29
Conclusion	38
Références bibliographiques	40

Liste des figures

Figure 01 : Micrographies électroniques à balayage de biofilms de <i>P. fluorescens</i> (14-jours) préparées à l'aide de méthodes cryogéniques (BMC Microbiology. 2009).....	4
Figure02 : Principales étapes de la formation des biofilms (Lebeaux et Ghigo, 2012) ...	5
Figure 03 : La structure complexe des biofilms bactériens. (a) Microcolonies dans le biofilm mature. (b) Au moment de la dispersion (McDougald, 2012).....	7
Figure04 : Représentation schématique de la composition de biofilm (Goetz et al., 2016).....	8
Figure 05 : Schéma illustratif de l'interrelation entre les conditions hydrodynamiques et le biofilm (De Andrade, 2016).....	12
Figure 6 . Formation de biofilm en microplaque (Bellifa, 2014).....	26
Figure 07 : Affinité du biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et des cellules planctoniques cultivées à 20, 30 et 37 °C avec l'hexadécane (Khelissa et al., 2019).....	30
Figure 08 : Développement de la biomasse du biofilm de <i>P. fluorescens</i> après coloration CV. Variation de la densité optique (DO ₅₉₀) dans le temps obtenu avec des niveaux d'inoculum de 10 ⁴ (points noirs) et 10 ⁷ (points bleus) CFU / mL (Valeria et al., 2020)..	32
Figure 09 : la formation de biofilm par les souches de <i>Pseudomonas spp</i> après 24 heures et 48 heures d'incubation (Sabaeifard et al., 2014)	33
Figure 10 : Nombre de cellules <i>P. fragi</i> adhérentes observées après 30 min de temps de contact avec de l'acier inoxydable conditionné. Milieu de croissance: TSB , RSM, RSM+Sac (Scott et Edmund, 1997)	35
Figure 11 : Potentiel Zêta des cellules planctoniques et des cellules du biofilm de <i>P.aeruginosa</i> cultivé à 20 et 37°C pendant 24 heures sur l'acier inoxydable (Khelissa et al., 2019)	36

Liste des tableaux

Tableau 01: Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm, d'après, Donlan, 2002	13
Tableau 02 : Choix du produit nettoyant en fonction des souillures (Diaby, 2018)	20
Tableau 03 : Concentration de <i>P.fragi</i> cultivée dans divers milieux de culture après centrifugation et remise en suspension dans du PBS (Scott et Edmund, 1997).....	35

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNe : Acide désoxyribonucléique extracellulaire.

AFM : Atomic Force Microscopy.

AHL : Acyl Homoserine Lactone.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNm: Acide ribonucléique messenger.

BN: Bouillon nutritive.

C: Carbone.

C ° : Degré Celsius.

CIP : Clean in place.

cm²: Centimètre au carrée.

CSH: Cell surface hydrophobicity.

DO: Densité optique.

DO_f: Densité optique finale.

DO_i: Densité optique initiale.

EDS: Eau distillée stérile.

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

EPS: Exopolysaccharides.

Glu: Glucose.

h: Heur.

HGT: horizontal gene transfer.

IAA : Industrie agroalimentaire.

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité.

K₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium.

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique .

L : Litre.

LPS : Lipopolysaccharides.

MATH : Microbial Adhesion To Hydrocarbon.

MgSO₄·7H₂O: Sulfate de magnésium heptahydraté.

ml: Millilitre.

min: Minute.

μL : Microlitre.

N: Azote.

NaCl: Chlorure de sodium.

NaOH: Hydroxyde de sodium.

nm: Nanomètre.

P: Probabilité

PBS: Tampon phosphate salin.

pH: Potentiel d'hydrogène.

PS: Polystyrène.

QS: Quorum-Sensing.

RSM: Reconstituted skim milk.

Sac: Saccharose.

T4P: Pili Type IV.

TCP: Technique de culture sur microplaque.

TSB: Tryptic soy broth/ Bouillon tryptone-soja.

UFC: Unité formant colonie.

UHT : Ultra Haute Température.

V/V : Volume par volume.

YE : Yeast Extract.

Résumé :

La croissance des biofilms dans les environnements de transformation du lait augmente les chances de contamination microbienne des produits laitiers transformés et réduit la durée de conservation. Ces biofilms peuvent contenir des micro-organismes d'altération et pathogènes tels que de *Pseudomonas* les plus couramment détectées dans le lait et les produits laitiers, qui a la capacité d'adhérer et de s'agréger sur les surfaces en acier inoxydable, ce qui entraîne la formation de biofilm dans les réservoirs de stockage du lait et les surfaces des lignes de traitement du lait, en provoquant des pertes assez importantes pour l'industrie laitière. Cette étude a pour objectif d'étudier l'adhérence des souches de *Pseudomonas spp* isolées sur les surfaces en aciers inoxydables, et en polystyrène, de déterminer son caractère hydrophobe /hydrophile. Afin de vérifier s'il y a une relation entre ce caractère et la capacité de formation de biofilm, qui pourra nous permettre de bien choisir le type de surface à utiliser en industrie afin de minimiser les pertes, ainsi que le protocole de nettoyage à suivre. Dans ce mémoire la partie pratique n'a pas été réalisée à cause de la crise sanitaire « COVID-19 ». Nous avons ainsi discuté les résultats obtenus des travaux qui ont déjà été faits par différents chercheurs.

Mots clés: biofilms, *Pseudomonas spp*, acier inoxydable, polystyrène, caractère hydrophobe/hydrophile, industrie laitière.

Abstract :

The growth of biofilms in milk processing environments increases the chances of microbial contamination of processed dairy products and reduces shelf life. These biofilms may contain spoilage and pathogenic microorganisms such as *Pseudomonas* most commonly detected in milk and dairy products, which have the ability to adhere and aggregate on stainless steel surfaces, which results in the formation of biofilm in milk storage tanks and the surfaces of milk processing lines, causing significant losses for the dairy industry. The objective of this study is to study the adhesion on stainless steel and polystyrene surfaces, to determine its hydrophobic / hydrophilic character. In order to check if there is a relationship between this character and the capacity of biofilm formation, which will allow us to choose the types of surfaces to use in industry in order to minimize losses, as well as the cleaning protocol to follow. In this thesis the

practical part was not carried out due to the « COVID-19 » health crisis. We discussed the results obtained from the work that has already been done by different researchers.

Key words: biofilms, *Pseudomonas spp*, stainless steel, polystyrene, hydrophobicity/hydrophilicity, dairy industry.

ملخص:

يزيد نمو البيوفيلم (الأغشية الحيوية) في بيئات معالجة الحليب من فرص التلوث الجرثومي لمنتجات الألبان المصنعة ويقلل من مدة الصلاحية. قد تحتوي هذه الأغشية الحيوية على كائنات مجهرية فاسدة وممرضة مثل *Pseudomonas* الأكثر شيوعاً في الحليب ومنتجات الألبان، والتي لديها القدرة على الالتصاق والتجمع على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ، والتي ينتج عنه تكوين الأغشية الحيوية في خزانات الحليب وأسطح خطوط تصنيع الحليب، مما يتسبب في خسائر كبيرة لصناعة الألبان. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة الالتصاق على أسطح الفولاذ المقاوم للصدأ والبوليسترين، لتحديد طابعها الكارهة للماء / المحبة للماء. من أجل التحقق مما إذا كانت هناك علاقة بين هذه الشخصية وقدرة تكوين الأغشية الحيوية، والتي ستسمح لنا باختيار أنواع الأسطح لاستخدامها في الصناعة لتقليل الخسائر، وكذلك بروتوكول التنظيف الذي يجب اتباعه. لم يتم تنفيذ الجزء العملي في هذه المذكرة بسبب أزمة «كوفيد 19» الصحية، و لقد ناقشنا النتائج التي تم الحصول عليها من العمل الذي تم بالفعل من قبل مختلف الباحثين.

الكلمات المفتاحية: البيوفيلم، *Pseudomonas spp*، الفولاذ المقاوم للصدأ، البوليسترين، الكارهة للماء / المحبة للماء، صناعة الألبان.

Introduction

Introduction

Introduction:

Dans l'industrie laitière, la formation des biofilms est très fréquente au niveau des surfaces qui sont en contact avec le lait tel que les sols, les murs, les tuyaux, les bidons de lait et les cuves de refroidissement (**Dewangan et al., 2015**). Ces zones sont souvent difficiles à atteindre pendant le nettoyage et l'assainissement et ainsi les conditions optimales pour la formation et le développement des biofilms sont établies. Les environnements fournissent une variété de conditions, qui peuvent favoriser la formation de biofilm, par exemple: présence d'humidités, nutriments et inoculum de micro-organismes à partir des matières premières (**Bower et al., 1996**). *Pseudomonas spp* sont l'une des bactéries les plus importantes à l'origine des altérations des produits laitiers liquides pasteurisés conventionnellement, agissant par deux itinéraires différents. Premièrement, ils produisent la majorité des enzymes lipolytiques et protéolytiques sécrétées dans le lait cru pendant le prétraitement et le stockage, même dans des environnements psychrotrophes. Beaucoup de ces enzymes peuvent survivre à la pasteurisation et même aux traitements à très hautes températures et peuvent ainsi réduire la qualité sensorielle et la durée de conservation des produits laitiers liquides transformés. Deuxièmement, *Pseudomonas spp* peut agir dans le processus de post-pasteurisation, provoquant la détérioration du lait pasteurisé conventionnellement pendant le stockage réfrigéré (**Dogan et Boor, 2003**).

Ce mémoire rentre dans ce contexte. Il a pour principal objectif : de déterminer la capacité de ces bactéries à former des biofilms sur des surfaces en polystyrène, sur acier inoxydable et aussi déterminer le caractère hydrophobe/ hydrophile des souches de *Pseudomonas* de notre collection.

Ce mémoire est structuré en trois parties:

1. Une mise au point bibliographique traitant du biofilm, ses étapes de formation et les problèmes causés spécialement par le biofilm de *Pseudomonas spp* en industrie agroalimentaire, ainsi que des procédés de contrôle et d'élimination du biofilm.
2. Une partie expérimentale comprenant : l'évaluation de la capacité de ces souches à former des biofilms sur deux types de surface : le polystyrène et l'acier inoxydable, ainsi que de déterminer le caractère hydrophobe /hydrophile et voire s'il y a une relation entre ce caractère et le pouvoir de formation de biofilm.

Introduction

3. La troisième partie est consacrée à la discussion des résultats antérieurs. Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives.

Partie I

Synthèse bibliographique

1. Définition :

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique (Costerton *et al.*, 1999 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004) (voir figure 01).

Les bactéries peuvent aussi bien adhérer à une surface biotique (exemple : cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (exemple : plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation).

Au sein du biofilm, les micro-organismes morts ou lysés sont réutilisés comme nutriments : on parle de « cannibalisme ». L'ADN libéré lors de la mort programmée de certains micro-organismes du biofilm aurait un rôle structural dans la stabilité des biofilms (Bury-Moné, 2007).

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète résident sous forme d'un biofilm (Richards et Melander, 2009).

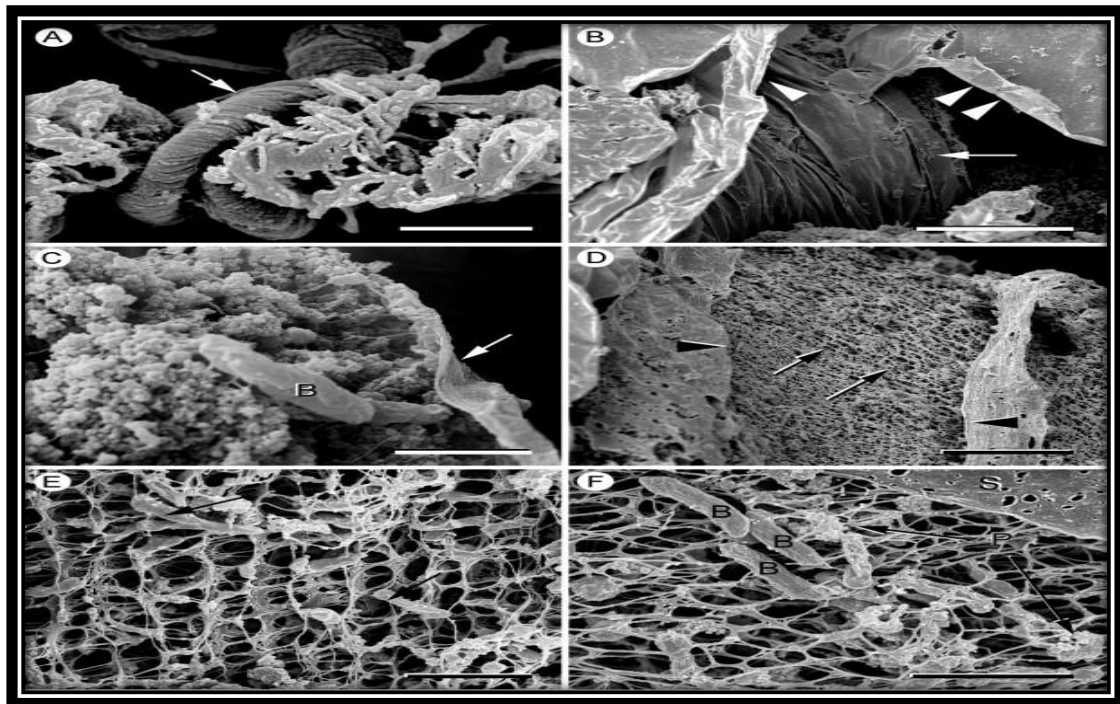


Figure 01 : Micrographies électroniques à balayage de biofilms de *P. fluorescens* (14- jours) préparées à l'aide de méthodes cryogéniques (BMC Microbiology, 2009)

2. Les étapes de formation d'un 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 surface incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques et/ou sur les équipements de l'industrie agroalimentaire (Talaro, 2008) (voir figure 02).

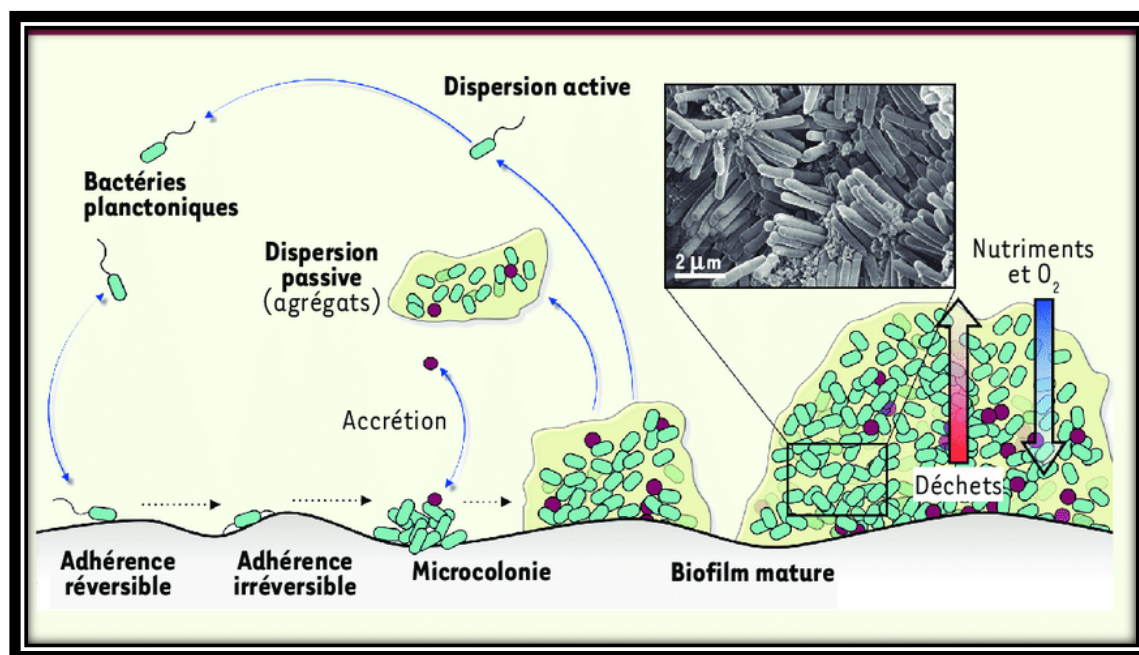


Figure02 : Principales étapes de la formation des biofilms (Lebeaux et Ghigo, 2012).

2.1. Adhésion primaire réversible et non spécifique :

Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques). À ce stade, la bactérie peut résorber de la surface et retrouver son état planctonique (Spiers *et al.*, 2003 ; Kuchma *et al.*, 2005).

2.2. Adhésion secondaire irréversible et spécifique :

L'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions spécifiques entre les composants superficiels bactériens (adhésines) et les récepteurs de surface de la cellule hôte ou de la sonde avec des liaisons du type hydrophobes (Spiers *et al.*, 2003 ; Kuchma *et al.*, 2005), et surtout grâce à des structures

d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés (**Beloin et al., 2005**). Pour les bactéries à Gram négatives, il s'agit des pilis, des curlis, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries à Gram-positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivantes presque uniquement fixées (comme par exemple *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*) utilisent des structures spécifiques comme le pédoncule ou la gaine (**Van Houdt, 2005**).

2.3. Formation de micro-colonies et production d'EPS :

Durant cette étape, les bactéries sont irréversiblement attachées à la surface de manière définitive, elles vont ensuite s'agréger entre elles et se conglomerer en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et de l'environnement liquide. Une fois l'attachement terminé, les processus de division cellulaire maintiennent les liaisons bactérie à bactérie et conduisent à la formation de micro colonies qui vont par la suite s'élargir et s'amplifier pour former une couche cellulaire couvrant la surface (**Otto, 2013 ; Mogha et al., 2014 ; Goetz et al., 2016**). Il y aura alors une phase durant laquelle la densité bactérienne atteint un certain seuil, qui permettra au quorum sensing de participer à la maturation du biofilm (**Otto, 2013**). Une fois l'intensité de ses signaux aboutit à un niveau précis, les mécanismes génétiques contrôlant la production d'EPS sont activés (**Costerton et al., 1999**). Ces EPS jouent un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, physiques, chimiques ou cellulaires ainsi que dans l'ancrage de cellules à la surface (**Lebeaux et al., 2014 ; Mogha et al., 2014**).

2.4. Maturation du biofilm :

Par la suite la croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (**Costerton et al., 1995**). Le biofilm mature se caractérise par la formation des canaux aqueux, qui vont entrainer la séparation des microorganismes d'une part, et permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfouies du biofilm d'autre part, ainsi que l'évacuation des déchets. Le biofilm se développe, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, en présence des conditions optimales (**Filloux et Vallet, 2003**).

2.5. Dispersion du biofilm :

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (voir figure 03) : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Sauer *et al.*, 2002).

La dispersion du biofilm se fait selon trois étapes (Kaplan, 2010) :

- Détachement des cellules de la colonie du biofilm.
- Translocation des cellules vers un nouvel emplacement.
- Fixation des cellules a un substrat dans le nouvel emplacement.

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance (voir figure 03) (De Chalvet et De Rochemonteix, 2009).

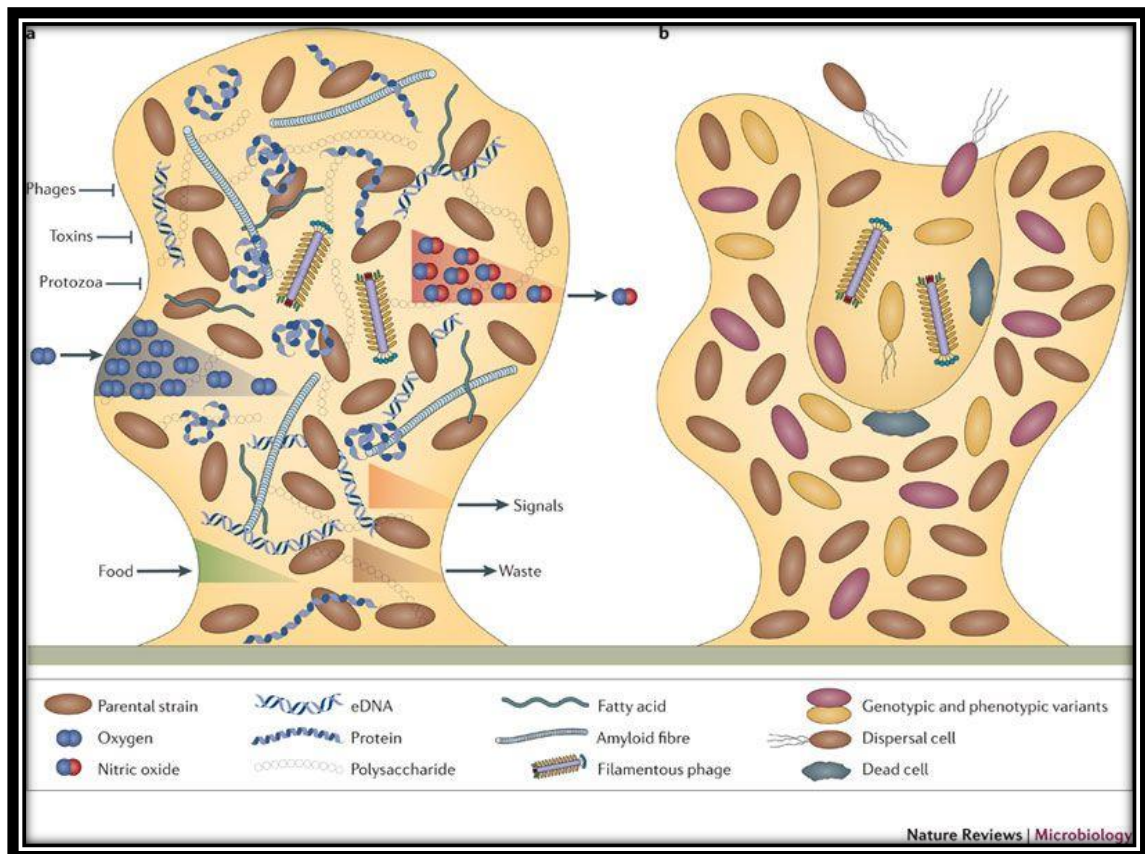


Figure 03 : La structure complexe des biofilms bactériens. (a) | Microcolonies dans le biofilm mature. (b) | Au moment de la dispersion (McDougald, 2012).

3. Composition d'un biofilm :

Le développement de l'architecture des biofilms 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) (voir figure 04).

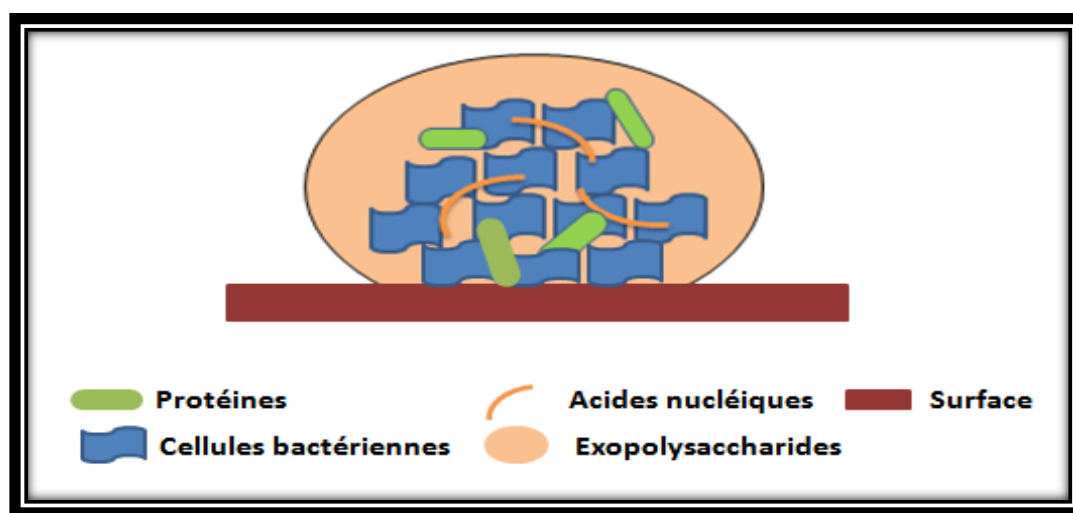


Figure04 : Représentation schématique de la composition de biofilm

(Goetz *et al.*, 2016).

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent (Clutterbuck, 2007). Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm. La matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm. Le rapport C/N d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice (Bury-Moné, 2007).

La matrice extracellulaire est principalement composée de polysaccharides, tels que la cellulose, les protéines ou l'ADN exogène. Cette matrice peut être fixée sur des surfaces dures (équipements de l'industrie alimentaire, surfaces de transport, de distribution et de stockage, sols,...etc.) ou sur des structures biologiques (légumes, viande, os, fruits,... etc.) (Flemming *et al.*, 2016).

Les substances polymériques extracellulaires (en anglais : extracellular polymeric substances ou EPS) 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 micro-organismes 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 leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (**Wingender et al., 1999**).

Selon (**Flemming et al. 2007 ; Das et al. 2013**), si les biofilms peuvent être vus métaphoriquement comme une « ville de microbes », les EPS représentent alors les « maisons des cellules du biofilm car ils les abritent des aléas physiques, biologiques et chimiques rencontrés dans l'environnement où se développe le biofilm. Les EPS ont ainsi plusieurs fonctions dans le biofilm, comme la promulgation de l'adhérence des bactéries sur la surface et entre elles, la formation et la maintenance de la structure du biofilm, l'augmentation de la résistance du biofilm contre le stress environnemental et la protection du biofilm contre les prédateurs (**Costerton et al., 1995**). Les EPS déterminent ainsi un micro-environnement dans lesquelles vivent les cellules du biofilm, micro-environnement caractérisé par sa structure (porosité, densité, quantité d'eau) et ses propriétés (charge du biofilm, hydrophobie, stabilité mécanique) :

– En terme de stabilité mécanique, les EPS ont ainsi un rôle protecteur contre la dessiccation des biofilms dans les milieux naturels car ils possèdent une grande quantité d'eau avec un très grand nombre de liaisons hydrogènes dans leur structure.

– En terme de réaction à un stress environnemental, ils peuvent entre autres, protéger les micro-organismes d'éléments toxiques. Par exemple, selon des études expérimentales in vitro, les cellules bactériennes dans les biofilms sont plus résistante aux antibiotiques que les cellules de la même espèce à l'état planctonique (**Ceri et al., 2001**). **Teitzel et Parsek (2003)** ont ainsi observé que les biofilms étaient entre 2 à 600 fois plus résistant au stress engendré par les métaux lourds que les cellules en culture libre.

Les EPS comptent entre 50% et 90% de la matière organique totale des biofilms (**Evans, 2003**). En terme de composition, selon (**Flemming et al., 2007**), contrairement à la connaissance commune, les EPS sont certainement plus que des

polysaccharides. Ils comportent, en outre, une grande variété de protéines, des glycoprotéines, des glycolipides et dans certains cas des quantités surprenantes de l'ADN extracellulaire. Ainsi en ce qui concerne les biofilms environnementaux, les polysaccharides représentent souvent uniquement un composant mineur du biopolymère. Cependant, les diverses fonctions de l'ADN des biofilms commencent seulement à émerger (**Das et al., 2013**).

Enfin, selon **Leriche et al. (2000)**, le taux de production des EPS ne dépend pas seulement du type d'organisme mais est également une fonction des conditions en termes de : nutriments, âge du biofilm, et environnement. Les conditions environnementales du point de vue hydrodynamiques semblent en particulier avoir une importance cruciale.

4. 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**).

4.1. 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 (on parle de « conditioning films » pour désigner ses films protéiques favorisant la formation de biofilms) sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (**De Chalvet et De Rochemonteix, 2009**).

4.1.1. Rugosité de la surface :

Des chercheurs ont rapporté une corrélation positive entre l'adhérence et l'augmentation de la rugosité de la surface (**Hoffman, 1983; Pedersen, 1990; Leclercq-Perlat et Lalande, 1994; Wirtanen et al., 1995**). Généralement l'augmentation de la rugosité de la surface affecte la rétention des micro-organismes sur cette surface (**Whithead et Verran, 2006**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (**Donlan et**

Costerton, 2002). 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.

Cependant, une des principales caractéristiques de l'adhérence bactérienne est l'hydrophobicité (**Carré et Mittal, 2011**).

4.1.2. 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 téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outrepasser les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaison hydrophobes (**Bendinger et al., 2003**).

4.2. 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. On peut citer les facteurs suivants (**Fletcher, 1988 ; O'Toole, 2000 ; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller, 2008**):

_ **Température** , En 1998 **Smoot et Pierson** ont montré que l'hydrophobicité augmentait quand la température de croissance diminuait. Comme elle affecte aussi l'activité métabolique et enzymatique des bactéries(**Dumas, 2007**) ,

_ **pH** : conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité (**Martinez, 2007**),

_ **Concentration en oxygène**,

_ **Concentration en fer**,

_ **Osmolarité**,

_ **Présence d'ions spécifiques**,

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

_ **Concentration en nutriments** : Les micronutriments peuvent fortement influencer le développement du biofilm. 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**). 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),

_ **Concentration en certains cations** : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na^+ , Calcium Ca^{2+} , ion ferrique Fe^{3+} , ion lanthanum) 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),

_ **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) (voir figure 05). La figure 05 indique plusieurs interactions qui se produisent dans un biofiltre.

_ **saison** : il existerait un effet saisonnier sur la formation de biofilms (Donlan, 1994).

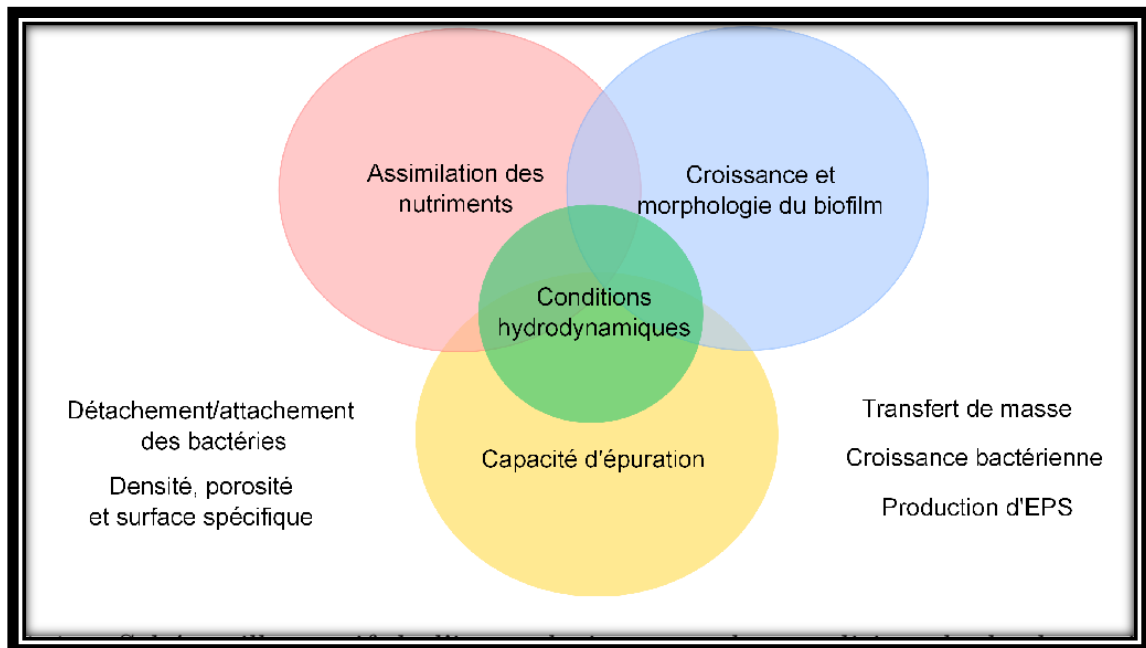


Figure 05 : Schéma illustratif de l'interrelation entre les conditions hydrodynamiques et le biofilm (De Andrade, 2016).

La formation d'un biofilm dépend, selon les bactéries, de conditions environnementales différentes. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* peut former des biofilms dans n'importe quelles conditions alors que d'autres bactéries nécessitent des conditions particulières de température, de pH ou encore de nutrition. Certaines

bactéries peuvent s'adapter à des milieux par des modifications génétiques (Clutterbuck, 2007).

Des conditions environnementales stressantes (fortes concentrations de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH) inhibent la biosynthèse du flagelle (Goller, 2008) (Voir tableau 01).

Tableau 01: Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm, d'après Donlan, (2002).

Propriétés de la surface/support	Propriétés du milieu	Propriétés de la cellule
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Texture de la surface, ➤ Rugosité de la surface, ➤ Hydrophobicité de la surface, ➤ Présence d'un film conditionnant à la surface. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vitesse du flux, ➤ pH , ➤ Cations présents dans le milieu (Ca²⁺ , Na²⁺, Fe³⁺...), ➤ Concentration en fer et en nutriments, ➤ Sources de carbone disponibles, ➤ Disponibilité en oxygène dans le milieu, ➤ Présence d'agents anti-microbiens. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hydrophobicité de la surface des cellules, ➤ Présence d'appendices (fimbriae, flagelles) ➤ Molécules de surfaces.

4.3. 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 microorganismes à cette dernière. Plusieurs éléments structuraux des bactéries

interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y voir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries 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 (Donlan, 2002).

La synthèse de fimbriae du type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas, température basse ou forte osmolarité) (Goller, 2008).

L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codants pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate et fer ; microaérophilie et croissance ralentie (Goller, 2008).

En général, les bactéries avec des caractéristiques hydrophobes préfèrent des matériaux avec des surfaces hydrophobes, et ceux ayant des caractéristiques hydrophiles préfèrent les surfaces hydrophiles (Mitik-Dineva *et al.*, 2009). Cependant, il a été démontré que des matériaux avec des surfaces hydrophobes jouent un rôle plus important dans l'adhésion que l'hydrophobicité de la surface bactérienne (Katsikogianni et Missirlis, 2004).

5. Organisation d'un biofilm :

La couche la plus profonde du biofilm est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente. La couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules en aérobiose et a croissance rapide. Entre ces deux couches de cellules, on trouve des cellules en microaérobiose. L'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments, d'ions... Les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches

superficielles du biofilm. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différente des micro-organismes (**Bury-Moné, 2007**).

Des simulations tridimensionnelles réalisées par informatique ont permis de montrer que les zones de croissance rapide du biofilm sont caractérisées par la présence de larges structures en colonnes contrairement aux zones de croissance réduite où l'on trouve un réseau étroit de structures entraînant ainsi une réduction des communications intercellulaires et de la croissance du biofilm (**Clutterbuck, 2007**).

5.1. Structure des biofilms :

Dans les conditions naturelles, les bactéries existent sous deux formes (**Clutterbuck, 2007**) :

- _ **libre** : mode de flottaison libre appelé forme planctonique,
- _ **sessile** : attaché, sous forme de biofilm.

Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe. La forme planctonique permet aux bactéries de proliférer et de coloniser de nouvelles niches. C'est la forme minoritaire. Brièvement, des bactéries sous forme libre s'attachent à une surface de façon irréversible, puis croissent. Ces bactéries produisent et accumulent des polymères extracellulaires, formant une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries sont immobilisées au sein de cette matrice. Leur proximité entre elles leur permet de réaliser des échanges de signaux et de nutriments. C'est cet ensemble qui forme le biofilm (**Clutterbuck, 2007**).

6. Le quorum sensing :

6.1. Définition et mécanismes :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de « QS ». Il s'agit de mécanismes de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisé par des signaux de cellule à cellule, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (**Costerton, 1999 ; Tomlin, 2005**). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (**Costerton, 1999 ; Clutterbuck, 2007 ; Irie, 2008**). La nature et la fonction des molécules signalant les

échanges de cellule à cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (**Costerton, 1999**). Des mutations de gènes impliqués dans les mécanismes de quorum sensing entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome (ensemble des ARNm au sein d'une population de cellules) et du protéome (ensemble des protéines traduites au sein d'une population de cellules), avec en particulier un contrôle de l'expression de facteurs de virulence comme les protéases par exemple (**Tomlin, 2005**).

6. 2. Les molécules du quorum sensing :

Les molécules du QS sont différentes selon les types de bactéries (**Parsek, 2004 ; Irie, 2008**). On trouve des acyl homosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries à Gram-négatives. La majorité des bactéries à Gram-positives utilisent des peptides auto-inducteurs, dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum sensing sont dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (**Irie, 2008**).

7. Transfert d'information génétique au sein du biofilm :

Les transferts horizontaux d'information génétique jouent un rôle important dans l'évolution et la diversité génétique des communautés microbiennes. L'un des principaux mécanismes de transfert génétique est celui de la conjugaison qui permet l'échange direct d'ADN par contact physique entre deux cellules via un pili de conjugaison. Les biofilms, en favorisant le contact des bactéries entre elles, offrent un environnement idéal pour le transfert de gènes par le mécanisme de conjugaison, et de nombreuses études ont montré que la fréquence de transferts génétiques par conjugaison augmentait lorsque les bactéries se développaient sous forme de biofilm (**Roberts *et al.*, 1999 ; Bjorklof *et al.*, 2000 ; Ghigo, 2001**).

La mise en évidence de la relation entre conjugaison et capacité à former un biofilm a de profondes conséquences écologiques. Elle suggère en particulier que les plasmides conjuguatifs, en exprimant des fonctions d'adhésion, favorisent l'accès de leurs bactéries hôtes aux biofilms, micro-environnements très favorables à la transmission horizontale de matériel génétique, un mécanisme essentiel d'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (**Ghigo, 2001**). Ainsi, l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine ou vétérinaire, en favorisant la sélection de

souches porteuses de plasmides vecteurs de résistance aux antibiotiques, pourrait également favoriser la formation des biofilms dont l'élimination pose un grave problème de santé publique (**Hall-Stoodley et al., 2004**).

Les bactéries peuvent acquérir des gènes de résistance par transfert de gène horizontal (HGT). En fait, le HGT conjugué au plasmide est considéré comme le processus le plus important dans l'émergence de nouveaux agents pathogènes résistants (**Schiwon et al., 2013**). Il est bien documenté que la conjugaison bactérienne peut se produire au sein des biofilms car elle offre une situation idéale pour l'échange de matériel génétique d'origines diverses (**Christensen et al., 1998; Hausner et Wuertz, 1999**). D'un autre côté, la conjugaison bactérienne peut induire la formation de biofilm puisque le contact de cellule à cellule établi pour l'échange de gènes favorise la proximité immédiate des bactéries nécessaires à la formation de biofilm (**Ghigo, 2001; Molin et Tolker-Nielsen, 2003; Reisner et al., 2006; Yang et al., 2008; D'Alvise et al., 2010**).

8. Le biofilms de *Pseudomonas* dans les installations de production alimentaire :

La présence des biofilms dans une usine alimentaire met la santé humaine en danger. Le niveau de risque dépend des espèces bactériennes formant cette structure vivante tridimensionnelle. Les principaux sites de développement de biofilms dépendent du type d'usine, mais peuvent comprendre de l'eau, du lait et d'autres conduites de liquide, des plaques de pasteurisateur, des membranes d'osmose inverse, des tables, des gants d'employés, des carcasses d'animaux, des surfaces de contact, des silos de stockage pour les matières premières et les additifs, les tubes distributeurs, matériaux d'emballage...etc. (**Camargo et al., 2017**).

Il est reconnu depuis longtemps que les surfaces des équipements et des ustensiles peuvent aider les micro-organismes à adhérer, à se développer et à devenir une source de détérioration. Parmi ces micro-organismes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* qui sont des membres des bactéries d'altération et sont également impliqués dans les processus d'adhésion et la formation de biofilms. Ces deux organismes d'altération se trouvent dans les environnements de transformation des aliments, y compris les drains et les planchers, sur les fruits, les légumes et la viande des surfaces.

Les composantes clés des EPS dans le biofilm de *P. aeruginosa* sont les exopolysaccharides y compris l'alginate, l'ADN extracellulaire (ADNe), les lipides et les protéines. Les pili extracellulaires du type IV (T4P) et les flagelles agissent également comme éléments structuraux dans les biofilms matures (**Van Schaik et al., 2005; Barken et al., 2008**). Les fimbriae jouent un rôle important dans les interactions de cellule à cellule au stade précoce de la formation du biofilm (**Wei et Ma, 2013**). La composition et les fonctions des EPS dans le biofilm de *P. aeruginosa* ont été mises en évidence dans plusieurs revues (**Flemming et Wingender, 2010; Moradali et al., 2017**).

Le lait est généralement stocké à basse température pendant 2 à 5 jours avant le traitement thermique (**De Jonghe et al., 2011; Baur et al., 2015**). Pendant le stockage, ce qui peut réduire la qualité du lait cru à cause des micro-organismes psychrotrophes (**Lafarge et al., 2004; Xin et al., 2017**).

Le *Pseudomonas* a été identifié comme une bactérie psychrotrophique, ce qui en fait l'un des groupes bactériens les plus importants de l'industrie laitière (**Wiedmann et al., 2000; Marchand et al., 2009a**). Les espèces de *Pseudomonas* les plus fréquemment détectées dans le lait et les produits laitiers sont *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi* et *P. lundensis* (**Mallet et al., 2012**). *Pseudomonas spp* peut croître sur une plage de températures de 4 à 42 °C, avec une température de croissance optimale supérieure à 20 °C (**Chakravarty et Gregory, 2015**). Ils sont présents dans des environnements différents et sont fréquemment liés à la détérioration des aliments, en particulier celle du lait cru (**Quigley et al., 2013; Chakravarty et Gregory, 2015**). Les *Pseudomonas* peuvent dépasser d'autres bactéries à basses températures, représentant au moins 50% de toutes les bactéries dans le lait (**Munsch-Alatossava et Alatossava, 2006; Fricker et al., 2011; von Neubeck et al., 2015**). La croissance des *Pseudomonas* est souvent associée à la production d'enzymes extracellulaires (par exemple, les peptidases et les lipases). Les peptidases sécrétées par *Pseudomonas* pendant le stockage à froid sont des peptidases extracellulaires thermostables qui peuvent conserver leur activité après pasteurisation ou traitement à ultra-haute température (UHT) (**Marchand et al., 2009b; Glück et al., 2016**).

9. Elimination du biofilm en industrie alimentaire :

La principale source de contamination des produits laitiers est souvent associée à la formation de biofilms à la surface des tuyaux de transport du lait, des conteneurs de traite et des accessoires dans les industries laitières (**Srey *et al.*, 2013**). Les biofilms sont établis principalement dans des conditions qui permettent aux bactéries d'adhérer facilement aux parois des tuyaux, par exemple, lorsque le lait se trouve dans des tuyaux de transport sans écoulement (**Stoodley *et al.*, 2002**). De plus, les bactéries du biofilm peuvent également augmenter la corrosion des tuyaux métalliques, réduire le transfert de chaleur et augmenter la résistance à la friction des fluides (**Kumar et Anand, 1998; Gupta et Anand, 2018**). C'est pour cette raison il est nécessaire de connaître le type de souillure à éliminer ainsi que le type de support (matériel) à nettoyer pour le choix du produit nettoyant. L'efficacité du nettoyage va dépendre de certains facteurs qui sont : l'action mécanique, l'action chimique (choix du produit de nettoyage), la température et le temps de contact. Ces quatre éléments forment le cercle de Sinner (**Wirtanen et Salo, 2003**). (Voir tableau 02).

Tableau 02 : Choix du produit nettoyant en fonction des souillures(**Diaby, 2018**).

Types de souillures	Détergents adaptés
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Souillures minérales :(exemple : terre,sable,poussière) ➤ Tartre ou calcaire. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Détergent neutre. ➤ Détergent acide(détartrant).
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Souillures organiques : ➤ Souillures fraîches de protéines et graisses(présente sur les surfaces impliquant un nettoyage manuel). ➤ Salissures blanchissables (café,fruits,vin...) ➤ Graisses cuites ou séchés. ➤ Graisses carbonisés (friteuse,gril,four...) ➤ Résidus sucrés. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Détergent alcalin doux avec un pH proche de la neutralité. ➤ Détergent alcalin doux. ➤ Détergent alcalin moyen (pH compris entre 9et 12.5). ➤ Détergent alcalin fort(pH compris entre 13.5 et 14). ➤ Détergent acide.

Les produits alcalins et acides sont des détergents couramment utilisés dans l'industrie alimentaire (**Simões et al., 2010**) par exemple les alcalins ayant réussi à éliminer les biofilms de *Pseudomonas putida* de l'acier inoxydable (**Antoniou et Frank, 2005**).

La meilleure manière de combattre les biofilms en IAA est la connaissance de son industrie et des processus de fabrication. Le respect des consignes d'utilisation est aussi un point important dans le cadre de la lutte contre les biofilms. Une opération de nettoyage et de désinfection ne respectant pas les paramètres indiqués par le fournisseur (concentration, temps de contact, plage de pH, température,...etc.) peut être inefficace.

Par exemple, un produit désinfectant peut avoir une action bactéricide et sporicide à une concentration donnée, mais une diminution de cette concentration peut

supprimer l'une des deux actions. L'utilisation d'un désinfectant à une concentration plus faible peut entraîner l'apparition des micro-organismes résistants. Afin d'éviter le phénomène de résistance des micro-organismes à un produit donné, il est recommandé de changer régulièrement le produit désinfectant (**David et Balty, 2014**).

Le système de nettoyage en place (CIP) est couramment utilisé par les industries pour contrôler les biofilms dans les chaînes de transformation du lait. Il s'agit d'une procédure de désinfection qui comprend le nettoyage régulier des tuyaux et des équipements en utilisant des solutions acides et alcalines appliquées à des températures élevées (**Bremer et al., 2006**). Il est utilisé essentiellement pour assurer la désinfection des surfaces propres et l'élimination des résidus organiques grâce à l'action des désinfectants dans les endroits difficiles d'accès (**Shi et Zhu, 2009**). Cependant, la contamination et la détérioration des produits causés par les biofilms sont toujours des problèmes récurrents (**Ostrov et al., 2016**). Un autre mécanisme lié à la persistance du biofilm est considéré comme l'expression génique différente dans la population multicellulaire, car certaines cellules entrent dans un état dormance ou persistance, manifestant une résistance ou une tolérance non héréditaire à différents agents antimicrobiens (**Wood et al., 2013; Singh et al., 2017**).

L'une des stratégies possibles pour lutter contre la formation de biofilms consiste à empêcher l'adhésion bactérienne aux surfaces à l'avance (**Palmer et al., 2007**). Cette stratégie comprend la réduction de la rugosité de surface, des revêtements antimicrobiens ou des composés antiadhésifs qui repoussent les cellules bactériennes au moyen de mécanismes physiques (**Verran et Whitehead, 2005; Lejars et al., 2012**). En raison du besoin de matériaux anti-biofilm non toxique, le revêtement des surfaces avec des agents antiadhésifs est plus attrayant car il n'implique pas de composés toxiques et n'est pas susceptible de provoquer le développement d'une résistance dans la flore bactérienne (**Nir et Reches, 2016**).

L'une des façons prometteuses de modifier les surfaces implique l'utilisation de peptides antimicrobiens. Ces peptides sont un groupe hétérogène de petites molécules produites par une grande variété de cellules qui présentent une puissante activité antibactérienne (**Batoni et al., 2011**). Certains peptides se caractérisent par leur capacité à inhiber la formation du biofilm (**Sakala et Reches, 2018**); par conséquent, de nombreuses tentatives ont été faites pour les utiliser sous leur forme naturelle ou synthétique dans les industries de la médecine et de l'alimentation (**Geng et al., 2018**).

Ces peptides influencent les processus cellulaires bactériens et, par conséquent, les bactéries peuvent développer une résistance, ce qui se produit dans le cas des antibiotiques (**Chung et Khanum, 2017; Hamley, 2017**).

Partie II

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude :

La partie pratique de cette étude s'était programmé dans le laboratoire de microbiologie de la faculté SNV-ST de l'université de khemis-Miliana.

2. Origine des souches :

À fin d'évaluer la capacité de formation de biofilm nous avons procédé à travailler sur 11 souches de *Pseudomonas spp* isolées à partir des canalisations post et pré pasteurisation (les souches proviennent d'une ancienne collection).

3. Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne par la technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) :

L'hydrophobicité de la paroi est estimée selon le protocole MATH(Rosenberg, 1981, 2006) avec des modifications minimales et en utilisant l'hexadécane comme solvant. Les souches sont cultivées séparément dans 5 ml de bouillon tryptone soja TSB et incubées pendant 18h à 37°C. Les cellules sont récupérées après centrifugation (5000 tours /min) pendant 15 minutes. Le culot obtenu est ensuite lavé après 2 centrifugations successives à l'aide du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline pH= 7.1) et mis en suspension dans le même tampon à une densité optique initiale (DO_i) comprise entre 0,8 et 1 à 600 nm. Un volume de 0,3 ml de chaque solvant est additionné à 1,8 ml de suspension bactérienne puis l'ensemble est agité au vortex pendant 2 min. Après 20 min de décantation, la DO (DO_f) de la phase aqueuse est mesurée à 600 nm . Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'adhésion au solvant (CSH \%)} = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \times 100$$

Lorsque la CSH(%) < 20% hydrophile,

CSH(%) > 40% hydrophobe,

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

4. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* : Méthode de culture sur microplaque (TCP) sous différentes 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 du bouillon nutritif ou bouillon tryptone 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.

4.1.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 (PBS, pH 7,4) et remis en suspension dans du BN stérile frais et TSB (concentration finale d'environ 10⁶ UFC / ml) selon les éléments suivants les 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 sert 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 PBS (pH=7.4) afin d'éliminer les bactéries non adhérentes, puis la microplaque est séchée à une température ambiante en position inversée pendant 30 min.

Les puits de la microplaque séchés sont ensuite colorés par 200 µl de Cristal violet à 1% dans chaque puits, après 15 min le colorant Cristal 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 200 µl d'éthanol à 95% pour le processus de solubilisation du Cristal violet contenu dans le biofilm formé dans les puits.

La densité optique est mesurée à 570 nm par le lecteur de microplaque (ELISA ; technique immuno-enzymatique) (modèle 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 ($DO_{570} \leq DO_{\text{control}}$)

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

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

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

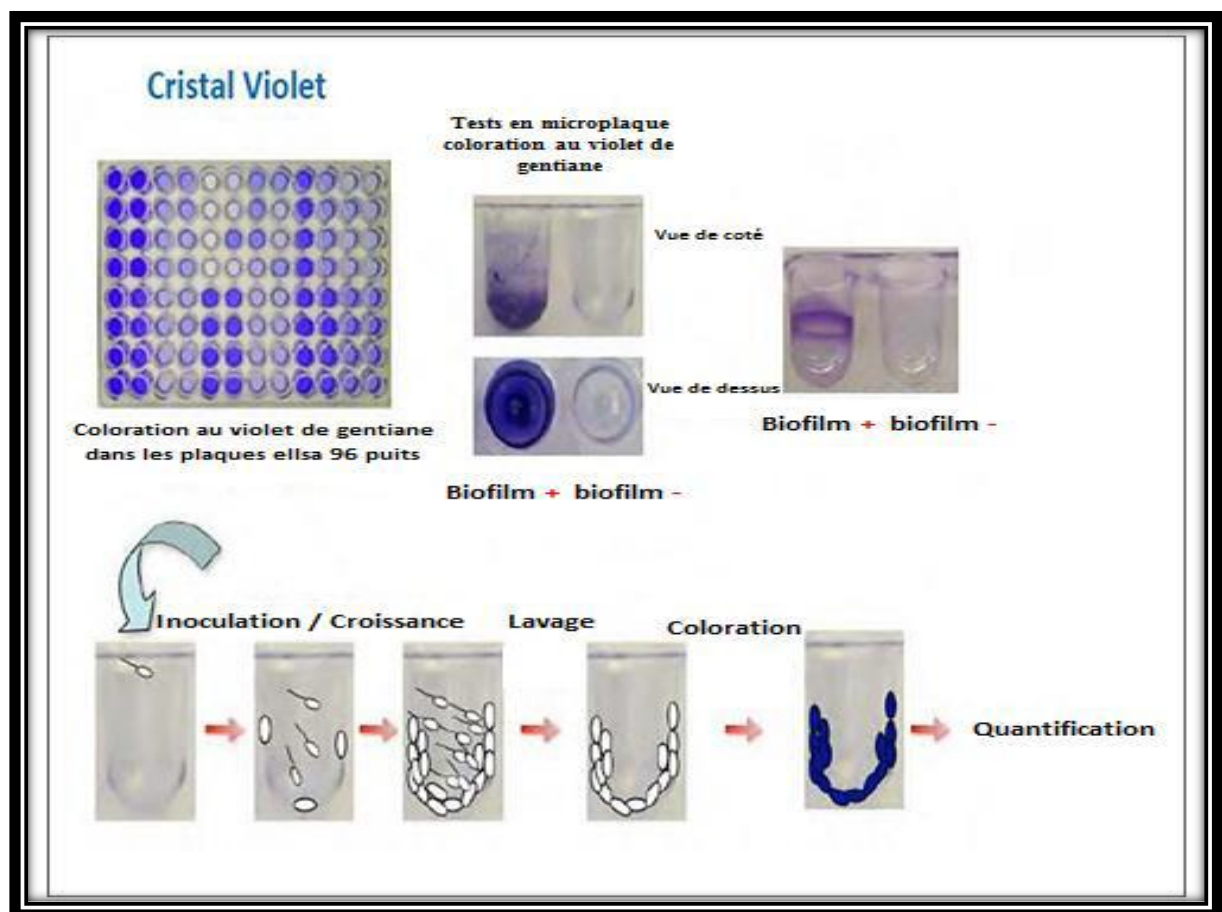


Figure 06 : Formation de biofilm en microplaque (Bellifa, 2014).

5. Evaluation de la formation de biofilm sur acier inoxydable sous différents conditions :

5.1. Traitement des lames d'acier inoxydable :

Les lames d'acier inoxydable appelées également « inox » sont préparées suivant la technique de (Peng , 2001).

-Les lames coupées dans des dimensions de 5 cm sur 2 cm sont submergées dans un mélange d'éthanol et d'acétone (v/v) pendant une heure, afin d'éliminer les traces des matières grasses.

-Rinçage à l'EDS.

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

-Un deuxième rinçage des lames à l'EDS.

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

-Et enfin un dernier rinçage à l'EDS.

5.2. Formation du biofilm sur les lames d'acier inoxydable :

Cette technique a été effectuée selon (Lee *et al.*, 2015).

Chaque souche de *Pseudomonas* a été cultivée dans 5 ml de TSB ou BN pendant 24h à 37°C, puis 1ml de chaque suspension bactérienne est transféré dans des tubes à essai contenant 10 mm de PBS (pH 7.4) et des lames d'inox (type 316,5 cm par 1 cm), les tubes sont incubés à 37°C pendant 2h pour permettre l'adhésion des cellules bactériennes à la surface des lames d'inox.

Après 2h les lames sont séchées et immergées dans des tubes contenant du TSB ou BN pendant 24h à 37°C, après incubation les lames sont lavées 3 fois à l'eau distillée stérile et séchées puis colorées par 1 ml de Cristal violet 0.5% pendant 2 min, l'excès de Cristal violet est éliminé et les lames sont rincées à l'eau distillée stérile.

Le Cristal violet incorporé dans le biofilm est solubilisé par 1 ml d'éthanol 99%, la densité optique est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre.

Partie III

**Discussion des résultats
antérieurs**

P. aeruginosa est une bactérie qui réside généralement dans la nature sous forme de biofilm (Nagant, 2013), c'est l'une des bactéries les plus abordées dans l'étude des biofilms (Musk *et al.*, 2005).

Selon Kochkodan *et al.* (2008) et Giaouris *et al.* (2009), l'hydrophobicité de la surface cellulaire est un facteur majeur d'adhésion bactérienne et de formation de biofilm. Ceci est soutenu par Krasowska et Sigler. (2014)

Pour faciliter l'adhérence aux substrats hydrophobes, les bactéries dégradant les hydrocarbures peuvent augmenter l'hydrophobicité de la surface cellulaire en modifiant les composants de la surface cellulaire (Morgan et Watkinson, 1993). De plus, les cellules microbiennes peuvent produire des substances polymères extracellulaires (EPS) sous forme de capsules ou de sécrétions mucoïdes qui peuvent interagir avec des substrats hydrophobes, tels que des hydrocarbures (Abdel-megeed, Suliman et Mueller, 2014).

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (Jana *et al.*, 1999; Cappello et Guglielmino, 2006).

D'autre part, le rôle des fimbriae en tant que déterminant principal de l'hydrophobicité de la surface cellulaire de *P. aeruginosa* a été élaboré par des études microscopiques. Les fimbriae et autres structures de surface filamenteuses, telles que les pili et les flagelles, servent d'hydrophobines et confèrent un caractère hydrophobe élevé aux organismes dans lesquels elles se trouvent (Lindahl *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1982; Rosenberg et Kjellenberg, 1986; Irvin, 1990; Wadstrom, 1990; Deziel *et al.*, 2001).

Les flagelles, les pili type IV et les fimbriae se sont avérés jouer principalement des fonctions auxiliaires en tant que facteurs d'adhésion et support structurel dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Whitchurch *et al.*, 2002). Les flagelles interviennent dans la motilité de *P. aeruginosa*. Il peut également agir comme une adhésine et jouer un rôle critique dans les interactions initiales cellule-surface (O'Toole et Kolter, 1998). De plus, la présence de flagelles fonctionnels permet à la

bactérie de nager et de surmonter les forces électrostatiques répulsives qui peuvent exister entre la surface cellulaire et la surface du matériau ou du film de conditionnement de l'hôte (O'Toole et Kolter, 1998).

Une étude récente montre que *P. aeruginosa* avait présenté des propriétés de surface hydrophobes vers un solvant apolaire (hexadécane) et à une croissance assez lente. En raison des propriétés de surface hydrophobes et de la lenteur de croissance, *P. aeruginosa* a montré une forte formation et persistance de biofilm. Parmi plusieurs organismes, *P. aeruginosa* est comparativement plus hydrophobe, à croissance lente et adopte le mode de vie du biofilm assez tardivement. Ces résultats suggèrent que l'hydrophobicité de la surface cellulaire est directement proportionnelle à la formation de biofilm et à la population de variantes de petites colonies « S C Vs » (Small Colony Variants) et inversement proportionnel au taux de croissance du sujet s'isole (Zulfiqar *et al.*, 2018).

L'hydrophobicité des cellules de *P. aeruginosa* a été déterminée par **Khelissa *et al.* (2019)** en mesurant l'affinité des cellules du biofilm de *P.aeruginosa* et des cellules planctoniques pour l'hexadécane. L'augmentation de la température de croissance de 20 à 37°C a diminué l'affinité des cellules planctoniques pour l'hexadécane de 71 à 50% ($P < 0,05$; voir figure 07).

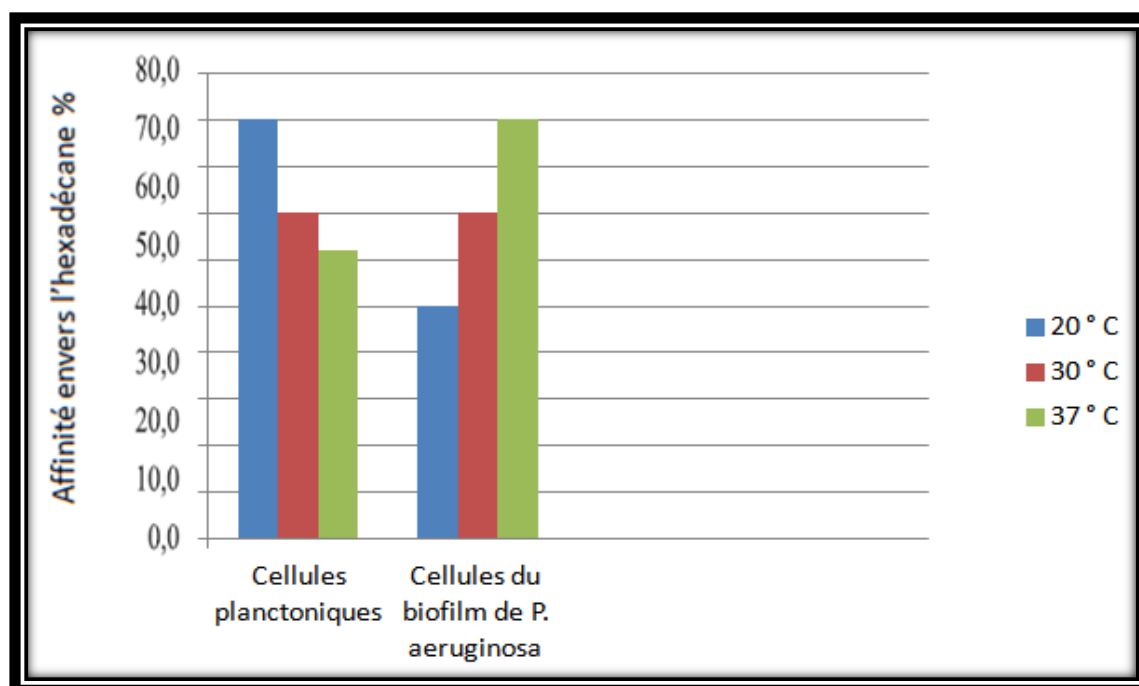


Figure 07 : Affinité du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et des cellules planctoniques cultivées à 20, 30 et 37 °C avec l'hexadécane (Khelissa *et al.*, 2019).

Les résultats de **Khelissa et al. (2019)** ont montré que l'hydrophobicité des cellules du biofilm de *P. aeruginosa* augmente lorsque la température de croissance de cette bactérie passait de 20 à 37 °C.

Le polystyrène est largement utilisé dans l'industrie médicale et agroalimentaire, en raison de son faible coût, de sa durabilité, de sa facilité de production (**Lerman et al., 2018**) .

D'après **Hassan et al. (2011)** la méthode TCP est une technique sensible, simple et fiable utilisée pour révéler la formation d'un biofilm in vitro. Cette méthode consiste à cultiver des souches bactériennes dans des microplaques de titration en polystyrène à 96 puits et nécessite l'utilisation du cristal violet comme indicateur de viabilité cellulaire. Les résultats de la coloration obtenus peuvent être observés à l'œil nu ainsi que sa quantification nous permet de déterminer la masse du biofilm formé (**Musk et al., 2005**).

Le développement des biofilms en fonction du temps a été étudié par **Valeria et al. (2020)** en utilisant le comptage de cellules viables et une quantification de la densité optique, en utilisant le test CV (Cristal Violet). Le développement a été étudié pour des niveaux d'inoculum de 10^4 et 10^7 UFC/ ml (voir figure 08). Les résultats montrent que la densité optique mesurer de *P.fluorescens* en utilisant l'inoculum de 10^4 et de 10^7 sont presque les mêmes, c'est-à-dire que la charge microbienne ne reflète rien sur l'adhésion au polystyrène.

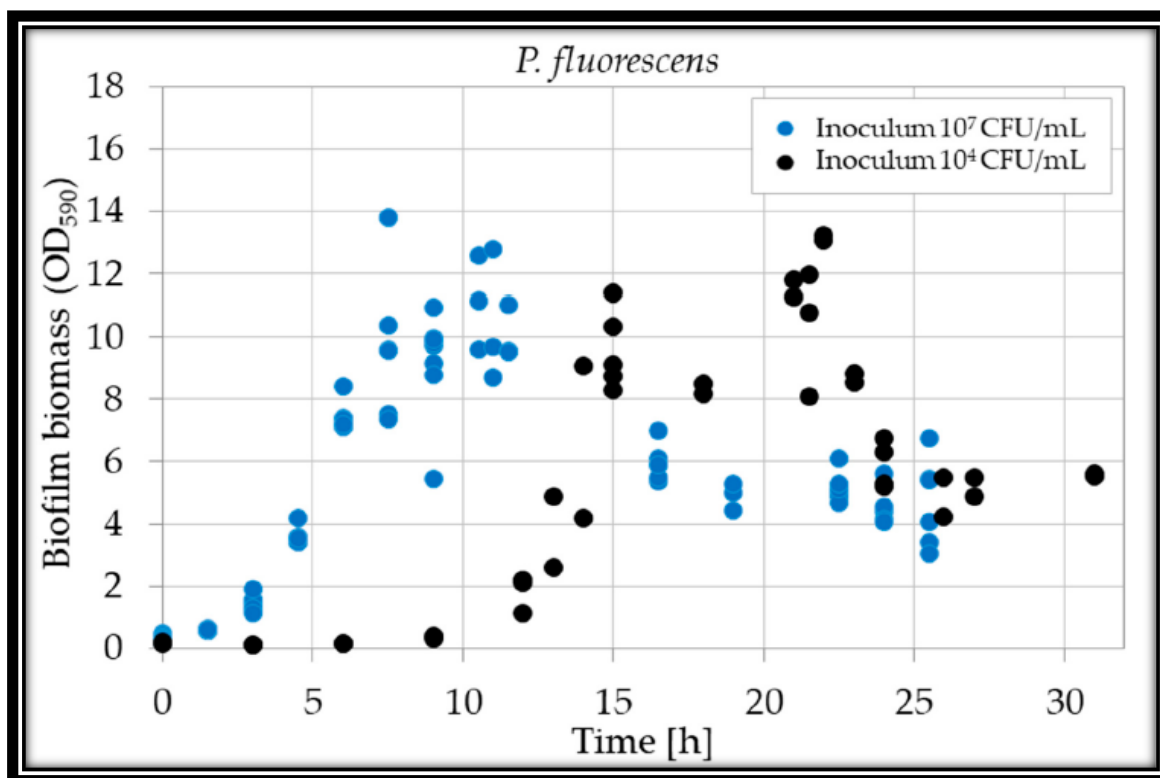


Figure 08 : Développement de la biomasse du biofilm de *P. fluorescens* après coloration CV. Variation de la densité optique (DO₅₉₀) dans le temps obtenue avec des niveaux d'inoculum de 10⁴ (points noirs) et 10⁷ (points bleus) CFU / ml.

(Valeria *et al.*, 2020).

Valeria *et al.* (2020) ont trouvé que les molécules organiques produites par *P. fluorescens* (par exemple, l'alginate) plus les molécules présentes dans le milieu de croissance (par exemple, le glucose, le soja et la peptone de caséine) ont facilité le conditionnement de la surface. Les micro-organismes ont rapidement formé une couche qui a neutralisé les charges de surface excessives et l'énergie libre de surface, facilitant la croissance ainsi l'adhésion sur le polystyrène.

Sabaeifard *et al.* (2014) , ont étudiés la capacité de formation de biofilm de 10 souches de *Pseudomonas spp* par la méthode TCP, dont la formation de biofilm est mesurer par un lecteur d'absorbance (à 590nm) de microplaques. Les résultats obtenus sont en forme d'histogramme (voir figure 09). Ils montrent que les souches n'ont pas produits de biofilms durant les deux périodes de temps, ceci explique que le changement de temps ne reflète pas sur la formation de biofilm.

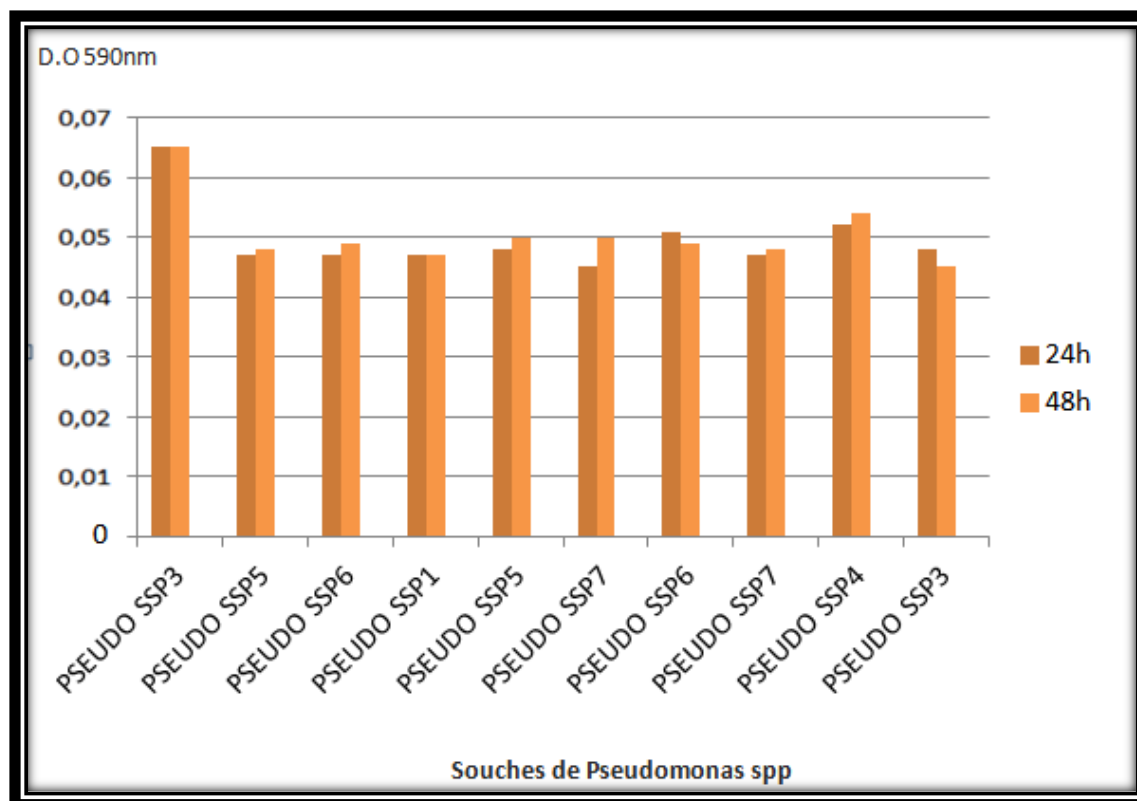


Figure 09 : la formation de biofilm par les souches de *Pseudomonas spp* après 24 heures et 48 heures d'incubation (Sabaeifard *et al.*, 2014).

Les résultats de Stepanović *et al.* (2007), montrent que les souches de *Pseudomonas spp* sont des souches non productrices de biofilms durant les deux périodes d'incubation (24h et 48h). Ces résultats sont similaires à celui de Sabaeifard *et al.* (2014).

Durant une incubation des souches de *Pseudomonas fluorescens* à 10 °C il y avait une formation de biofilm modérée, par contre l'incubation des souches à 30 °C n'a révélé aucune formation de biofilm. Ceci peut être due à la mobilité des cellules ; la présence des flagelles (Rossi *et al.*, 2016).

Une préculture de *P.aeruginosa* remise en suspension pendant une nuit a été diluée 5000 fois (environ 5×10^6 UFC / ml) avec TSB + 1% Glu + 0,6% YE. Le TSB donne une croissance remarquable de *P.aeruginosa* , car il contient une digestion enzymatique de caséine, une digestion enzymatique de farine de soja, du chlorure de sodium, du phosphate dipotassique et du dextrose. Deux cents microlitres de chacune de la suspension ont été ajoutés à huit puits de microplaques en polystyrène stérile à 96 puits (fond plat) quatre puits avec du milieu uniquement servi de blanc. Les

plaques ont été incubées pendant sept intervalles de temps différents (8 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 120 h) dont 72 h se sont avérés établir un biofilm mature et ont été incubés à 5 températures différentes (4°C, 18°C, 25°C, 30°C et 37°C) pour déterminer l'impact de la température sur formation de biofilm. La densité optique a été lue à 600 nm pour déterminer la densité de croissance des cellules et la force du biofilm à 595 nm en utilisant une coloration au Cristal violet, l'exopolysaccharide (EPS) formé à différentes températures a été quantifié en utilisant une coloration au rouge de ruthénium à DO₄₅₀ nm en utilisant lecteur de microplaques (Systronics, Bangalore). D'après les recherches il s'est avéré que l'incubation des microplaques pendant 72h à 30 °C est la meilleure pour l'adhésion des souches à la surface en polystyrène. De plus, une composition comme le glucose et l'extrait de levure induit une excellente croissance de la bactérie. Les résultats des paramètres physico-chimiques indiquent que, TSB + 1,0% Glu + 0,6% YE a donné une croissance significative in vitro (**Zameer et al., 2009**).

Zameer et al. (2010) ont constatés que les bactéries généralement préfèrent se fixer à des surfaces hydrophobes à faible énergie telle que le polystyrène plutôt qu'à des surfaces hydrophiles à haute énergie telle que le verre.

D'après **Scott et Edmund. (1997)**, le conditionnement de surface par TSB ,RSM (lait écrémé reconstitué) RSM + Saccharose représente le potentiel d'encrassement de l'acier inoxydable dans des conditions de transformation alimentaire; le conditionnement en PBS représente une surface propre. Les résultats de cette étude montrent que l'effet des salissures sur l'adhérence variait avec chaque micro-organisme et chaque milieu de croissance. En plus de l'effet de salissure, les conditions de croissance semblent également influencer l'adhérence. D'autres chercheurs ont observé des résultats similaires comme **Helke et al. (1993)**.

Le tableau 03 indique que la concentration d'adhérence de *P.fragi* dans le TSB est élevé, et lorsque la croissance dans RSM et RSM + Sac a été comparée, ils ont vu que l'addition de saccharose n'améliorait pas la croissance.

Tableau 03 : Concentration de *P.fragi* cultivée dans divers milieux de culture après centrifugation et remise en suspension dans du PBS (Scott et Edmund, 1997).

Microorganisme étudié	Concentration (UFC/ml) en milieu de culture		
	TSB	RSM	RSM+Sac
<i>P.fragi</i>	1.30×10^8	4.15×10^7	4.10×10^7

Les cellules de *P. fragi* ont adhéré en nombre substantiel dans toutes les conditions testées (voir figure 10). Dans chaque milieu de conditionnement, les plus grands niveaux d'adhérence des cellules de *P. fragi* ont été observés lorsque la culture avait été cultivée dans RSM + Sac. Lorsque la surface était conditionnée dans du PBS, le milieu de croissance n'affecte pas l'adhérence. De plus, lorsque RSM + Sac était utilisé comme milieu de croissance, l'adhérence semblait être améliorée.

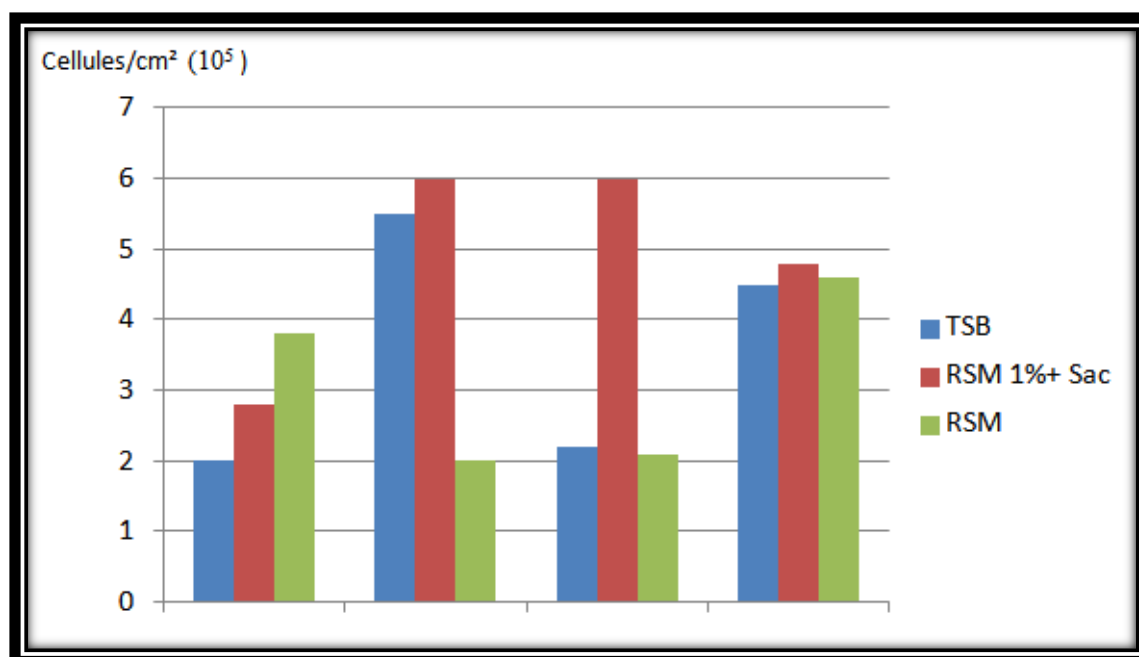


Figure 10 : Nombre de cellules *P. fragi* adhérentes observées après 30 min de temps de contact avec de l'acier inoxydable conditionné. Milieu de croissance: TSB , RSM, RSM+Sac (Scott et Edmund, 1997).

Selon les recherches de **Khelissa et al. (2019)**, les cellules du biofilm de *P.aeruginosa* adhèrent mieux aux surfaces abiotiques que les cellules planctoniques.

La température de croissance a affecté l'adhésion des cellules de *P.aeruginosa* à l'acier inoxydable en influençant leurs propriétés physico-chimiques de surface. Les résultats ont montré que le PZ « Potentiel Zeta » des cellules planctoniques augmentait de -20 à -35 mV ($P < 0,05$) lorsque la température de croissance augmentait de 20 à 37°C (voir figure 11). De plus, les résultats ont montré que le type de surface « l'acier inoxydable » avait un effet significatif sur le PZ des cellules du biofilm.

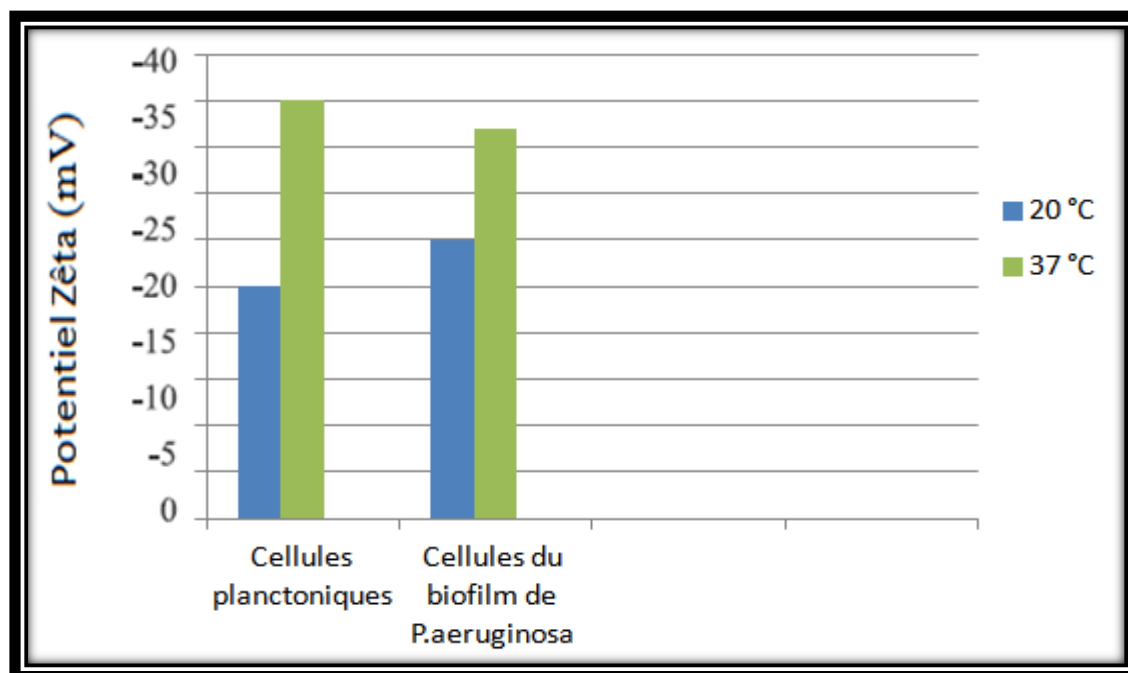


Figure 11 : Potentiel Zêta des cellules planctoniques et des cellules du biofilm de *P.aeruginosa* cultivé à 20 et 37°C pendant 24 heures sur l'acier inoxydable d'après **Khelissa et al. (2019)**.

En général, les cellules hydrophobes adhèrent plus fortement aux surfaces hydrophobes, tandis que les cellules hydrophiles adhèrent fortement aux surfaces hydrophiles (**Kochkodan et al., 2008 ; Giaouris et al., 2009**).

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

La capacité des souches de *Pseudomonas spp* à se fixer aux surfaces et à se développer en un biofilm a été d'un intérêt considérable pour de nombreux groupes dans de nombreuses industries, y compris l'industrie médicale et alimentaire, comme ils sont capables de coloniser de multiples niches environnementales en utilisant des composés naturels comme sources d'énergie. Du fait que ces souches sont psychrotrophique, elles altèrent le lait très souvent. Selon les études menées par différents chercheurs, les résultats ont montré que les interactions hydrophobes jouent un rôle crucial dans l'attachement bactérien aux surfaces (acier inoxydable et polystyrène). Sachant que l'hydrophobicité des cellules bactériennes pourrait être affectée par : la production d'EPS, la température du milieu de croissance, la concentration et l'abondance des nutriments, la présence des flagelles et de pili, et la charge de la surface du substrat. Cela confirme l'importance de considérer la capacité de formation de biofilm et d'adhésion comme un facteur majeur de virulence et de pathogénèse bactérienne, ce qui peut être utile pour comprendre le développement sur les surfaces de transformation des aliments.

Cette étude vise à évaluer la capacité des souches de *Pseudomonas spp* à former un biofilm sur différentes surfaces abiotiques (microplaque, inox), en déterminant l'hydrophobicité de surface bactérienne et son influence sur la capacité des souches à former des biofilms.

Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées à partir des prélèvements issus des canalisations post et pré -pasteurisation. Les souches ont été identifiées selon les méthodes phénotypiques et biochimiques, et confirmés par la technique MALDI-TOF MS.

Sachant que la partie pratique n'a pas été réalisée à cause de la crise sanitaire COVID-19, aucun résultat relatif à notre étude n'a été obtenu, nous souhaitons que ce travail soit réalisé par d'autres étudiants.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdel-Megeed A, Suliman. A.A and Mueller. R .2014. Cell Surface Hydrophobicity and Assimilation of Hexadecane by *Pseudomonas frederiksbergensis*. Journal of Pure and Applied Microbiology, Vol. 8(4), p. 2817-2822.

Annous B.A., Fratamico P.M.,and Smith J.L. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. J. Food Sci. 74(1): R1–R14.

Antoniou A., Frank J. F. 2005. Removal of *Pseudomonas putida* and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. J. Food Prot. 68: 277–281.

Alain, & Mittal, Kash L. 2011. Surface and Interfacial Aspects of Cell Adhesion. CRC Press.

B

Banin E., Vasil M. L., and Greenberg E. P. 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:11076-11081.

Barken K. B., Pamp S. J., Yang L., Gjermansen M., Bertrand J. J., Klausen M., Michael . G., Cynthia B.W, Joanne N E, and Tim T N. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ. Microbiol. 10, 2331–2343. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x.

Batoni G., Maisetta G., Brancatisano F. L., Esin S., and Campa M. 2011 . Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. Curr. Med. Chem. 18, 256–279. doi: 10.2174/092986711794088399.

Baur C., Krewinkel M., Kranz B., von Neubeck M., Wenning M., Scherer S., Stoeckel M., Hinrichs J., Stressler T. and Fischer L. 2015. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. Int. Dairy J. 49, 23–29. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.04.005.

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.

Références bibliographiques

Beloin C., Roux A., and Svanborg C. 2005. *Echerichia coli*, biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322,249-289.

Bendinger B., Rijnaarts H.H., Altendorf K., and 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.

Bower CK, McGuire J, and Daeschel MA . 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends Food Sci Technol* 7:152-157.

Bremer P. J., Fillery S., and Mcquillan A. J. 2006. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int.J.Food Microbiol.* 106,254–262 .doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.

Bury- Moné S. 2007. Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.

C

Camargo C. A, Joshua J. W , Douglas R. C, and Luís A. N. 2017. Foodborne Pathogens and Disease ,VOL. 14, NO. 11. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2274>.

Cappello S. and Guglielmino S.P. 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Brazilian Journal of Microbiology*37, 205-207.

Carré A and Mittal K.L. 2011. *Surface and Interfacial Aspects of Cell Adhesion*. CRC Press.

Ceri , Howard, Olson, Merle, Morck, Douglas, Storey, Douglas, Read, Ronald, Buret, Andre, and Olson, Barbara. 2001. [25] The MBEC assay system : Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. Pages 377–385 of : Doyle, Ron J. (ed), *Methods in Enzymology. Microbial Growth in Biofilms - Part B : Special Environments and Physicochemical Aspects*, vol. 337. Academic Press.

Chakravarty S., and Gregory, G. 2015. “The genus *Pseudomonas*,” in *Practical Handbook of Microbiology*, eds E. Goldman and L. H. Green (New York, NY: CRC Press), 321–344.

Références bibliographiques

Christensen B. B., Sternberg C., Andersen J. B., Eberl L., Moller S., Givskov M., and Molin.S. 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2247–2255.

Chung P. Y., and Khanum, R. 2017. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multi drug resistant bacteria. *J. Microbio. Immunol. Infecti.* 50, 405–410. doi: 10.1016/j.jmii.2016.12.005.

Clutterbuck A. L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A., and Percival S. L. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, Mars 31; 121(1), 1-17.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., and Lappin-Scott H M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.

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

D

D'Alvise P. W., Sjöholm O. R., Yankelevich T., Jin Y., Wuertz S., and Smets B. F. 2010. TOL plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440. *FEMS Microbiol. Lett.* 312, 84–92. 10.1111/j.1574-6968.2010.02105.x .

Das, Theerthankar, Sehar, Shama, Manefield, and Mike. 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 778–786.

David C., and Balty I. 2014. INRS. La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie.

De Andrade P.M.2016. Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. *Mécanique des fluides [physics.class-ph]*. Université Grenoble Alpes.

De Chalvet., and De Rochemonteix A. 2009. Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.

De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos.P, and Heyndriksx.M .2011. Influence of storage conditions on the growth

Références bibliographiques

of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 77, 460–470. doi: 10.1128/AEM.00521-10.

Dewangan A K, Patel A D, and Bhadania A G. 2015 . Stainless steel for dairy and food industry: a review. J. Mater. Sci. Eng;4(5):1–4.

Deziel E, Comeau Y, and Villemur R. 2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated, and highly adherent phenotypic variant deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. J Bacteriol 183: 1195–1204.

Diaby K. 2018 . Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination. Université de Lille 2. Faculté Ingénierie et Management de la Santé (ILIS).

Dogan B, and Boor KJ .2003.Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. Applied and Environmental Microbiology 69: 130-138.

Donlan R.M, and Costerton JW. 2000. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews.15: 167- 193.

Donlan R.M .2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8 (9), 881-890.

Donlan R.M, Pipes W.O, and Yohe T.L .1994. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. Water. Res., 28 : 1497-1503.

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

E

Evans L. V. 2003. Biofilms : Recent Advances in their Study and Control. CRC Press.

F

Filloux A., and Vallet I. 2003. Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. Med.Sci. (Paris). Jan;19(1):77-83.

Flemming H.C., and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623–633. doi: 10.1038/nrmicro2415.

Références bibliographiques

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.

Flemming, Hans-Curt, Neu, Thomas R., and Wozniak, Daniel J. 2007. The EPS Matrix : The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947.

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

Francois, Crawford, Russell J., and Ivanova, Elena P. 2009. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* , and *Staphylococcus aureus* attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness. *Current Microbiology*, 58(3), 268–273.

Fricker, M., Skanseng, B., Rudi, K., Stessl, B., and Ehling-Schulz, M. 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 145(Suppl. 1), S24–S30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025.

G

Geng H. J., Yuan Y., Adayi A., Zhang X., Song X., Gong L., Zhang X, and Gao P. 2018. Engineered chimeric peptides with antimicrobial and titanium-binding functions to inhibit biofilm formation on Ti implants. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 82, 141–154. doi: 10.1016/j.msec.2017.08.062.

Ghigo J.M. 2001 . Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 442–445. 10.1038/35086581.

Giaouris E, Chapot-Chartier MP, and Briandet R. 2009. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int J Food Microbiol*;131:2–9.

Glück C., Rentschler, E., Krewinkel, M., Merz, M., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer.S, Stoeckel.M, Hinrichs.J, Stressler.T, and Fischer.L . 2016. Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. *Int. Dairy J.* 56, 186–197. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.01.025.

Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., and Jacques M .2016. Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. *PP* : 215-229.

Références bibliographiques

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

Gupta S and Anand S. 2018. Midwest Dairy Foods Research Center,Dairy and Food Science Department,South Dakota State University,Brookings,SD 57007,USA.

H

Hall-Stoodley L, Costerton JW, and Stoodley P. 2004. Feb; 2(2):95-108. *Nat Rev Microbiol*. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.

Hamley, I. W. 2017. Small bioactive peptides for biomaterials design and therapeutics. *Chem. Rev.* 117, 14015–14041. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00522.

Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., and Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*. 2011 Jul-Aug;15(4):305-11.

Hausner M.,and Wuertz S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710–3713.

Helke D M ., Somers E B ., and Wong A C L. 1993. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components . *J Food Prot* 56(6): 479– 84.

Hoffman W. 1983. CIP of straight pipes as a function of surface roughness and other factors.Mémoire pour l'obtention du doctorat de la Faculté d'agriculture de la Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

I

Irie Y, and Parsek MR .2008. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 67- 84.

Irvin R.T. 1990. Hydrophobicity of proteins and bacterial fimbriae. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity* (Doyle R.J. Rosenberg M., eds), pp. 137–177. American Society of Microbiology, Washington DC.

Références bibliographiques

J

Jana T., Srivastava. A., Csery. K.,and Arora. D.1999. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. Canadian journal of microbiology46, 28-37.

K

Kaplan J. B. 2010, Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, Journal of Dental Research, 89 (3): 205-215.

Katsikogianni M and Missirlis Y. F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. European Cells & Materials, 8, 37–57.

Khelissa S O, Marwan A, Charafeddine J, Alexandre B, and Nour-Eddine C. 2019. Comparative Study on the Impact of Growth Conditions on the Physiology and the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Planktonic Cells. Journal of Food Protection 2019.82:1357-1363.

Kochkodan V, Tsarenko S, Potapchenko N, Kosinova V, and Goncharuk V. .2008.Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO₂. Desalination.;220:380–385.

Krasowska A, and Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? Front Cell Infect Microbiol. 2014 .;4:112.

Kuchma S. L., Connolly J. P., and O'toole G. A. 2005. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology, 187(4), 1441-1454.

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

L

Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., and Delacroix-Buchet A. .2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Appl.Environ. Microbiol. 70, 5644–5650. doi: 10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004.

Références bibliographiques

Lebeaux D and Ghigo J M .2012. Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles? *Med Sci (Paris)* 28:727–39.

Lebeaux D., Ghigo J M., and Lucet, J. C. 2014. Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. *La Revue du praticien*, 64(5), 620-625.

Leclercq-Perlat M. N and Lalande M. 1994. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *J. Food. Eng.* 23: 501±517.

Lee J.S., Bae Y.M., Lee S.Y., and Lee S.Y. 2015. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. *Journal of food science*80, M2279-M2286.

Lejars, M., Margailan, A., and Bressy, C. 2012 . Fouling release coatings:a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chem. Rev.* 112, 4347–4390. doi: 10.1021/cr200350v.

Leriche V., Sibille P., and Carpentier B. 2000. Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1851–1856.

Lerman M.J, Lembong J, Muramoto S, Gillen, G, and Fisher J.P. 2018 . The evolution of polystyrene as a cell culture material. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 24, 359–372, doi:10.1089/ten.TEB.2018.0056.

Lindahl M.F., A.Wadstrom., and T.Hjerten S. 1981. A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta* 677:471-476.

M

Mallet A.,Guéguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboué A., and Desmasures N. 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int. Dairy J.* 27, 13–21. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.07.009.

Marchand S., Heylen K., Messens W., Coudijzer K., De Vos P., Dewettinck, K., Herman L., De Block J., and Heyndriks M. 2009a . Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*,

Références bibliographiques

predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. Environ. Microbiol. 11, 467–482. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.

Marchand S., Vandriesche G., Coorevits A., Coudijzer K., De Jonghe V., Dewettinck K., De Vos P., Devreese B., Heyndrikx M., and De Block J. 2009b . Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. Int. J. Food Microbiol. 133, 68–77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027.

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

McDougald D., Rice S. A., Barraud N., Steinberg P. D., and Kjelleberg S. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. Nature Reviews Microbiology, 10(1), 39-50.

Mitik-Dineva, Natasa, Wang, James, Truong, Vi Khanh, Stoddart, Paul, Malherbe, Mogha K. V., Shah N. P., Prajapati J. B., and Chaudhari A. R. 2014. Biofilm a threat to dairy industry. Indian Journal of Dairy Science, 67(6).

Molin S., and Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 255–261. 10.1016/S0958-1669(03)00036-3.

Monds R. D., Newell P. D., Gross R. H., and O’Toole G. A. 2007. Phosphate dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. Mol Microbiol. 63:656-679.

Moradali M.F., Ghods S., and Rehm B.H.A.2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Front. Cell Infect. Microbiol. 7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.

Morgan, P., and Watkinson, R. J. 1993. Biodegradation of components of petroleum. In C. Ratledge ed., Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.; 1–31.

Munsch-Alatossava, P and Alatossava, T. 2006. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. Microbiol. Res. 161, 334–346. doi: 10.1016/j.micres.2005.12.004.

Références bibliographiques

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.

N

Nagant C. 2013. Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.

Nir, S., and Reches, M. 2016. Bio-inspired antifouling approaches: the quest towards non-toxic and non-biocidal materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 39, 48–55. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.012.

O

O'toole G., Kaplan HB., and Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49-79. different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 15 (4):305-11.

O'Toole GA, and Kolter R .1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304.

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. doi: 10.3389/fmicb.2016.01498.

Otto M . 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 64:175-88.

P

Palmer J., Flint S., and Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 577–588. doi: 10.1007/s10295-007-0234-4.

Parsek MR, and Fuqua C .2004. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface- associated microbial life. *J. Bacteriol.*, 186: 4427-4440.

Pedersen K. 1990. Biofilm development of stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water. Res.* 24: 239-243.

Références bibliographiques

Peng J-S., Tsai W-C., Chou C-C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 65, 105-111.

R

R Richards JJ., and Melander C-C. 2009 .Sep 21; 10(14):2287-94.w Controlling bacterial biofilms.

Reisner A., Höller B. M., Molin S., and Zechner E. L. 2006. Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. *J. Bacteriol.* 188, 3582–3588. 10.1128/JB.188.10.3582-3588.2006.

Roberts AP, Pratten J, Wilson M, and Mullany P .1999. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177, 63-66.

Rosenberg M, Bayer E.A, and Rosenberg E. 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl Environ Microbiol* 44: 929–937.

Rosenberg M and Kjellenberg S. 1986. Hydrophobicity interactions: role in bacterial adhesion. *Adv Microbiol Ecol* 9: 353–393.

Rosenberg M. 1981. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 375-377.

Rosenberg M. 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS microbiology letters* 262, 129-134.

Rossi C ., Lopez C.C ., Serio .A., Goffredo.E ., Terzo.B ., Goga.C and Paparella.A. 2016. Influence of Incubation Conditions on Biofilm Formation by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. *Italian Journal of Food Safety* .5 :5793.

S

Sabaeifard P., Abdi-Ali A., Soudi MR and Dinarvand R .2014. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *J Microbiol Meth* 105:134-40.

Sakala G. P and Reches M. 2018. Peptide-based approaches to fight biofouling. *Adv. Mater. Interfaces* 5:1800073. doi: 10.1002/admi.201800073.

Références bibliographiques

- Sauer K.**, Camper A.K., Eherlich G.D., Costerton J.W and Davies D.G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 184, 1140-1154.
- Schiwon K.**, Arends K., Rogowski K. M., Fürch S., Prescha K., Sakinc T., Van Houdt R., Werner G and Grohmann E. 2013. Comparison of antibiotic resistance, biofilm formation and conjugative transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* isolates from International Space Station and Antarctic Research Station Concordia. Microb. Ecol. 65, 638–651. 10.1007/s00248-013-0193-4.
- Scott K. H** and Edmund A. Z.1997. Journal of Food Protection, Vol. 60, No.9, Pages 1034-1037 .Copyright ©, International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians.
- Shi X** and Zhu X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends Food Sci. Technol. 20, 407–413. doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.054.
- Simões M.**, Simões L.C and Vieira M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Sci. Technol .43:573–583.
- Singh P. K.**, Parsek M. R., Greenberg E. P and Welsh M. J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature. 417:552-555.
- Singh S.**, Singh S. K., Chowdhury I and Singh R. 2017 . Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. Open Microbiol. J. 11, 53–62. doi: 10.2174/1874285801711010053.
- Smoot L. M** and Pierson M. D. 1998. Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel. J. Food Prot. 61:1286–1292.
- Spiers A. J.**, Bohannon J., Gehrig S. M and Rainey P. B. 2003 . Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. Molecular microbiology, 50(1), 15-27.
- Spormann AM.** 2008. Physiology of microbes in biofilms stability of *Burkholderiaceno cepacia* biofilms. Applied and Environmental Microbiology.5208-5218.
- Srey S.**, Jahid I. K., and Ha S. 2013. Bio film formation in food industries: a food safety concern. Food Control 31, 572–585. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001.

Références bibliographiques

Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B and Švabić-Vlahović M . 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*40, 175-179.

Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bona Ventura G.D., Djukić S., Čirković I and Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*115, 891-899.

Stoodley P., Sauer K., Davies D. G and Costerton J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56:187–209.

T

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

Teitzel G M and Parsek M R. 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2313– 2320.

Thompson L S., Webb J S., Rice S A and Kjelleberg S. 2005. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene rhII in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 220:187-195.

Tomlin K L., Malott R J., Ramage G., Storey D G., Sokol P A and Ceri H . 2005. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208- 5218.

V

Valeria A ., Cindy S ., Simen A ., Theodora A ., Bart H ., Andre C and Jan F. M. V . 2020. A Reproducible Method for Growing Biofilms on Polystyrene Surfaces: Biomass and Bacterial Viability Evolution of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus epidermidis* .*Appl. Sci.*10, 4544; . Licensee MDPI, Basel, Switzerland.doi:10.3390/app10134544.

Van Houdt R and Michiels C. W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*, 156(5), 626-633.

Références bibliographiques

Van Schaik E. J., Giltner C. L., Audette G. F., Keizer D. W., Bautista D. L., Slupsky, C. M., Sykes B D and Irvin R T. 2005. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. J. Bacteriol. 187, 1455–1464. doi: 10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005.

Verran, J and Whitehead, K. 2005. Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. Int. J. Artif. Organs 28, 1138–1145. doi: 10.1177/039139880502801111.

Von Neubeck M., Baur C., Krewinkel M., Stoeckel M., Kranz B., Stressler T., Fisher L., Hinrichs J., Sherer S and Wenning M. 2015. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. Int. J. Food Microbiol. 211, 57–65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001.

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

W

Wadstrom T. 1990. Hydrophobic characteristics of staphylococci: role of surface structures and role in adhesion and host colonization. In Microbial Cell Surface Hydrophobicity (Doyle R.J. Rosenberg M., eds), pp. 315–333. American Society of Microbiology, Washington DC.

Wei Q and Ma L. 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14, 20983–21005. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.055.

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC and Mattick JS .2002. Extra-cellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295: 1487.

Whitehead K A and Verran J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. Food Bioproducts Processing 84: 253–259.

Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R and Boor, K. J. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2085–2095. doi: 10.1128/AEM.66.5.2085-2095.2000.

Wingender J., Neu T R and Flemming, H-C. 1999. Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function. Springer.

Wirtanen G and Salo S. 2003. Disinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. Reviews In Environmental Science And Bio-Technology 2, 293–306.

Références bibliographiques

Wood T K., Knabel S J and Kwan B W. 2013. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7116–7121. doi: 10.1128/AEM.02636-13.

X

Xin L., Meng Z X., Zhang L W., Cui Y H., Han X and Yi H X. 2017. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. *Int. Dairy J.* 66, 34–41. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.10.014.

Y

Yang X., Ma Q and Wood T. K. 2008 .The R1 conjugative plasmid increases *Escherichia coli* biofilm formation through an envelope stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2690–2699. 10.1128/AEM.02809-07.

Yannick D.N., Skander T and 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

Zameer F, Gopal S, Krohne G and Kreft J.2009. Development of a biofilm model for *Listeria monocytogenes*. *World J Microbiol Biotechnol* .26: 1143– 1147.

Zameer F, Kreft J and Gopal S. 2010. Interaction of the dual species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Food Saf* . 30: 954–968.

Zulfiqar A M., Aiman F., Shaista U., Mubashir A., Mohammad N K and Tanveer A. 2018. *Iran J Basic Med Sci.* 2018 Jul; 21(7):760-769. Doi : 10.22038/IJBMS.2018.28525.6917.