

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la

Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'environnement (LAMAABE)

MEMOIRE

Présenté par

DRIS Manel

KROUCHI Asma

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biologie, Option : Microbiologie et contrôle de la qualité

Thème

Effet du glucose et du NaCl sur la formation de biofilm par des souches isolées de la viande de poulet

Soutenu le 24/07/2019, devant le jury composé de :

Présidente	BENDIMERED Nahida	MCB	U. Tlemcen
Examinatrice 1	BELLIFA Samia	MCB	U. Tlemcen
Examinatrice 2	MALEK Fadela	MCA	U. Tlemcen
Promotrice	CHERIF ANTAR Asmaa	MCB	U. Tlemcen

Année universitaire 2018-2019

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

A mes chers parents ; symbole de sacrifice, de tendresse d'amour. Je vous remercie pour tout le soutien que vous me portez de puis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A ma sœur : Nabiya, et A l'unique frère que j'ai au monde (Mohammed)

A tous ma famille maternelle et paternelle

A mes très chère amies et surtout Fatima, Rania, Amel, Hafida, Hanane, Soumia, Mounira

A tous mes professeurs

A tout ma promotion de master Microbiologie

Spécialement à mon binôme et ma partenaire dans ce mémoire : Asma qui a partagé avec moi les moments difficile de ce travail.

A tous ceux qui m'ont aidé de prés et de loin

Manel

Dédicace

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et souci de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

Ma sœur Nabila et Mes deux frères Nabil et Mohamed qui ont su me soutenir dans les moments les plus difficiles de ma vie je les remercie d'être toujours là pour moi. Rien ne saurait exprimer tous les sentiments que je les porte. Que dieu les garde pour moi.

A mon binôme MANEL, je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, je vous dédie le fruit de nos efforts.

A tout mes amis surtout : AMEL, CHAHIRA et WISSEM et à qui je souhaite plus de succès.

A toute ma famille.

*Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi
A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et
qui m'ont accompagné*

A

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Asma

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier DIEU le tout puissant, maître des Cieux et de la terre, qui nous a donné la Force, la patience et nous a permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice Melle CHERIF ANTAR Asma , Maitre de conférences classe B à l'Université ABOU BAKR BELAKAID Tlemcen pour son encadrement, ses précieux conseils, et les encouragements qui nous ont permis de réaliser ce travail, et notre co-encadreur Mr BENAMAR Ibrahim, Doctorant à l'Université ABOU BAKR BELAKAID Tlemcen, pour leur aide, disponibilité, précieux conseils et leurs encouragements.

Nos vifs remerciements pour les membres de jury à commencer par Mme BENDIMERED Nahida maitre de conférences classe B à l'Université de Tlemcen qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

Nos très vifs remerciements vont aussi Mme BELLIFA Samia Maitre de conférences classe B à l'Université ABOU BAKR BELAKAID Tlemcen pour avoir Contribué par sa participation à l'examinassions de ce travail.

Nos remerciements pour Mme MALEK Fadela maitre de conférences classe A à l'universuté ABOU BEKR BELKAID TLEMCEEN de Nous avoir fait l'honneur d'accepter à examiner ce mémoire.

Nous ne saurons terminer sans remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à faciliter notre travail.

Table de matière

Listes des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations et signes utilisés	
Introduction.....	1.
Partie 1 : synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : les biofilms.....	3.
1.1 Définition.....	3.
1.2. Etapes de formation de biofilm.....	3.
1.2.1. Film de conditionnement.....	3.
1.2.2. L'adhésion réversible.....	4.
1.2.3. L'adhésion irréversible.....	4.
1.2.4. Formation des micro-colonies.....	4.
1.2.5. Maturation du biofilm.....	5.
1.2.6. Détachement de biofilm.....	5.
1.3 Facteurs influençant la formation de biofilm.....	6.
1.3.1. Caractéristiques des microorganismes.....	7.
1.3.2. Caractéristiques de surface.....	7.
1.3.3. Caractéristiques environnementaux.....	7.
Chapitre 2 : Généralités sur <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>.....	9.
2.1. Généralités sur <i>Bacillus cereus</i>	9.
2.1.1. Pouvoir pathogène.....	9.
2.1.2. La sporulation de <i>Bacillus cereus</i>	10.
2.1.2.1. Définition et structure de la spore de <i>Bacillus cereus</i>	10.
2.1.2.2. Définition de la sporulation.....	11.
2.1.2.3. Cycle de la sporulation.....	11.
2.1.2.4. Germination de la spore.....	12.
2.1.3. Les biofilms de <i>Bacillus cereus</i>	14.
2.2. Généralités sur <i>Staphylococcus aureus</i>	15.
2.2.1. Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i>	15.
2.2.2. Les biofilms de <i>S. aureus</i>	16.
Partie 2 : Matériels et méthodes	
Chapitre 1 : Evaluation de la capacité de la formation de biofilm.....	18.

1.1 Origine des souches.....	18.
1.2. Revivification des souches.....	18.
1.3. Observation des souches.....	18.
1.4. Conservation des souches.....	18.
1.5. Evaluation de la capacité de formation de biofilm.....	18.
1.5.1. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96 puits en PVC.....	18.
1.5.1.1. Principe de la technique	18.
1.5.1.2. Préparation de la suspension sporale.....	19.
1.5.1.3. Préparation de la suspension bactérienne.....	19.
1.5.1.4. Protocole.....	19.
1.5.2. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par la production de slime sur la gélose au rouge congo (RCA).....	20.
1.5.2.1. Principe de la technique.....	20.
1.5.2.2. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne.....	20.
1.5.2.3. Protocole.....	20.
1.5.3. Evaluation de capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable..	20.
1.5.3.1. Préparation des surfaces.....	20.
1.5.3.2. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne.....	21.
1.5.3.3. Protocole.....	21.
Chapitre 2 : facteurs affectant la formation de biofilm de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>.....	22.
2.1. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne.....	22.
2.2. Protocole.....	22.
Partie 3 : Résultats et discussion	
Chapitre 1 : Caractérisation et évaluation de la capacité de formation de biofilm.....	25.
1. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm sur les microplaques de titration à 96 puits en PVC.....	25.
2. Caractérisation phénotypique de la production de biofilm sur la gélose au rouge congo.....	26.
3 Evaluation de la capacité à former biofilm sur les lames en verre et en acier inoxydable.....	27.
Chapitre 2 : facteurs affectant la formation de biofilm de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i>.....	33.
1. Influence du NaCl.....	33.

2. Influence du glucose.....	35.
Conclusion.....	41.
Référence bibliographique.....	44.
Annexe.....	65.

Liste des figures

Figure 1 : Processus régissant la formation de biofilms.....	6.
Figure 2 : Principaux facteurs affectant la formation de biofilm.....	6.
Figure 3 : Spore de <i>Bacillus cereus</i> en microscopie électronique à transmission.....	10.
Figure 4 : Cycle de la sporulation et régulation génétique chez <i>Bacillus subtilis</i>	12.
Figure 5 : Germination des spores des Bacilli (Setlow et al., 2003 et 2015).....	13.
Figure 6 : Observation microscopique de spores de <i>B. cereus</i> en cours de germination....	14.
Figure 07: Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par <i>Staphylococcus spp.</i> À la surface d'un cathéter veineux.....	16.
Figure 8 : Évaluation de la capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable (photo personnelle) : (A) : Rinçage des lames par PBS ; (B) : Coloration par Cristal violet.....	21.
	23.
Figure 9: formation de biofilm de <i>Bacillus cereus</i> sur les microplaques de titration à 96 puits en PVC par la technique de cristal violet : non productrice de biofilm ($DO_{595nm} \leq 0,35$), non formatrice ($0,35 < DO_{595nm} \leq 0,70$), faible ($0,70 < DO_{595nm} \leq 1,4$), modéré ($DO_{595nm} > 1,4$) fortement formatrice de biofilm.....	25.
Figure 10: formation de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> sur les microplaques de titration à 96-puits en PVC par la technique de cristal violet : non productrice de biofilm ($DO_{595nm} \leq 0,21$), non formatrice ($0,21 < DO_{595nm} \leq 0,42$), faible ($0,42 < DO_{595nm} \leq 0,84$), modéré ($DO_{595nm} > 0,84$) Fortement formatrice du biofilm.....	26.
Figure 11: Détection phénotypique de la formation de biofilm des souches testées sur la gélose au Rouge Congo.....	27.
Figure 12 : résultat de formation de biofilm (DO_{545nm}) des souches de <i>Bacillus cereus</i> sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance à 37°C dans 20 ml de la culture bactérienne après 24h ,48 h et 72h d'incubation.....	29.
Figure 13: résultat de formation de biofilm (DO_{545nm}) des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance à 37°C dans 20 ml de la culture bactérienne après 24h ,48 h et 72h d'incubation.....	29.
Figure 14 : effet du NaCl à 1%.....	33.
Figure 15 : effet du NaCl à 1,5%.....	34.

Figure 16 :effet du NaCl à 2%.....	34.
Figure 17 :effet du NaCl à 2,5%.....	35.
Figure 18 :effet du NaCl à 3%.....	35.
Figure 19 :effet du NaCl à 3,5%.....	36.
Figure 20 :Effet du NaCl et de la température sur la formation de biofilm chez <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphilococcus aureus</i>	36.
Figure 21 : effet du NaCl à 0,5%.....	37.
Figure 22 :effet du NaCl à 1%.....	37.
Figure 23 :effet du NaCl à 1,5%.....	38.
Figure 24 :effet du NaCl à 2%.....	38.
Figure 25 :effet du NaCl à 2,5%.....	39.
Figure 26 :effet du NaCl à 3%.....	39.
Figure 27 :Effet du Glucose et de la température sur la formation de biofilm chez <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphilococcus aureus</i>	39.

Liste des tableaux

Tableau : Résultats de capacité à former le biofilm sur les microplaques de titration à 96-puits en PVC des souches bactériennes de *B.cereus* et de *Staphylococcus aureus*26.

Tableau 2 : Résultats de capacité à former le biofilm sur la gélose au Rouge Congo des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et Donner Kebab prêt à manger27.

Tableau 3 : Classement des souches testées pour leur capacité à former le biofilm sur les surfaces d'acier inoxydable30.

Liste des abréviations et signes utilisés

BHIA : Bouillon Cœur-cervelle agar.

BHIA : Bouillon Cœur-cervelle agar.

BN : Bouillon nutritif.

CaCl₂: Chlorure de calcium.

DO: Densité optique.

EDS: Eau distillée stérile.

H : Heure.

G: Gramme.

GN: Gélose nutritif.

Jrs: Jours.

Kcl: Chlorure de potassium.

K₂HPO₄: Hydrogénophosphate de potassium.

Min: Minute.

mL: Millilitre.

NaCl: Chlorure de sodium.

Na₂HPO₄: Hydrogénophosphate de sodium.

NaOH: Hydroxide de sodium.

nm: Nanomètre.

PBS : Phosphate buffer saline.

PVC: Polychlorure de vinyle.

Trs: Tours.

TSB: Tryptycase soja bouillon.

µl: Microlitre.

ملخص:

يمثل تطور الأغشية الحيوية في البكتيريا المسببة للأمراض التي تنتقلها الأغذية مشكلة في صناعة الأغذية الزراعية، وقد يكون هذا هو أصلاً غذية التي يتم تناولها / أو معالجتها، والتي يمكن أن تؤدي إلى مشاكل صحية خطيرة. في العمل الحالي تم عزل 31 سلالة من المنتجات الغذائية القادرة على تشكيل الأغشية الحيوية.

تقييم تكوين الأغشية الحيوية بواسطة سلالات من السلالات التي تزرع في الدجاج المعزولة من الدجاج المعزولة في منطقة تل مسانودونر كيا جاهز للتسويق بنفس طريقة المنطقة. من ناحية أخرى، تم تقييم تأثير الجلوكوز وكلوريد الصوديوم في المستقبل.

نتائج الاختبار - 12 علسلات Bacillus cereus التي تم اختبارها لا تتوافق مع الأغشية الحيوية القديمة على صفيحات المعايير، بينما تشكل سلالات المكونة من العنقودية الذهبية الاثني عشر بشكل ضعيف. تحت البروستاتو البكتيريا العصوية غير نشطة للوح 3 أحجار من المكونة من العنقودية الذهبية. بعد 48 و 72 ساعة من الحضانه، 71% و 58% من السلالات كانت غير بيوفيلم تشكلنا لافو لاذ المقاومة للصدأ، علنا توالي. تم تصنيف 29% و 42% من السلالات علنا ضعيفة التنسيع بعد 48 و 72 ساعة من الأغشية الحيوية، علنا توالي.

يؤثر وجود الجلوكوز وكلوريد الصوديوم في وسط الثقافة على تكوين الغشاء الحيوي. Bacillus cereus للمستويات الأقص عندما يكون تركيز الجلوكوز مساوياً. 2% وعند درجة حرارة 30 درجة مئوية عندما يتم التحكم في الوسط بنسبة 1% من كلوريد الصوديوم عند درجة حرارة 40 درجة مئوية. كان المكونة من العنقودية الذهبية في وجود الجلوكوز 1% عند 30 درجة مئوية و 1.5% كلوريد الصوديوم مع حضانه عند 30 درجة مئوية.

هذا الدراسة خلصت إلى أن تكوين بيوفيلم هو عندما يزيد تركيز الجلوكوز المتوسط، ولكننا نزيد في تركيز كلوريد الصوديوم يؤدي إلى انخفاض في ذلك.

كانت تكوين الأغشية الحيوية في قفاطريقة تكون غور يدأجار، وفحص الألواح الدقيقة والصلب ضعيفاً بالفعل. 11 تمكنت السلالات من المكونة من العنقودية الذهبية بالفعل من الحفاظ على الأغشية الحيوية الضعيفة بعد 24 و 48 و 72 ساعة من الحضانه.

الكلمات المفتاحية: بيوفيلم، باسيلوس سيريس، المكونة من العنقودية الذهبية، الجلوكوز، كلوريد الصوديوم، درجة الحرارة.

Résumé

Le développement de biofilms par des bactéries pathogènes d'origines alimentaires constitue une problématique dans l'industrie agroalimentaire. Ce dernier peut être à l'origine des aliments manipulés et/ou transformés, ce qui pourra conduire à des problèmes de santé graves. Dans le présent travail 31 souches ont été isolées à partir des produits alimentaires capables de former des biofilms ont été testées.

L'évaluation de la formation de biofilms par des souches de *B.cereus* et *S.aureus* isolées de la viande de poulet hachée crue commercialisée dans la région de Tlemcen et du Doner Kebab prêt à manger commercialisé dans la même région a été effectuée par différentes méthodes. D'autre part, l'effet du glucose et du NaCl combiné à la température a été évalué.

Les résultats obtenus ont montré que 12 souches testées de *Bacillus cereus* sont incapables de former des biofilms sur les microplaques de titration et 12 souches de *Staphylococcus aureus* sont faiblement formatrices de biofilm. Par ailleurs, les résultats obtenus sur RCA indiquent que toutes les souches de *Bacillus cereus* sont incapables de produire le slime et 3 souches seulement de *Staphylococcus aureus* l'ont produit. Après 48 et 72h d'incubation, 71% et 58% des souches étaient non formatrices de biofilm sur l'acier inoxydable, respectivement. 29% et 42% des souches étaient classées comme faiblement formatrices de biofilm après 48 et 72 h d'incubation, respectivement.

La présence du glucose et du NaCl dans le milieu de culture a influencé la formation de biofilm. *Bacillus cereus* a atteint son taux maximal lorsque la concentration du glucose est égale à 2% et à une température de 30°C et lorsque le milieu contenait 1% de NaCl à une température 40°C. La production maximale de biofilm par *Staphylococcus aureus* était en présence de 1% de glucose à 30°C, et 1,5% de NaCl avec une incubation à 30°C. Cette étude nous a permis de conclure que la formation de biofilm augmente lorsque la concentration du milieu en glucose augmente, mais l'augmentation de la concentration du NaCl provoque une diminution de celui-ci.

La formation de biofilms par la méthode Gélose Rouge Congo, dosage sur microplaque et sur l'acier inoxydable était respectivement faible. Certaines souches parmi les 20 étudiées de *Bacillus cereus* ont été capables de former des faibles biofilms, certaines d'autres sont incapables. Les 11 souches de *staphylococcus aureus* ont été capables de former des biofilms faibles à modérés après 24, 48 et 72h d'incubation.

Mots clés : Biofilm, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, glucose, NaCl, température.

Abstract:

The development of biofilms in food-borne pathogenic bacteria is a problem in the agri-food industry. This may be the origin of the food handled and / or processed, which can lead to serious health problems. In the present work 31 strains were isolated from food products capable of forming biofilms were tested.

Evaluation of the formation of biofilms by strains of strains and chicken seeds isolated from chicken and chickens sold in the region of Tlemcen and Doner Kebab ready to be marketed in the same region method. On the other hand, the effect of glucose and NaCl have been evaluated in the future.

The 12 test results on the *Bacillus cereus* strains tested are incompatible with the old biofilms on the titration microplates and the 12 strains of *Staphylococcus aureus* are weakly biofilm-forming. Under the Prostate and *Bacillus Cereus* are inactive to slime and 3 Stones of *Staphylococcus aureus*. After 48 and 72h incubation, 71% and 58% of the strains were non-biofilm forming on stainless steel, respectively. 29% and 42% of the strains were classified as weakly formatted after 48 and 72 hours of biofilm, respectively.

The presence of glucose and NaCl in the culture medium influences the formation of biofilm. *Bacillus cereus* reaches its maximum level when the glucose concentration is equal to 2% and at a temperature of 30 ° C and when the medium is controlled by 1% NaCl at a temperature of 40 ° C. The maximum production of biofilm by *Staphylococcus aureus* was in the presence of 1% glucose at 30 ° C and 1.5% NaCl with an incubation at 30 ° C. This study it was concluded that biofilm formation is when the concentration of glucose medium increases, but that the increase in the concentration of NaCl causes a decrease in it.

The formation of biofilms according to the Congo Red Agar method, the microplate assay and the steel was already weak. The 11 strains of *staphylococcus aureus* have already been able to maintain a weak biofilm after 24, 48 and 72h incubation. .

Key words: Biofilm, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, glucose, NaCl, temperature.

Introduction
Générale

Introduction générale

La production et la consommation des viandes de poulet augmentent annuellement dans le monde entier soit dans les pays développés ou en voie de développement. Elles sont universellement populaires, car elles ne sont pas soumises à des contraintes culturelles ou religieuses et la viande elle-même est perçue comme saine et nutritive, étant relativement faible en gras et avec une plus faible teneur en acides gras insaturés que les autres viandes. Plus important encore, elles sont disponibles pour beaucoup de gens à des prix abordables, bien que les coûts de production varient considérablement à travers le monde (FAO/OMC, 2015).

Les matières premières utilisées dans la fabrication et/ou la transformation de produits alimentaires peuvent contenir des microorganismes d'altération et/ou pathogènes. Ces microorganismes ont la capacité d'adhérer aux surfaces en contact et, par conséquent, former des biofilms. La présence de biofilm en IAA est une problématique majeure engendrant des pertes économiques et un risque potentiel pour la santé du consommateur (Diabi, 2018). La fixation des bactéries sur les surfaces est influencée par les propriétés physico-chimiques de l'environnement (température, pH), de surface (hydrophobicité), du milieu (substrat) et de microorganisme (hydrophobicité, la flagellation et la motilité) (MoltzetMartin, 2005; FolsometFank, 2006 ; Shiet Zhu, 2009 ; Youwen *et al.*, 2010 ; Agarwal *et al.*, 2011 ; Victoria *et Tajudeen.*, 2011)

Le but de cette étude vise à évaluer la capacité de formation de biofilm chez deux espèces dont 20 souches de *B. cereus* isolées de la viande de poulet cru commercialisée dans la région de Tlemcen, et 11 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la même région. D'autre part, évaluer l'effet de la température d'incubation et l'addition du glucose et du NaCl à différentes concentrations sur la formation de biofilms.

Ce mémoire est scindé en 3 parties :

1. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique ;
2. La seconde partie présente une description de la méthodologie envisagée ;
3. La dernière partie comporte la description et la discussion des résultats obtenus ;
4. Ce travail sera clôturé par une conclusion et des perspectives qui peuvent ouvrir de nouveaux axes de recherches.

Synthèse
bibliographique

Chapitre 1 : Les biofilms microbiens

1.1. Définition :

Il n'existe pas de consensus absolu sur la définition du biofilm et il est possible de trouver quelques divergences suivant les auteurs. En général, un biofilm est défini comme une association structurée de cellules fixées à une surface, une interface et/ou entre elles (**da Silva et al., 2013**) et enrobées dans une matrice extracellulaire hydratée (**Sutherland, 2001 ; Costerton et al., 2003 ; Whitehead et Verran, 2015**). Cette dernière est majoritairement constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et de matières minérales (**Lahaye, 2006**). Plus de 99% de bactéries vivent dans un biofilm depuis que ce mode de vie confère aux microorganismes des avantages considérables. D'une part, la protection contre les effets néfastes de l'environnement comme les agents antimicrobiens chimiques, le stress nutritionnel et oxydant, la chaleur, l'acidité, l'exposition au rayonnement ultraviolet, les variations du pH, le choc osmotique et la dessiccation (**Bridier et al., 2011, 2015 ; Sanchez-Vizuet et al., 2015**). D'autre part, la disponibilité des éléments nutritifs et la coopération métabolique (**Davey et O'Toole, 2000 ; Jefferson, 2004**). En plus des avantages cités ci-dessus, la vie des microorganismes en biofilms leur confère l'acquisition de nouveaux gènes (**Hamilton et al., 2009 ; Madsen et al., 2012 ; Martínez et Vadyvaloo, 2014**).

1.2. Étapes de formation de biofilm :

La formation de biofilm est un processus très complexe qui est affecté par plusieurs facteurs. Elle se réalise en plusieurs étapes (**Breyers et Ratner, 2004 ; Yannick et al., 2014 ; Speranza et al., 2017**) qui seront décrites ci-dessous et schématisées dans la figure 1 :

1.2.1. Film de conditionnement : Le film de conditionnement est la première étape dans la formation de biofilm. Cependant, avant qu'une cellule puisse se lier à une surface, cette dernière est conditionnée par l'adsorption de molécules présentes dans le milieu environnant (**Whitehead et Verran, 2015**). Ces molécules peuvent être de nature chimiques organiques ou inorganiques ou même des composés biologiques (**Palmer et al., 2007**). L'adsorption de ces molécules provoque des modifications des propriétés physico-chimiques de surface tout en influant sur l'adhésion bactérienne qui sera favorisée ou inhibée (**Rubio, 2002 ; Bakker et al., 2004 ; Lorites et al., 2011**). La nature du conditionnement est affectée par la nature de la surface et la source du film de conditionnement (**Pratt-Terpstra et Busscher, 1998 ; Boyd et al., 2000**). Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, sont remises en cause par le

problème des biofilms (Sreyet *al.*, 2013). Leur formation sur les surfaces en contact avec les aliments est quasi inévitable et elle est favorisée par les conditions qui prévalent dans les établissements de transformation des aliments (Simoes *et al.*, 2006 ; Simoes et Vieira, 2009).

1.2.2. L'adhésion réversible : L'initiation de la formation de biofilm se produit lors de la fixation réversible des bactériens à une surface amorçant ainsi la surface à une liaison irréversible ultérieure (Bjarnsholt *et al.*, 2013). Cette étape est fortement influencée par le mouvement brownien et les forces de gravité, et par les forces hydrodynamiques environnantes telles que les forces de van der Waal, les interactions électrostatiques et l'hydrophobicité de surface (Donlan, 2002 ; Beloin *et al.*, 2008 ; Gautam *et al.*, 2013 ; Reenet *al.*, 2019). La fixation des cellules nécessite également l'action des flagelles et pili qui agissent avec les adhésines pour adhérer à la structure physique. L'importance de la motilité flagellaire pour l'attachement initial a été documentée pour plusieurs agents pathogènes, y compris *Bacillus cereus* dont les flagelles sont nécessaires pour l'initiation du biofilm dans les conditions statiques à l'interface air-liquide, mais pas à l'interface surface-liquide (Houry *et al.*, 2010). À ce stade de développement du biofilm, l'attachement est dynamique et réversible. Les bactéries peuvent toujours se détacher si elles sont perturbées par des forces hydrodynamiques dans l'écoulement ou en réponse à des changements dans la disponibilité des éléments nutritifs (Guiton *et al.*, 2009).

1.2.3. L'adhésion irréversible : Après un laps de temps, la fixation bactérienne devient irréversible en raison de la production d'un réseau enchevêtré et canalisé d'exopolysaccharides qui maintient le biofilm ensemble par les bactéries et grâce à des structures d'adhérence. Ces molécules sont variables selon les espèces bactériennes. Pour les bactéries à Gram négatif, il s'agit de pili, de fimbriae et des curli qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (Van Houdt et Michiels, 2005 ; Beloin *et al.*, 2008). Pour les bactéries à Gram positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces molécules d'adhésions permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule (Lemon, 2008), ainsi que des ponts entre les cellules et le film de conditionnement (Kokare *et al.*, 2009).

1.2.4. Formation de micro colonies : Durant cette étape, lorsque les bactéries sont irréversiblement attachées à la surface, il sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement. Ceci mène à la formation des micro colonies qui s'élargissent et s'unissent

pour former une couche cellulaires couvrant la surface (Otto, 2013 ; Moghaet 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).

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

La production et la sécrétion d'enzymes provoque la dégradation des résidus présentent dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments qui favorise le grandissement et la croissance du biofilm jusqu'à devenir macroscopique (Branger et al.,2007 ;Jacobsen et al., 2008 ; Alnasouri, 2010).

1.2.6. Détachement de biofilm : Une fois les biofilms saturés, les bactéries peuvent se détacher (Rupp et al., 2005). Ce détachement permet aux bactéries de coloniser de nouvelles surfaces et former à nouveau des biofilms ou retourner à l'écoulement en vrac (Ma et al., 2009). Le détachement des cellules est déclenché par des facteurs intrinsèques, tels que le taux de mortalité et l'autolyse dans le biofilm et des facteurs extrinsèques incluant l'épaisseur du biofilm, la vitesse d'écoulement, les forces de cisaillement du liquide et la disponibilité nutritive (Lappin-Scott et al., 1992 ; Thormann et al.,2006 ; Florjanic et Kristl, 2011). Les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (Spormann, 2008). La dispersion du biofilm est considérée comme cruciale pour la propagation et l'auto-renouvellement de la communauté bactérienne (Renner et Weibel,2011).

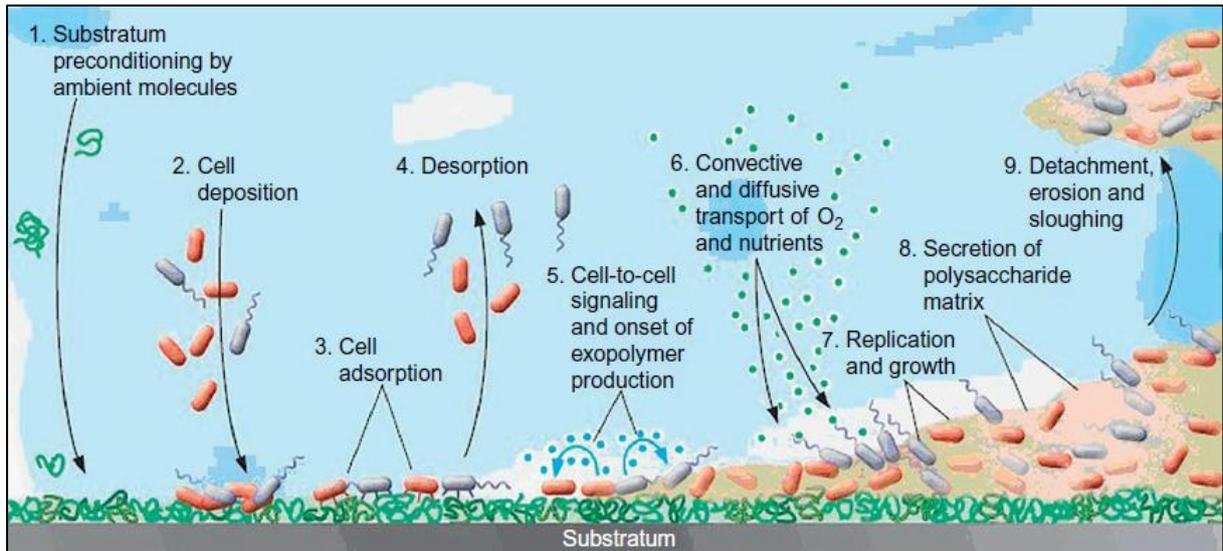


Figure 1 : Processus régissant la formation de biofilm (Breyers et Ratner, 2004).

1.3. Facteurs influençant la formation de biofilm:

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe. Il est influencé par de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface, le milieu et les microorganismes (Figure 2) (Branger et al., 2007; wijman et al., 2007 ; hayrapetyan et al., 2015).

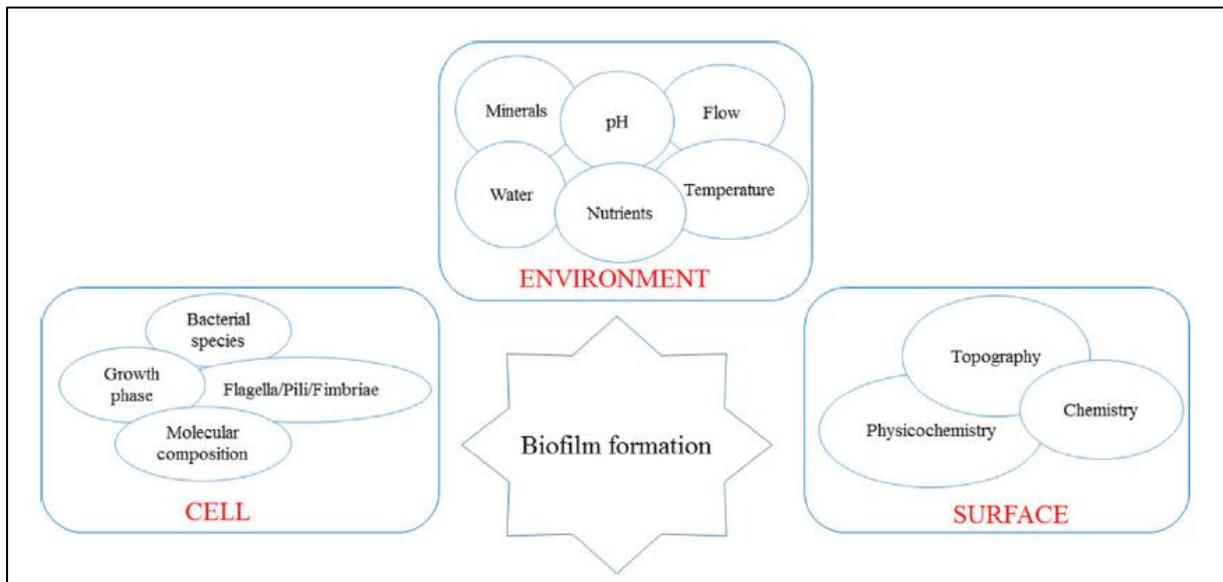


Figure 2 : Principaux facteurs affectant la formation de biofilm (Speranza et Corbo, 2017)

1.3.1. Caractéristiques des microorganismes : La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface ; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. (Liesse Iyamba, 2012; Bellifa, 2014). Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule,...) (Perrin, 2009 ; Alyajouri, 2012). Toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces et de grandes différences existent au sein d'une même espèce bactérienne (Kukavica-Ibrulj, 2007).

1.3.2. Caractéristiques de la surface : La rugosité, les propriétés physicochimiques et la formation préalable d'un film protéique sur une surface influencent l'attachement des bactéries et par conséquent la formation d'un biofilm. La colonisation microbienne semble augmenter avec la rugosité de la surface (Martinez, 2007). En effet les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée à la présence d'aspérités (Donlan, 2002).

1.3.3. Caractéristiques environnementales : Cela engloba la disponibilité du milieu en nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.) (Marchal, 2010). Les conditions environnementales telles que la disponibilité des nutriments peuvent initier la formation de biofilm. Dans certaines recherches, le manque d'éléments nutritifs a déclenché l'adhésion cellulaire, alors que dans d'autres études, le processus de colonisation bactérienne était augmenté par une quantité élevée d'éléments nutritifs. Fletcher a montré que le pH et la température sont tous deux importants pour l'adhésion bactérienne à la surface de l'acier inoxydable. Fletcher et ses collaborateurs ont rapporté qu'une augmentation de la concentration de cations tels que le sodium, le calcium, le lanthane ou le fer affecta la fixation de *P. fluorescens* aux surfaces en verre (Fletcher, 1988).

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

1.3.3.2. Effet du pH : Le pH du milieu environnant est d'une grande importance car il modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides, et par conséquent, une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Hamadi *et al.*, 2004 ; Boutaleb, 2007**).

Chapitre 2 : Généralités sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*:

2.1. Généralité sur *Bacillus cereus* :

Le genre *Bacillus* est hétérogène regroupant des bacilles aéro-anaérobie facultatif à Gram positif, formant des spores, mobiles. L'ensemble des espèces appartenant à ce genre sont aptes à se multiplier à l'air aux températures moyennes, mais plus précisément à des températures optimales de croissance située entre 20 et 40°C. Elles peuvent être pathogènes ou d'altération (**Bougeois et Leveau, 2006**). Les bacilles appartiennent à la famille des Bacillaceae, à l'ordre des Bacillales, à la classe Bacilles (Bacilli) (**Maughan et Van der Auwera, 2011**). *Bacillus cereus* est l'espèce la plus répandue de ce genre. Elle est ubiquiste, saprophyte dans le sol mais également trouvée dans les aliments en particulier les produits laitiers. C'est une bactérie anaérobie facultative, génératrice de spores ovales en position sub-terminale et sa cellule végétative mesure de 3 à 5 µm de long pour un diamètre de 1 à 2 µm, mésophile dont la plupart de ses souches sont mobiles par l'intermédiaire de flagelles péritriches (**Euzéby, 2003 ; Vilas Boas et al., 2007**).

2.1.1. Pouvoir pathogène :

Ce germe peut être rencontré dans une grande variété d'aliments tels que les pâtes, le riz, les produits laitiers, les denrées alimentaires séchées, la viande, les légumes, les fruits, les céréales (**Arnesen et al., 2008**). *B. cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste responsable d'infection systémique et locales et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires (**Bottone, 2010 ; Logan, 2012**). La présence de spores de *B. cereus* pose de sérieux problèmes dans les industries agroalimentaires. L'infection se produit en mangeant des aliments contaminés par ses spores qui contaminent le plus souvent la viande de poulets (**Hickset al., 2012**). Provoque ensuite deux types d'intoxications, émétique : liée généralement à des facteurs de virulence portés par un plasmide dont les symptômes surviennent à courte durée d'incubation, de 1 à 5 heures, et diarrhéiques sont provoquées par des facteurs de virulence chromosomique. Les symptômes de l'intoxication diarrhéique se déclenchent 8 à 16 heures après l'ingestion d'un aliment contaminé (**Evreux et al., 2007**). Après ingestion, les spores germent et causent des lésions n'importe où dans le corps (**Hickset al., 2012**).

2.1.2. La sporulation de *Bacillus cereus* :

Certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus* ont la capacité de sporuler lorsqu'elles se trouvent dans des environnements de stress comme le manque de nutriments dans le milieu (**Leggett *et al.*, 2012**). Les spores bactériennes sont des cellules différenciées, métaboliquement inactives et très résistantes aux traitements par la chaleur, la pression, les UV et les produits chimiques (**Clavel *et al.*, 2004; Setlow, 2006; Tam *et al.*, 2006 ; Nguyen Thi Minhet *et al.*, 2011**).

2.1.2.1. Définition et structure de la spore de *Bacillus cereus* : Les spores comme schématisées dans la figure 3 contiennent un noyau cellulaire relativement déshydraté lié à la membrane et entouré d'un cortex de peptidoglycane, ainsi qu'une couche protectrice externe contenant plusieurs couches de protéines. Certaines espèces, y compris *Bacillus cereus*, possède la couche la plus externe appelée «exosporium», une coquille peu serrée entourant le manteau. Le volume entre l'enveloppe de spores et l'exosporium, l'«espace intermédiaire», contient des protéines, mais n'a pas été bien étudié. L'exosporium est constitué d'une couche «basale» supportant une «sieste poilue» filamenteuse et est composé de protéines, lipides et glucides. Les protéines de l'exosporium sont susceptibles d'avoir des interactions intimes avec l'environnement (**Kailas *et al.*, 2011**).

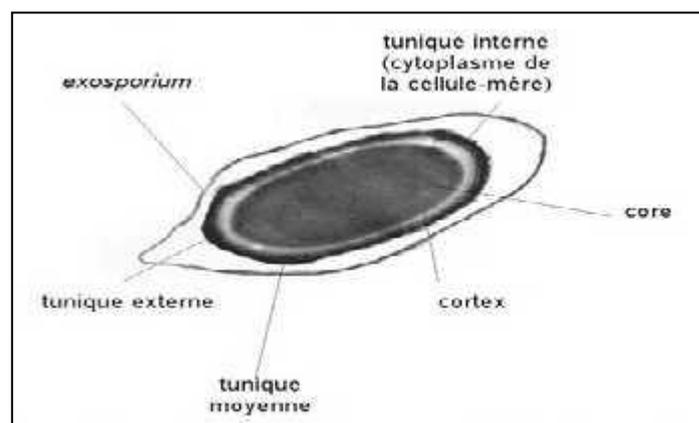


Figure 3 : Spore de *Bacillus cereus* en microscopie électronique à transmission (**Ohye Murrell, 1973**).

2.1.2.2. Définition de la sporulation : La sporulation est un mécanisme de différenciation cellulaire qui aboutit à la formation de spores, permettant aux bactéries de survivre à des conditions environnementales extrêmes (**de Hoonet al., 2010; Galperinet al., 2012; Higgins et Dworkin 2012; Paredes-Sabjaet al., 2014; Al-Hinaiet al., 2015; Talukdaret al., 2015**). Chez les Bacilli, la sporulation se met généralement en place en fin de phase exponentielle, lorsque les nutriments se raréfient et deviennent limitant pour la croissance bactérienne (**Al-Hinaiet al., 2015**). Cependant, convertir une cellule en spore est un mécanisme élaboré et coûteux en énergie qui contrairement aux autres systèmes de réponse cellulaire devient irréversible deux heures après son initiation. La sporulation est ainsi une solution de dernier recours dont l'initiation complexe est la conséquence de l'échec des mécanismes de réponses alternatifs existants (**Mirouze et Dubnau, 2013**).

2.1.2.3. Cycle de la sporulation : Les étapes morphologiques de la formation des spores sont similaires chez toutes les bactéries sporulantes (**Talukdaret al., 2015**). Elle débute pendant la croissance bactérienne lorsque l'ADN se réplique, puis la cellule se divise symétriquement et donne deux cellules filles. La sporulation initiée est visible par la mise en place d'un septum asymétrique séparant les deux copies du chromosome en deux compartiments : une cellule mère et une pré-spore. La formation de membranes internes et externes par migration permet ensuite l'invagination de la pré-spore dans la cellule mère. L'espace entre ces deux membranes est alors comblé par le développement d'une couche de peptidoglycane modifiée appelé cortex. Par la suite, une structure complexe de nature protéique se construit autour du cortex formant ainsi les tuniques. Chez certaines bactéries, on peut distinguer l'apparition de deux types de couches externes supplémentaires qui couvrent les tuniques: l'exosporium et le crust. (**De Hoonet al., 2010**). Ces modifications structurales sont suivies par un processus de maturation au cours duquel se développent les propriétés de résistance, et de dormance. La dernière étape correspond à la lyse de la cellule mère et la libération de la spore (**Piggott et Hilbert, 2004; de Hoonet al., 2010; Higgins et Dworkin, 2012; Bateet al., 2014; Sella et al., 2014; Tan et Ramamurthi, 2014; Al-Hinaiet al., 2015; Fimlaid et Shen, 2015**). La figure ci-dessous représente le cycle de sporulation de *Bacillus subtilis*.

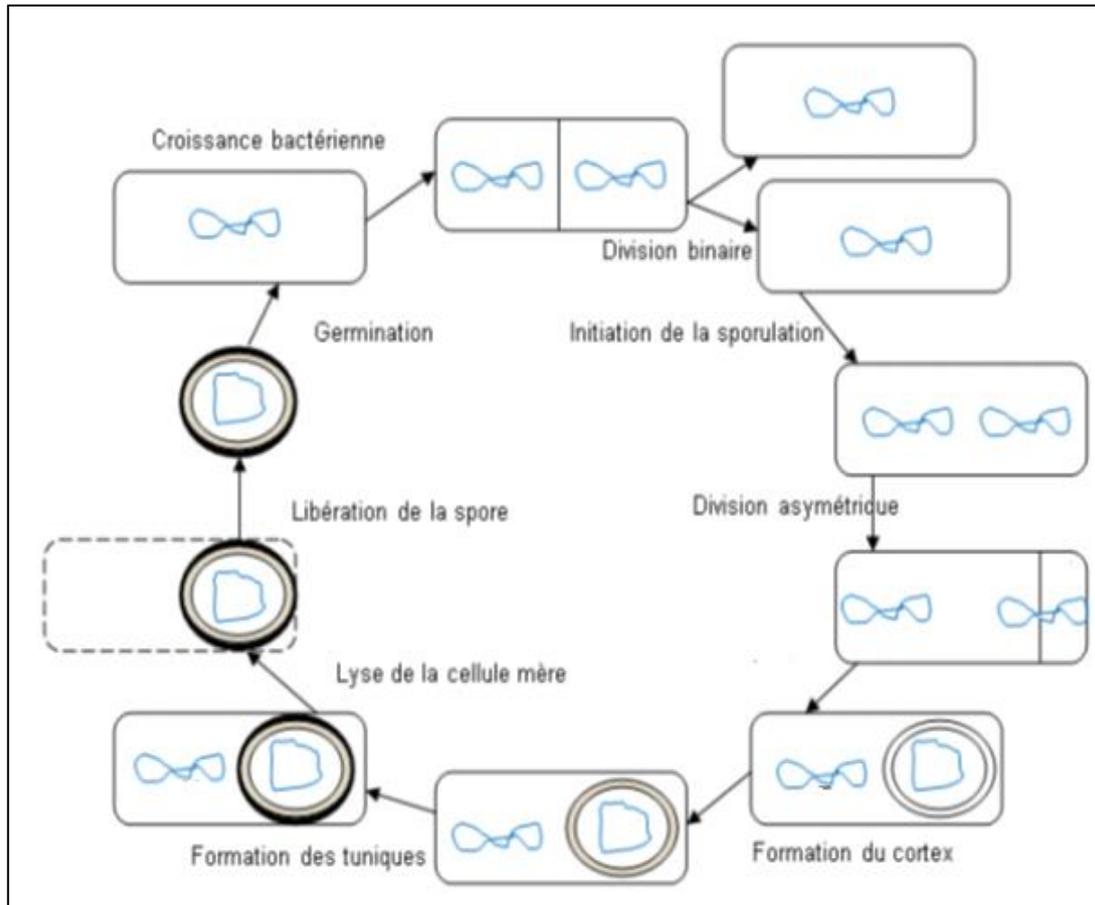


Figure 4 : Cycle de la sporulation et régulation génétique chez *Bacillus subtilis* (De Hoonet al., 2010)

Dans ce cycle de sporulation, la croissance des bactéries commence par une division binaire de la cellule mère en deux cellules filles, une des cellules va avoir l'initiation de la sporulation pour la formation d'un septum asymétrique qui sépare les deux copies de chromosomes pour donner deux compartiments : une cellule mère et une préspore δF qui va devenir active. La cellule mère δE devient active après invagination et la préspore va avoir une formation d'un cortex qui du ensuite à l'activation de δG . La cellule δK devient active et les tuniques entourent de l'endospore. Après la lyse de la cellule mère, la spore va redonner une cellule après avoir germé.

2.1.2.4. Germination de la spore : Les spores peuvent survivre et résister dans un état de dormance aux stress environnementaux pendant des années (Vreeland et al., 2000; Gould, 2006; Setlow, 2014). Lorsque les conditions sont favorables, sous l'influence d'un stimulus chimique, physique, et/ou mécanique, la germination est activée et les spores perdent leurs propriétés de dormance et de résistance (Moiret et al., 2002; Moir, 2006; Setlow, 2014). Le

processus de germination se déroule en deux étapes (Moiret *al.*, 2002; Moir 2006; Abeet *al.*, 2011; Paredes-SabjaetSarker,2011; Setlow, 2013; Setlow, 2014) :ces grandes étapes avec un germinant de type nutriment sont représentées dans la figure ci-dessous. Suite à l'activation, l'étape 1 est marquée par la libération de cations monovalents et d'acide dipicolinique (DPA). Puis l'étape 2 correspond à une forte hydratation du cœur et à la perte des propriétés sporales. On observe ensuite un retour à la vie végétative avec la réactivation du métabolisme :

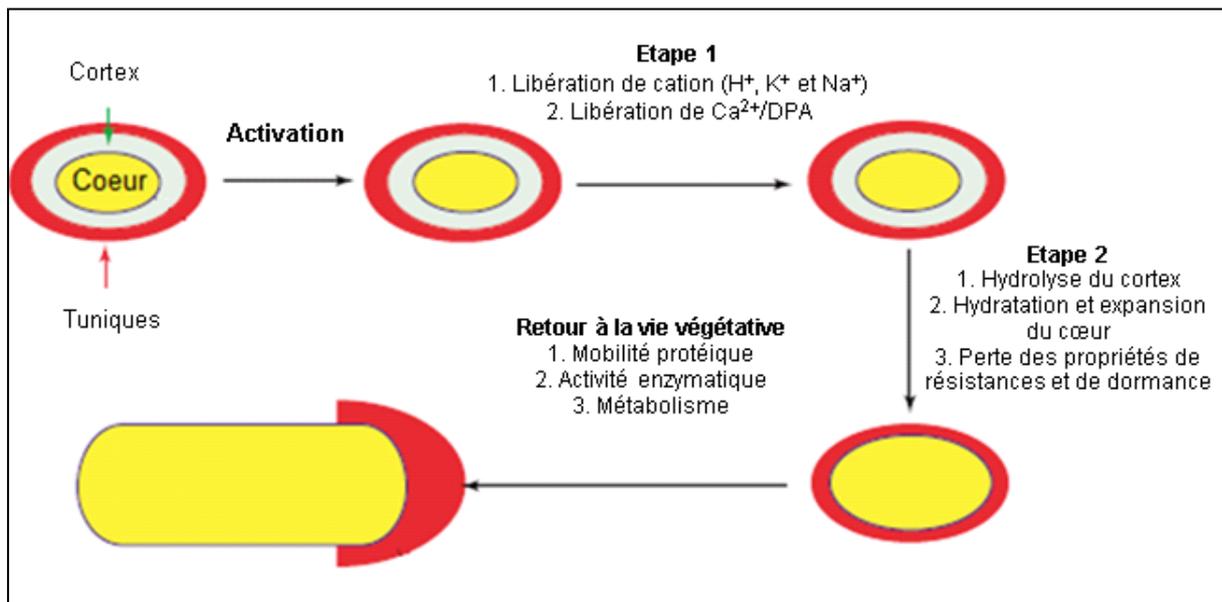


Figure 5 : Germination des spores des *Bacillus* observée par microscope à contraste de phase.

(Setlow *et al.*, 2003 et 2015).

2.1.2.4.1. Etape 1 : Après activation de la germination, les cations H^+ , K^+ et Na^+ sont libérés via les canaux formés par la protéine SpoVA. Cette libération entraîne une augmentation du pH du cœur de la spore de 6,5 à 7,7. La spore libère également un composé chimique, l'acide dipicolinique ou acide pyridine-2,6 di carboxylique (DPA) associé majoritairement aux cations Ca^{2+} . (Bressuire-Isoard, 2015).

2.1.2.4.2. Etape 2 : La libération des cations et du DPA entraîne un léger afflux d'eau qui a pour conséquence la perte de certaines propriétés dont la résistance à la chaleur. L'augmentation du pH permet l'activation des enzymes lytiques du cortex comme CwlJ et SleB. L'hydrolyse du cortex a pour conséquence une forte hydratation du cœur et son expansion. Ce nouvel afflux d'eau permet la restauration de la mobilité protéique, de l'activité

enzymatique et l'activation du métabolisme mais entraîne la perte des propriétés de dormance et de résistances des spores (Bressuire-Isoard, 2015).

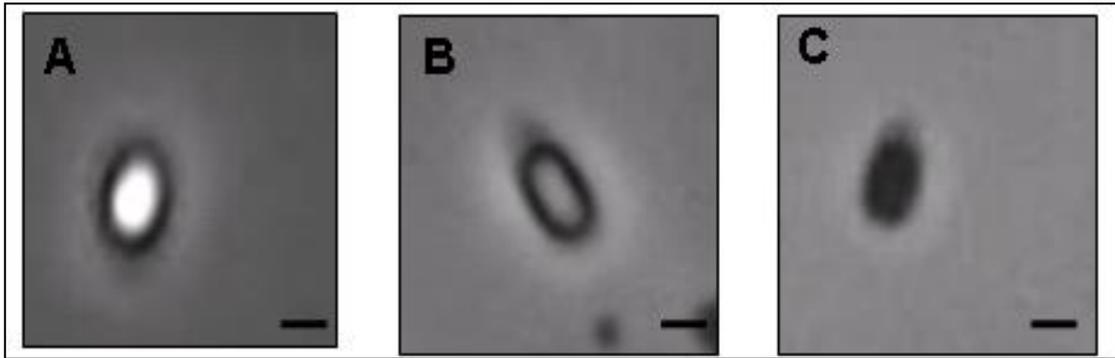


Figure 6 : Observation microscopique de spores de *B. cereus* en cours de germination. Une spore réfringente (A), une spore germée « grise » (B) et spore germée noire (C) ont été observées au laboratoire de l'équipe de microbiologie de l'INRA d'Avignon au microscope optique en contraste de phase (X 100). Ces observations ont été réalisées à partir de spores produites en milieu mFNA à 37°C et mises en contact avec une solution d'inosine (0,5 mM) pendant 15 min (B) et 1 h (C). Echelle: 0,5 µm (Bressuire-isoard, 2015)

2.1.3. Les biofilm de *Bacillus cereus* :

Le pouvoir d'adhésion de *Bacillus cereus* aux surfaces et par conséquent la formation de biofilm sont attribués aussi bien aux propriétés physico-chimiques de surface des spores (Peng *et al.*, 2001; Lequette *et al.*, 2011), qu'à son potentiel génétique (Oosthuizen *et al.*, 2002; Sauer, 2003). Le rôle de la mobilité et la présence de flagelle dans la formation de ces biofilm a également été rapportée (Houry *et al.*, 2010). Cette propriété est mise à profit pour permettre à la bactérie d'atteindre des sites favorables à son développement. Le phénomène d'adhésion bactérienne a été étudié dans de nombreux domaines de sécurité sanitaire où la présence de micro-organismes adhérents a un impact négatif (Nicolas et Lavoie, 2011). Très largement répandu dans la nature, *B. cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste responsable d'infection systémique et locales et cette espèce est également responsable de toxi-infection alimentaire (Bottone, 2010 ; Logan, 2012). *B. cereus* peut être rencontré dans une grande variété d'aliments tels que les pâtes, le riz, les produits laitiers, les denrées alimentaires séchées, la viande, les légumes, les fruits, les céréales, les épices ou les fruits de mer (Guinebretière et Nguyen-The 2003 ; King *et al.*, 2006 ; Coorevits *et al.*, 2008 ; Rahmati et Labbé, 2008 ; Meldrum *et al.*, 2009 ; Ranieri et Boor, 2009).

2.2. Généralités sur *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est un cocci à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif, catalase positif (1 µm de diamètre) se présentant au microscope sous forme de grappes. Elles ne sont pas mobiles, dépourvues de spores, possède une capsule polysaccharide. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom (**Arum et Thomas, 2018**).

La paroi cellulaire de *S. aureus* contient trois composants principaux: le peptidoglycane comprenant la répétition d'unités de N-acétyl glucosamine β-1,4 liées à l'acide N-acétylmuramique ; un acide ribitolteichoïque lié via N-acétylmannosaminyl-β-1,4-N-acétyl glucosamine en muramyl-6-phosphate et la protéine A, qui est liée de manière covalente au peptidoglycane et caractérisée par sa capacité à se lier au composant Fc de l'immunoglobuline dans le plasma provoquant l'autoagglutination. La plupart des autres espèces de staphylocoques sont dépourvues de protéines A dans leur paroi cellulaire (**Devriese et al., 2005; Taponen et Pyörälä, 2009; Bonaret et al., 2018**). *S. aureus* est une bactérie commensale de l'homme à savoir la narine antérieure, la gorge, les plis cutanés et le tractus gastro-intestinal (**Crossley et Solliday, 1980; Peters et al., 2013**).

2.3. Pouvoir pathogène de *S. aureus* :

Les caractéristiques de *S. aureus* sont principalement dues à plusieurs facteurs de virulence comme la coagulase, la protéine A, la fibréonectine, l'hémolysine, les nucléases, facteur d'agglutination, toxines exfoliatives et entérotoxines (**Gaurav, 2017**). La sécrétion de la coagulase est une caractéristique significative pouvant être utilisée principalement pour l'identification de *S. aureus* (**Momtaz et al., 2011**). Ainsi, la capacité de coaguler le plasma par la production de coagulase est la première étape de l'identification des staphylocoques (**Bonaret et al., 2018**).

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires (**Vincenot et al., 2008; Kurlenda et Grinholc, 2012; Otto, 2012**). Les infections suppuratives superficielles cutané-muqueuses tels les furoncles, les folliculites, les impétigos, les sinusites et les otites sont les plus couramment rencontrées. Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection. En plus des infections aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques. La plupart d'entre elles sont dues à la capacité de ce pathogène à

adhérer sur les implants médicaux temporaires (ex: cathéters) ou permanents (ex: prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former des biofilms(vonEiffet *al.*,2005; Harris et Richards, 2006; Bernard, 2006).

2.4. Les biofilmsde*Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie pathogène parmi toutes les bactéries alarmantes, associés à la détérioration des aliments. De plus, le biofilm bactérien a causé environ les deux tiers de la maladie humaine associée à une infection bactérienne (Spoering et al., 2001). Biofilms de *S. aureus* non seulement améliorent la virulence bactérienne mais empêchent également l'élimination par des agents antibactériens ou par le système immunitaire de l'hôte système (O'Neill et al., 2008). Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008). La pathologie des rhinosinusites chronique est associée au biofilm produit par *S. aureus* (Romain et al., 2012).

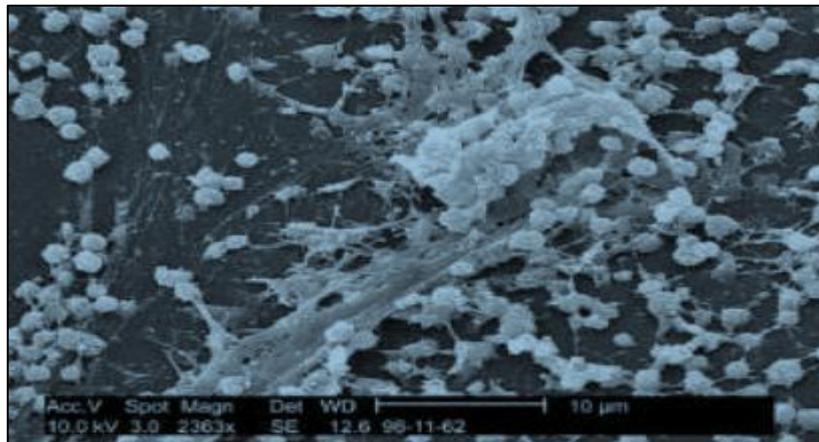


Figure 7: Image obtenue par microscopie, image confocale d'un biofilm formé par *Staphylococcus spp.* À la surface d'un cathéter veineux (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

*Matériel et
méthodes*

Chapitre 1 : Évaluation de la capacité de la formation de biofilm :

1.1. Origine des souches :

Un total de 31 souches a été étudié dans ce travail. Les souches appartenant au genre *Bacillus cereus*, avec un total de 20, ont été isolées de la viande de poulet cru commercialisée dans la région de Tlemcen. Alors que les souches restantes sont des *Staphylococcus aureus*, isolées du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la même région.

1.2. Revivification des souches :

Une fraction issue du stock des cultures sur glycérol de chaque souche à tester est transférée dans 7ml du bouillon BHIB (Liofilchem, ITALY) et incubée à 37°C pendant 24h. Chaque suspension est homogénéisée par agitation au vortex. Un ensemencement par épuisement est réalisé sur la gélose BHIA (Liofilchem, ITALY) pour les souches de *Bacillus cereus* et sur une gélose de Baird Parker pour les souches de *Staphylococcus aureus*. Les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 h.

1.3. Observation microscopique :

Afin de vérifier la pureté des souches une observation microscopique est réalisée. À partir des souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* des frottis bactériens sont préparés et colorés au bleu de méthylène.

1.4. Conservation des souches :

Pour une conservation de courte durée, chaque colonie des deux espèces est ensemencée sur une gélose inclinée et ensuite incubée à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les tubes sont placés au réfrigérateur à 4°C, pour une période de 20 jours.

1.5. Évaluation de la capacité de formation de biofilm :

1.5.1. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96 puits en Polychlorure de Vinyle (PVC) :

1.5.1.1. Principe de la technique : Une plaque de micro-titration appelée également microplaque ou plaque de micro-puits comprend typiquement 6 à 384 puits disposés en

matrice rectangulaire. Les plaques utilisées dans notre étude sont à 96-puits en PVC (figure 13). Ce test basé sur ce type de plaques permet de déterminer la capacité des bactéries à adhérer aux surfaces sous des conditions de laboratoire. Après incubation, les bactéries planctoniques sont rincées et les bactéries adhérentes (biofilm) sont colorées avec le Cristal Violet, permettant ainsi la visualisation du biofilm (Chaiebet *et al.*, 2005).

1.5.1.2. Préparation de la suspension sporale : La suspension sporale des *Bacillus cereus* est réalisée selon le protocole décrit par Mazas (1995). Une pré-culture est préparée par ensemencement de 5 ml de BHIB à partir des géloses inclinées qui sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 h. 0,3 µl de chaque tube de pré-culture est ensemencées sur une GN(CONDA,ISPANE) supplémenté avec 50mg /l de MnSo4 et 60 mg/l de CaCl2 et incubée pendant 10 jours à 30°C. Le tapis formé sur les boites est raclé dans 3ml d'eau distillée stérile, puis transféré dans des tubes coniques. Les spores récupérées sont ensuite centrifugées à 6500 trs/min pendant 15 min. Le surnageant formé est jeté. Les spores sont lavées avec de l'eau distillée stérile et centrifugés une seconde fois à 6500 trs/min pendant 15 min. Le surnageant est ensuite jeté et la suspension est conservée dans 3ml d'eau distillée avec l'éthanol (50/50 V/V) au réfrigérateur.

1.5.1.3. Préparation de la suspension bactérienne : Afin de préparer une suspension bactérienne de *staphylococcus aureus* une fraction de colonies bactériennes est ensemencée à partir de gélose inclinée dans 5 ml de BHIB puis incubée à 37° pendant 24 h.

1.5.1.4. Protocole : Un volume de 5ml de BHIB à 0.25 % de glucose est ensemencé par les souches à tester. Les souches de *Staphylococcus aureus* sont incubées à 37°C pendant une nuit puis ajustée à une concentration finale de $\approx 10^8$ ufc/ml, alors que celles de *Bacillus cereus* sont passées directement la mesure de la densité optique.

Chaque puits est remplis par 200µl de BHIB à 0,5% glucose et 10 µl de culture bactérienne. Les puits contrôle sont remplis avec BHIB à 0,5 % glucose. Chaque souche est inoculée dans 2 puits et la technique est réalisée en duplicate. Les microplaques sont incubées à 37 °C pendant 24 h. Après l'élimination des cultures, les puits sont lavés 2 fois par PBS pour éliminer les cellules non adhérentes et laissées sécher à l'aire libre pendant 15min. Après le séchage, les puits sont remplis par 250 µl de Cristal Violet à 1 % et laisser agir 15 min à température ambiante. Ils sont rincés plusieurs fois avec PBS et séchés à l'air libre pendant 15 min. Un volume de 200 µl d'Acide acétique à 33% est ajouté et laissée agir 30 min. La

densité optique est mesurée à 595 nm (BioTek). Les souches sont classées comme suit (Stepanovic *et al.*, 2000):

- $DO \leq DO_{\text{Témoïn}}$: Non formatrice de biofilm ;
- $DO_{\text{Témoïn}} < DO \leq 2 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Faiblement formatrice ;
- $2 \times DO_{\text{Témoïn}} < DO \leq 4 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Capacité modérée ;
- $DO > 4 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Fortement formatrice du biofilm.
-

1.5.2. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par la production de slime sur la gélose au Rouge Congo :

1.5.2.1. Principe de la technique : Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches testées pour leur capacité à produire un biofilm sur le milieu Rouge Congo (Chaiebet *et al.*, 2005). C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la composition de la couleur de leurs colonies (Mathur *et al.*, 2006).

1.5.2.2. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne : comme décrit précédemment.

1.5.2.3. Protocole : Selon Freeman *et al.*, (1989), le milieu gélosé au Rouge Congo est préparé avec 37 g/l de bouillon BHI (Merck, Germany), 50 g/l de saccharose, 10 g/l de l'agar bactériologique, et 0,8g/l de Rouge Congo (Fluka, India). Les boîtes contenant le milieu sont inoculées par les souches à tester à partir du milieu solide BHI et incubé à 37 °C pendant 24 à 48 h. Les souches productrices de slime donneront des colonies noires à surfaces rugueuses alors qu'un résultat négatif indiquera des colonies rouges à surface lisse. Les souches de phénotype variable donneront des colonies à centre noir et contour rouge ou à centre rouge et contour noir.

1.5.3. Évaluation de la capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable :

1.5.3.1. Préparation des surfaces : Des surfaces en acier inoxydable de type AISI 304 et de taille 2.5x1 cm ont été utilisées. Ces surfaces solides sont utilisées pour examiner *in vitro* la capacité de nos souches à former le biofilm. Les lames sont nettoyées et stérilisées selon la méthode décrite par Rossoni et Gaylarde (2000). La première étape est effectuée par rinçage

à l'acétone pure (EMSUR, GERMANY), puis un lavage par immersion dans NaOH à 1% (P/V) à pH 13,2 et les laisser pendant 1h. Les lames sont rincées avec l'eau distillée stérile et laissées sécher. Elles sont lavées avec l'alcool à 70%(V/V) et les rincées avec de l'eau distillée stérile. Après un séchage de 2 h à 60°C, les lames sont stérilisées à l'autoclave à 121°C pendant 20min.

1.5.3.2. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne : comme décrit précédemment.

1.5.3.3. Protocole : Le protocole appliqué est celui décrit par **Paytubiet al.,(2014)** avec quelques modifications. Les lames sont placées dans des boîtes de pétri stériles. Chaque boîte est remplie par la culture bactérienne à raison de 20ml. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24, 48 et 72h. Après chaque période d'incubation, les lames sont rincées 3 fois avec PBS pendant 10 secondes pour éliminer les cellules non adhérentes. Les biofilms formés sont fixés par incubation à 80°C pendant 30 min. Les lames sont immergées dans le Cristal Violet à 1% (P/V) pendant 15 min pour une évaluation quantitative (figure 8). Ensuite, elles sont rincées à l'eau et séchées à l'air. Les lames sont placées dans l'acide acétique à 30% pendant 30 min avec une vigoureuse agitation. La densité optique est mesurée à 545 nm. Les souches sont classées comme suit (**Stepanovicet al., 2000**):

- $DO \leq DO_{\text{Témoïn}}$: Non formatrice de biofilm ;
- $DO_{\text{Témoïn}} < DO \leq 2 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Faiblement formatrice ;
- $2 \times DO_{\text{Témoïn}} < DO \leq 4 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Capacité modérée ;
- $DO > 4 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Fortement formatrice du biofilm.

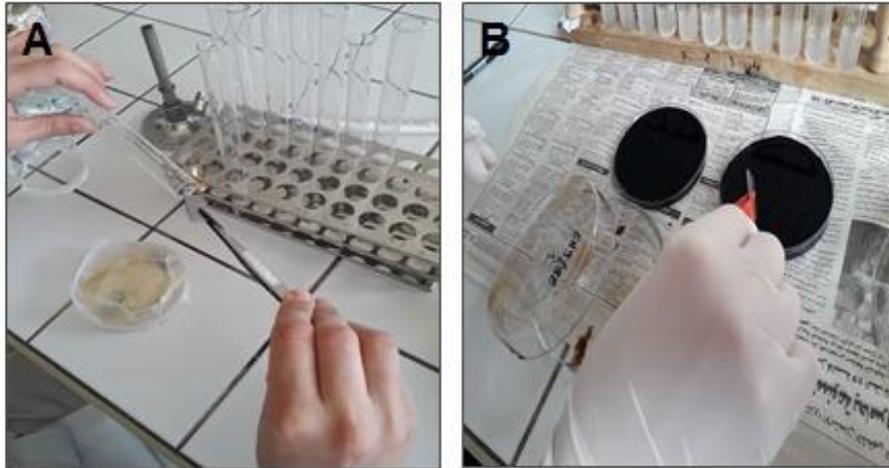


Figure 8 :Évaluation de la capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable (photo personnelle) : (A) : Rinçage des lames par PBS ; (B) : Coloration par Cristal violet

Chapitre 2 : Facteurs affectant la formation de biofilms de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* :

2.1. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne : Comme décrit précédemment.

2.2. Protocol : Un total de 12 souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* est sélectionné pour étudier l'effet du glucose et du NaCl sur la formation de biofilm ainsi que la température d'incubation. Pour cela, 6 concentrations de glucose et du NaCl sont testées, à savoir : 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5% et 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3% pour le sel et le sucre respectivement. Pour chaque concentration 3 températures sont testées : 30, 37 et 40°C.

Chaque puits est remplis par 200µl de BHIB(figure 9) à la concentration fixée et 10 µl de culture bactérienne. Les puits contrôle sont remplis avec BHIBstérile. Chaque souche est inoculée dans 2 puits et la technique est réalisée en duplicate. Les microplaques sont incubées aux températures choisies pendant 24 h. Après l'élimination des cultures, les puits sont lavés 2 fois par PBS pour éliminer les cellules non adhérentes et laissées sécher à l'air libre pendant 15min. Après le séchage, les puits sont remplis par 250 µl de Cristal Violet à 1 % et laisser agir 15 min à température ambiante. Ils sont rincés plusieurs fois avec PBS et séchés à l'air libre pendant 15 min. Un volume de 200 µl d'Acide acétique à 33% est ajouté et laissée agir 30 min. La densité optique est mesurée à 595 nm (BioTek). Les souches sont classées comme suit (Stepanovicet al., 2000):

- $DO \leq DO_{\text{Témoïn}}$: Non formatrice de biofilm ;
- $DO_{\text{Témoïn}} < DO \leq 2 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Faiblement formatrice ;
- $2 \times DO_{\text{Témoïn}} < DO \leq 4 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Capacité modérée ;
- $DO > 4 \times DO_{\text{Témoïn}}$: Fortement formatrice du biofilm.

Résultats et discussion

Chapitre 1 :Caractérisation et évaluation de la capacité de formation de biofilm :

1.1. Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm sur les microplaques de titration à 96-puits en Poly Chlorure de Vinyle :

Pour connaître la capacité de la formation de biofilm, un total de 31 souche de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* est testé sur les microplaques de titration à 96-puits en PVC. Les resultats obtenus ont indiqué qu'aucune souche de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* a une capacité modérée ou forte de formation de biofilm. 2 souches ont présenté une faible capacité de formation de biofilm avec une DO qui varie entre 0,25 à 0,47 et 11 souche de *Staphylococcus aureus* avec une DO entre 0,22 et 0,43. Les 20 souches restantes de *B. cereus* ont été classées comme non productrices de biofilm, et pour les *Staphylococcus aureus* aucune souche n'a montré une capacité négative.L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 1.

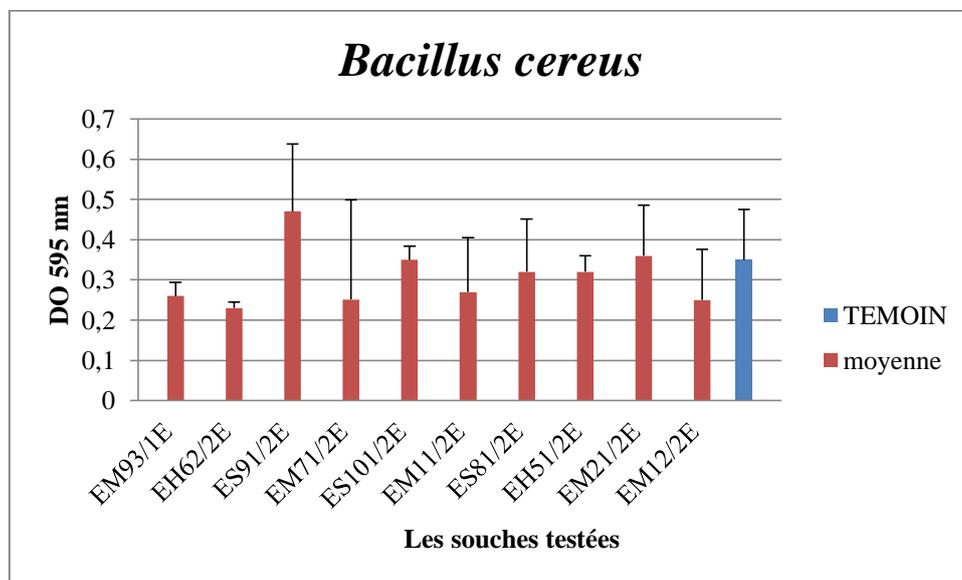


Figure 9: Formation de biofilm de *Bacillus cereus* sur les microplaques de titration à 96 puits en PVC par la technique de cristal violet : non productrice de biofilm ($DO_{595nm} \leq 0,35$), non formatrice ($0,35 < DO_{595nm} \leq 0,70$), faible ($0,70 < DO_{595nm} \leq 1,4$), modéré ($DO_{595nm} > 1,4$) fortement formatrice de biofilm.

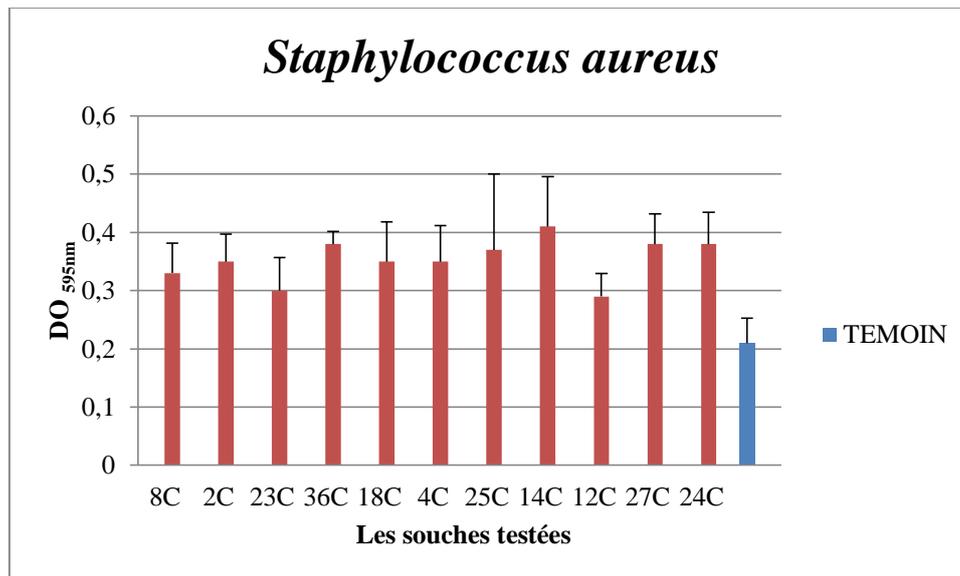


Figure 10: Formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* sur les microplaques de titration à 96-puits en PVC par la technique de cristal violet : non productrice de biofilm ($DO_{595nm} \leq 0,21$), non formatrice $0,21 < DO_{595nm} \leq 0,42$), faible ($0,42 < DO_{595nm} \leq 0,84$), modéré ($DO_{595nm} > 0,84$), fortement formatrice du biofilm.

Tableau 1 : Résultats de capacité à former le biofilm sur les microplaques de titration à 96-puits en PVC des souches bactériennes de *B.cereus* et de *Staphylococcus aureus* :

Espèces	Capacité à former le biofilm				Total
	Négatif (-)	Faible (+)	Modère (++)	Forte (+++)	
<i>Bacillus cereus</i>	18	2	0	0	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	11	0	0	11
Total	18	13	0	0	31

1.2. Caractérisation phénotypique de la production de biofilm sur la gélose au Rouge Congo :

La formation de biofilm sur la gélose au Rouge Congo (ARC) permet d'avoir une détection phénotypique des souches. Pour cela, une incubation pendant 24h a été réalisée pour obtenir les résultats résumés dans le tableau 2 et la figure 12.

Dans cette expérience, aucune des 20 souches de *Bacillus cereus* n'était capable de produire le slime sur la gélose au Rouge Congo. Pour les souches de *Staphylococcus aureus*

3/11 était capables de produire des colonies noires sur la gélose au Rouge Congo, alors que 8 souches étaient incapables de le produire.

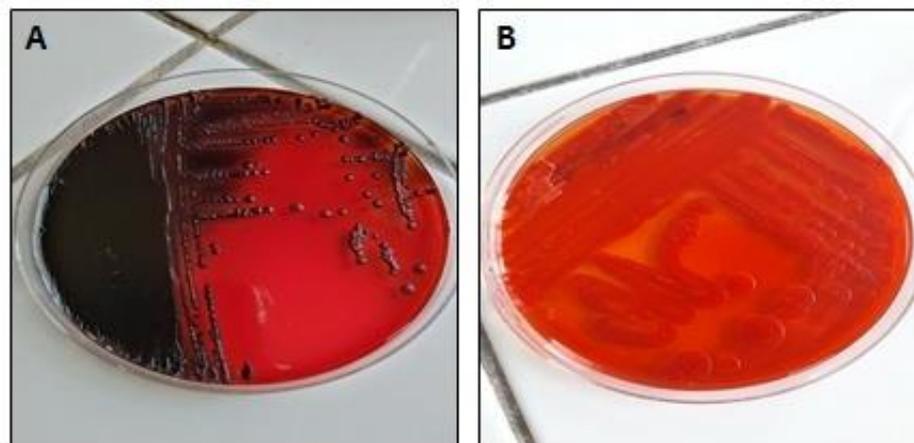


Figure 11:Détection phénotypique de la formation de biofilm des souches testées sur la gélose au Rouge Congo (**A**) souche appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* productrice de biofilm avec des colonies noires signifiant la production de slime ; (**B**) Souche appartenant à l'espèce *Bacillus cereus* non formatrice de biofilm avec colonies rouges(photo personnelle).

Tableau 2 :Résultatsde capacité à former le biofilm sur la gélose au Rouge Congo des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et Donner Kebab prêt à manger :

Espèce	Productrice	Non productrice	Total
<i>Bacillus cereus</i>	0	20	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	8	11
Total	3	28	31

1.3. Evaluation de la capacité à former le biofilm sur des lames en acier inoxydable :

La formation de biofilm sur l'acier inoxydable est réalisée par plusieurs étapes : la coloration au CV et sa solubilisation par l'acide acétique à 30%. Les figures 11 et 12 expriment les résultats obtenus mesurés par la valeur de la DO_{545nm} et pendant 3 durées d'incubation. Les souches sont classées, comme indiqué dans le tableau 3, en quatre

catégories : non formatrices de biofilm, avec une faible capacité à former le biofilm, avec une capacité modérée et avec une forte capacité à produire le biofilm.

Au total, 61% des souches sont classées comme non formatrices de biofilm ou avec une faible capacité sur les surfaces en acier inoxydable après 24h dont 51% des souches de *Bacillus cereus* et 10% des souches de *Staphylococcus aureus*. 29% des souches sont faiblement formatrice de biofilm appartenant à *Bacillus cereus* avec un taux de 13% et à *Staphylococcus aureus* avec 16%. 10% des souches sont modérément formatrices de biofilm dont *Staphylococcus aureus*, par contre aucune souche de *Bacillus cereus* n'est modérément formatrice de biofilm. Pour une forte formation de biofilm aucune des 31 souches n'est fortement formatrice de biofilm.

Après 48 h d'incubation, 71% souches ne sont pas formatrices de biofilm qui sont 45% souches de *Bacillus cereus* et 26% souches de *Staphylococcus aureus*. 29% des souches ont une faible capacité à former le biofilm. Pour une formation de biofilm modérée à forte, aucune des 31 souches n'est capable à former.

L'évaluation de la formation de biofilm sur l'acier inoxydable après 72 h a indiqué que 58% des souches testées sont non formatrices de biofilm dont 32% souches de *Bacillus cereus* et 26% souches de *Staphylococcus aureus*. 42% de souches sont classées comme faiblement formatrices de biofilm dont 32% souche de *Bacillus cereus* et 10% souches de *Staphylococcus aureus*. Aucune souche des deux espèces n'est ni modérément formatrice de biofilm ni fortement formatrice sur l'acier inoxydable. La plus grande valeur obtenue par *Bacillus cereus* est égale à 1.

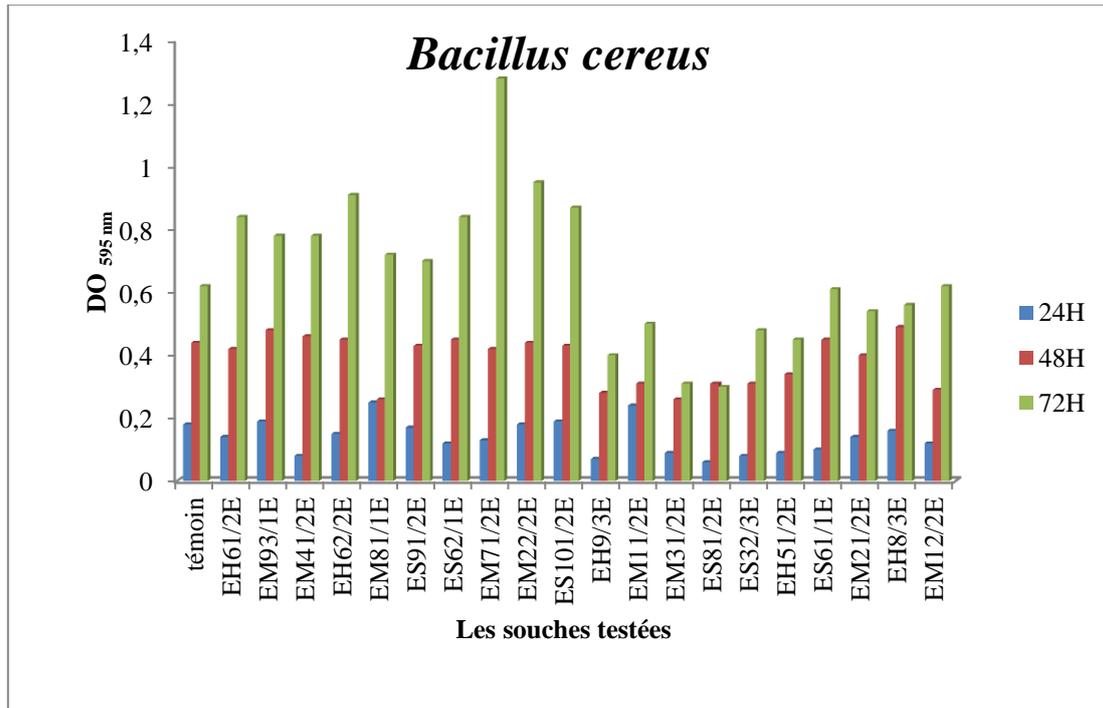


Figure 12 : Résultat de formation de biofilm (DO_{545nm}) des souches de *Bacillus cereus* sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance à 37°C dans 20 ml de la culture bactérienne après 24,48 et 72h d'incubation.

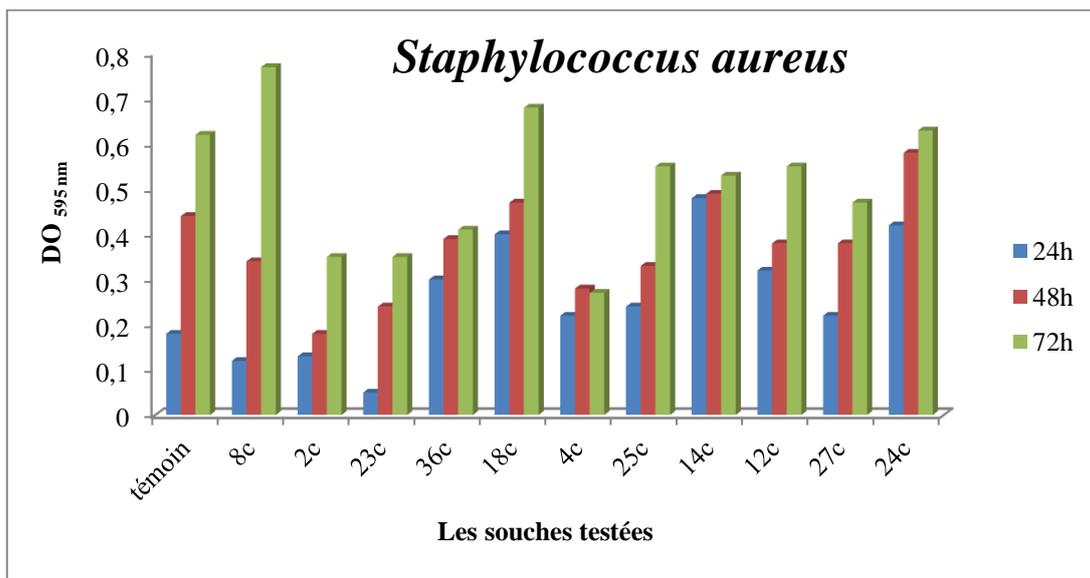


Figure 13: Résultat de formation de biofilm (DO_{545nm}) des souches de *Staphylococcus aureus* sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance à 37°C dans 20 ml de la culture bactérienne après 24,48 et 72h d'incubation.

Tableau 3 : Classement des souches testées pour leur capacité à former le biofilm sur les surfaces d'acier inoxydable :

Classement	Temps d'incubation (h)		
	24 h	48h	72h
Non formatrice	$DO \leq 0,18$	$DO \leq 0,44$	$DO \leq 0,62$
Faiblement formatrice	$0,18 < DO \leq 0,36$	$0,44 < DO \leq 0,88$	$0,62 < DO \leq 1,24$
Moyennement formatrice	$0,36 < DO \leq 0,72$	$0,88 < DO \leq 1,76$	$1,24 < DO \leq 2,48$
Fortement formatrice	$DO > 0,72$	$DO > 1,76$	$DO > 2,48$

1.4.Discussion :

La présence de biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments affecte négativement la qualité et la sécurité des produits alimentaires. Ces biofilms peuvent en effet contenir un nombre considérable de micro-organismes à la fois d'altération et pathogènes (Giaouris *et al.*, 2014). Il existe plusieurs techniques permettant la détection et la quantification des biofilms, parmi lesquelles la méthode de microplaque de titration suivie par une coloration au cristal violet (CV) et la méthode de la gélose au Rouge Congo (ARC) semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm *in vitro* (Mathur *et al.*, 2006).

Parmi les souches testées dans ce travail, 9,67% se sont montrées productrices de slime sur la gélose au Rouge Congo, alors que 74,19% ne l'ont pas produit dont toutes les souches de *Bacillus cereus*. Toutes les souches de *B. cereus* n'ont pas produit de slime sur ARC et seulement 02 souches ont une faible capacité à produire sur PVC, la plus part des souches ne produisaient pas de slime mais forment des biofilms sur le PVC avec une faible capacité. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Bouali, (2017) qui a indiqué que la plupart des souches de *B. cereus* sont incapables de former le biofilm ou capables à faible capacité sur les microplaques de titrations. Alors que pour *S. aureus* 03 souches sont productrices de slime et 11 souches avaient une faible aptitude à former le biofilm sur le PVC. L'étude de Johannes *et al.*, (2002) a montré que 04 souches seulement sur 128 de *S. aureus* formaient un biofilm. De même, Mathur *et al.*, (2006) ont trouvé que 07 souches seulement étaient formatrices de biofilm sur un total 152. Taj *et al.*, (2012) ont montré que le dépistage par la technique de Rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm. De nombreux facteurs, notamment la température élevée, la faible

teneur d'oxygène ont été identifiés comme étant des paramètres influençant l'expression d'un gène responsable de la formation du biofilm (Xu *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2012).

Il est bien établi que la formation de biofilms est affectée par un grand nombre de facteurs environnementaux tel que le type de surface (Gotz, 2002 ; Stanley *et al.*, 2003 ; Karatan et Watnick, 2009). D'après les résultats de la formation de biofilm sur l'acier inoxydable, la majorité de souches de *Bacillus cereus* testées sont considérées comme non formatrice de biofilm après 24 h d'incubation. Alors que, après 72 h de croissance, quelques souches avaient tendance à former des biofilms avec une capacité modérée contrairement à ce qui est obtenu par les méthodes précédente à savoir les microplaques de titration à 96-puits et la méthode au Rouge Congo avec lesquelles une incapacité de formation de biofilm par *Bacillus cereus* a été enregistrée.

Nos résultats sur les coupons d'acier inoxydable sont en accord avec ceux rapportés précédemment par Lindsay *et al.*,(2006), Wijman *et al.*,(2007) et Zhao *et al.*,(2013) indiquant que *B. cereus* forment des biofilms épais à l'interface air-liquide alors que ils peuvent former des biofilm beaucoup plus faible dans les systèmes immergés. D'après (Faileet *et al.*, 2014), la quantité de biofilm formée se diffèrent en fonction de la souche, ou il résulte que la plus faible quantité de biofilm a été produite par *B. cereus* qui est en accord avec nos résultats. le signal environnemental peut aussi déclencher des réactions différentes selon les espèces. Par exemple, la limitation des nutriments favorise la formation de biofilm par *Salmonella enterica*(Gerstel et Römling 2001) et *B. subtilis*(Stanley *et al.*, 2003), mais l'inhibe pour *Vibrio cholera* (Yildiz *et al.*, 2004). Pour *B. cereus*, plus de souches ont tendance à former un biofilm dans un milieu pauvre en nutriments ou milieu induisant la sporulation par rapport à un milieu riche (Wijman *et al.*, 2007 ; Hsueh *et al.*, 2008).*Staphylococcus aureus* a la capacité d'adhérer et de former un biofilm sur une surface inerte, telle que l'acier inoxydable couramment utilisé dans l'industrie alimentaire(Hamadi *et al.*,2014). Il a été constaté que la cause d'une importante crise au Japon en 2000, qui a touché plus de 13 000 personnes, a été la production d'une toxine thermorésistants par la bactérie *S.aureus* survivre dans les canalisations d'une usine agroalimentaire (Asao *et al.*, 2003).Les résultats obtenus montrent qu'après une augmentation de temps d'incubation, la formation de biofilm diminue.c'est à dire que les bactéries prennent leur taux maximal de production de biofilm juste après 24 h d'incubation marqué par 3/11 souches avec une capacité modérée. Par contre Tsuneda *et al.*,(2003) ont indiqué qu'après 72 h d'incubation y avait une formation de biofilm. Marques *et al.*, (2007) ont étudié la formation de biofilm par *S. aureus* isolées des environnements alimentaires sur les surfaces en acier, ils ont constaté qu'il existe une

formation de biofilm respectivement, après 15 jours d'incubation. D'une façon générale les résultats obtenus par les 3 méthodes montrent que les 11 souches de *Staphylococcus aureus* testées par PVC sont faiblement formatrices de biofilm, 3/11 souches forment de slime par la méthode au Rouge Congo, et la plupart des souches sont considérées comme non formatrices de biofilm ou avec une faible capacité à former. Plusieurs études ont constaté que l'adhésion bactérienne est inhibée ou réduite par le préconditionnement (**Helke et al., 1993; Almakhlafi et al., 1994 ; Wong, 1998 ; Barnes et al., 1999 ; Flint et al., 2001 ; Pakar et al., 2001 ; Rubio et al., 2002**).

Notre étude sur le Rouge Congo a montré un développement des colonies noires se produit chez les souches de *Staphylococcus aureus* seulement. Cela s'expliquerait par la formation de biofilms qui se fait en deux étapes : une adhésion à la surface suivie d'une production des exo-polysaccharides (**Ouchar et al., 2013**), et donc la production de slime. Les résultats de **Savado et al., (2004), Ouchar et al., (2013)** signifient une production importante des EPS ce qui conduit à la formation de slime. Cependant des résultats de production des EPS inférieurs ont été observés par **Francis et al., (2009) et Vijayabaskar et al., (2011)** par *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus mutans*. La production des exo-polysaccharides joue un rôle important dans les infections causées par différents microorganismes (**Alcaraz et al., 2003**) et est considérée comme un facteur de virulence important pour certains microorganismes tels que *Staphylococcus aureus*.

Chapitre 2 :Facteurs affectant la formation de biofilms de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* :

La formation du biofilm pour chaque souche a été évaluée en utilisant les microplaques de titration à 96-puits en PVC. L'effet du glucose et du NaCl a été évalué en testant six concentrations différentes pour chaque élément avec différentes températures d'incubation. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures ci-dessous.

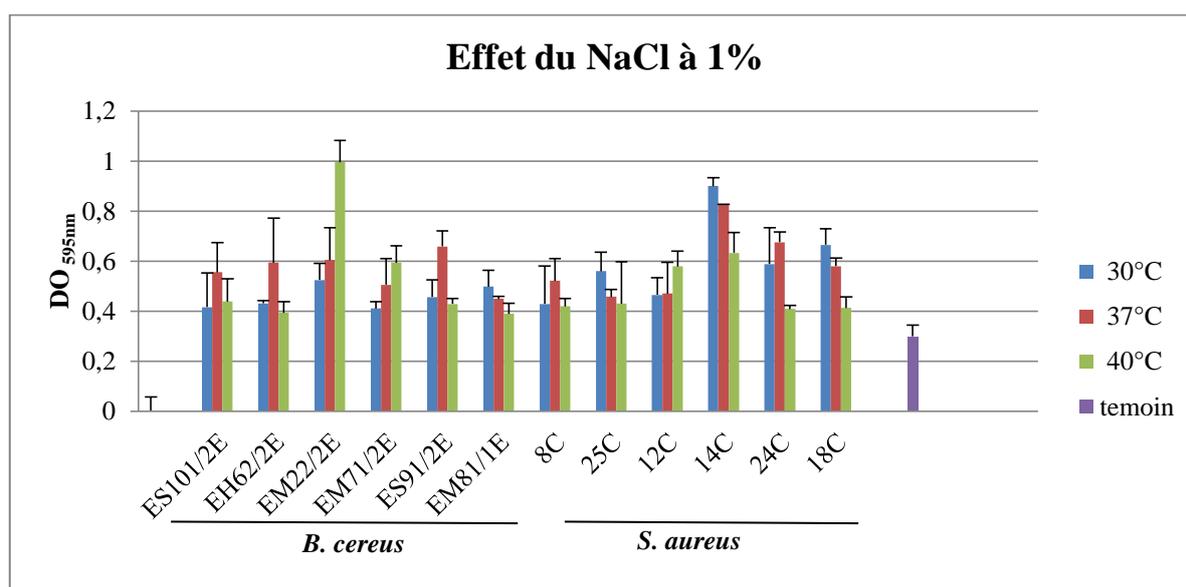


Figure 14 :Effet du NaCl à 1%.

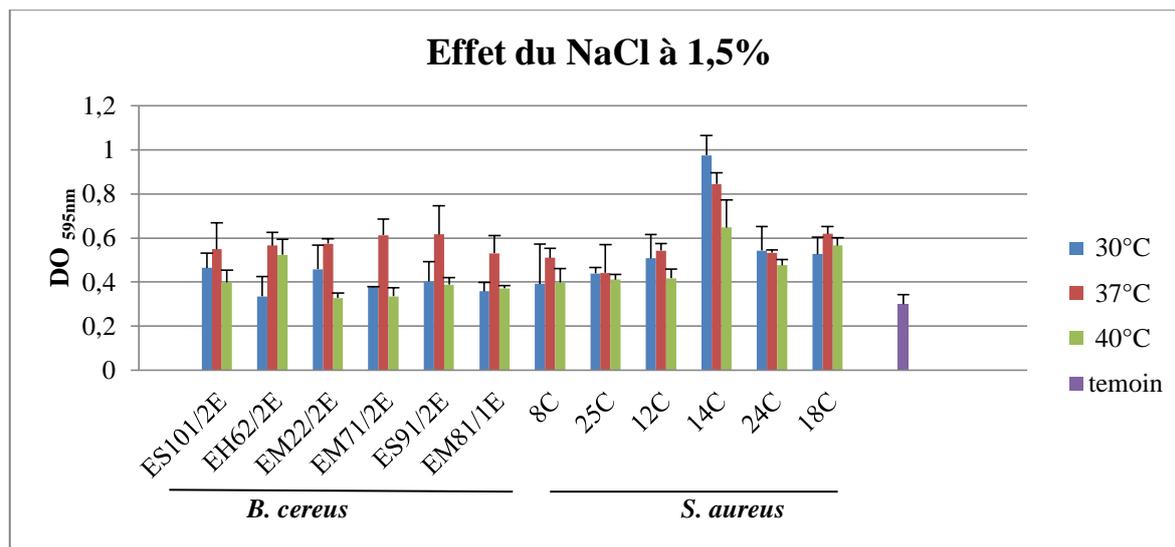


Figure 15 : Effet du NaCl à 1,5%.

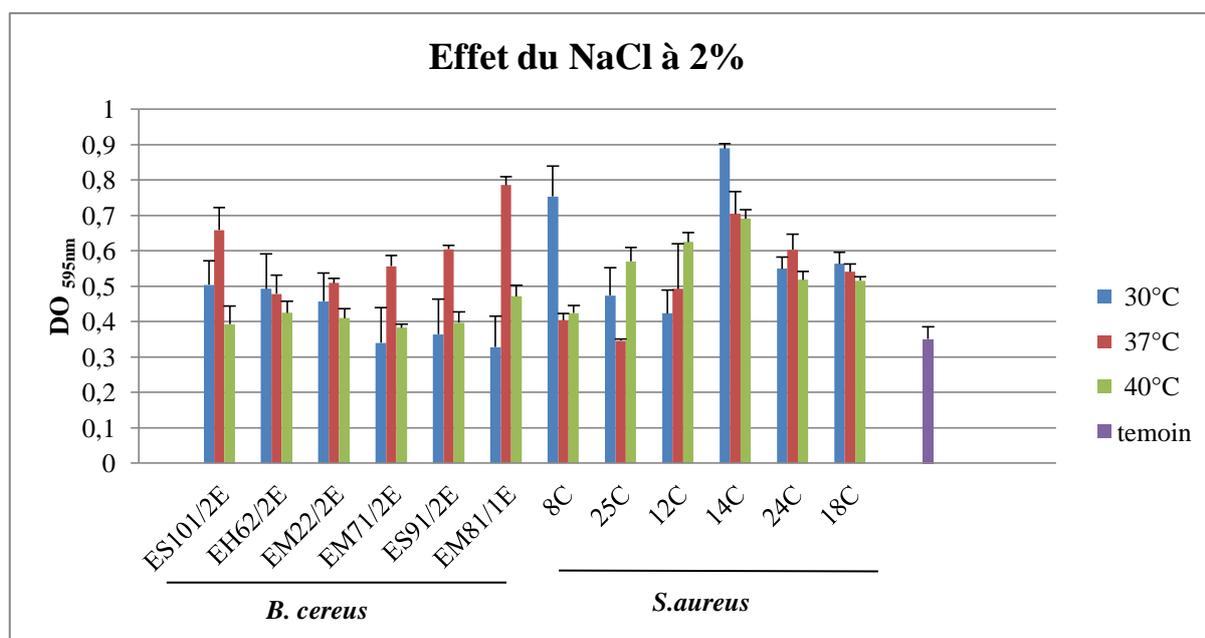


Figure 16 : Effet du NaCl à 2%.

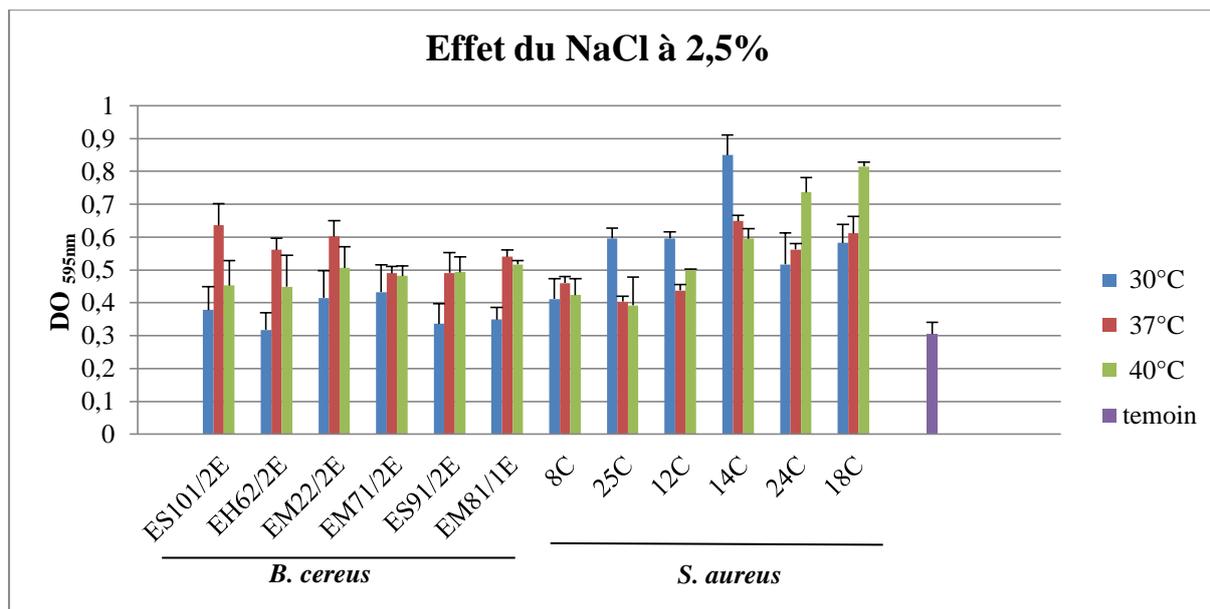


Figure 17 :Effet du NaCl à 2,5%.

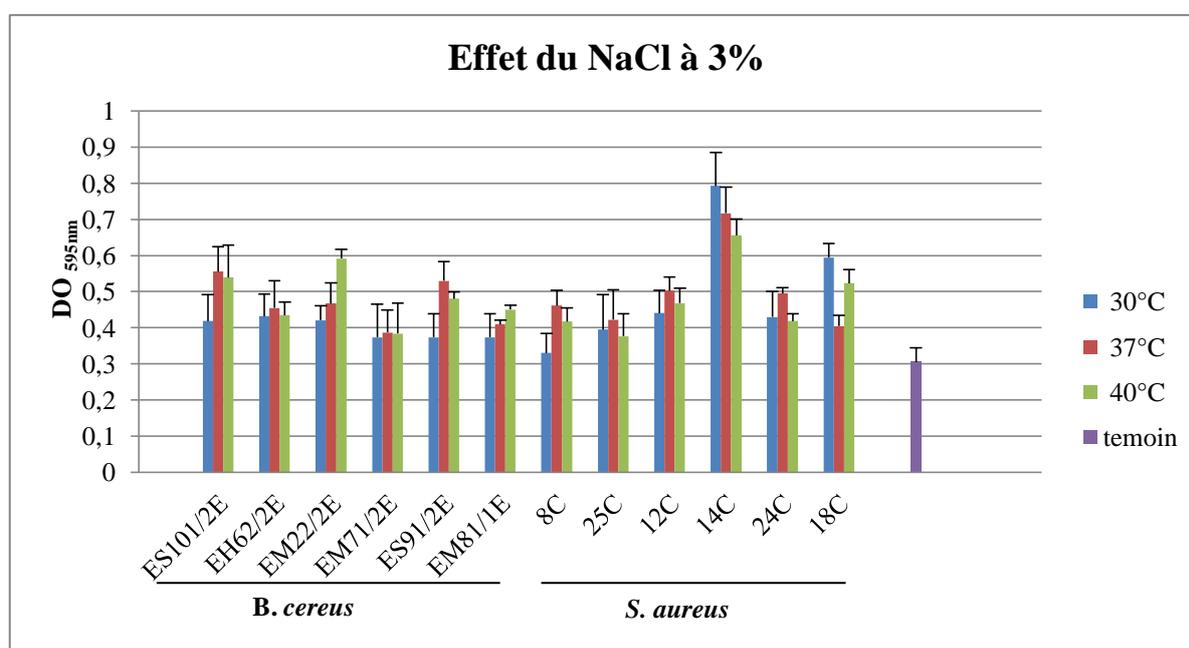


Figure 18 : Effet du NaCl à 3%.

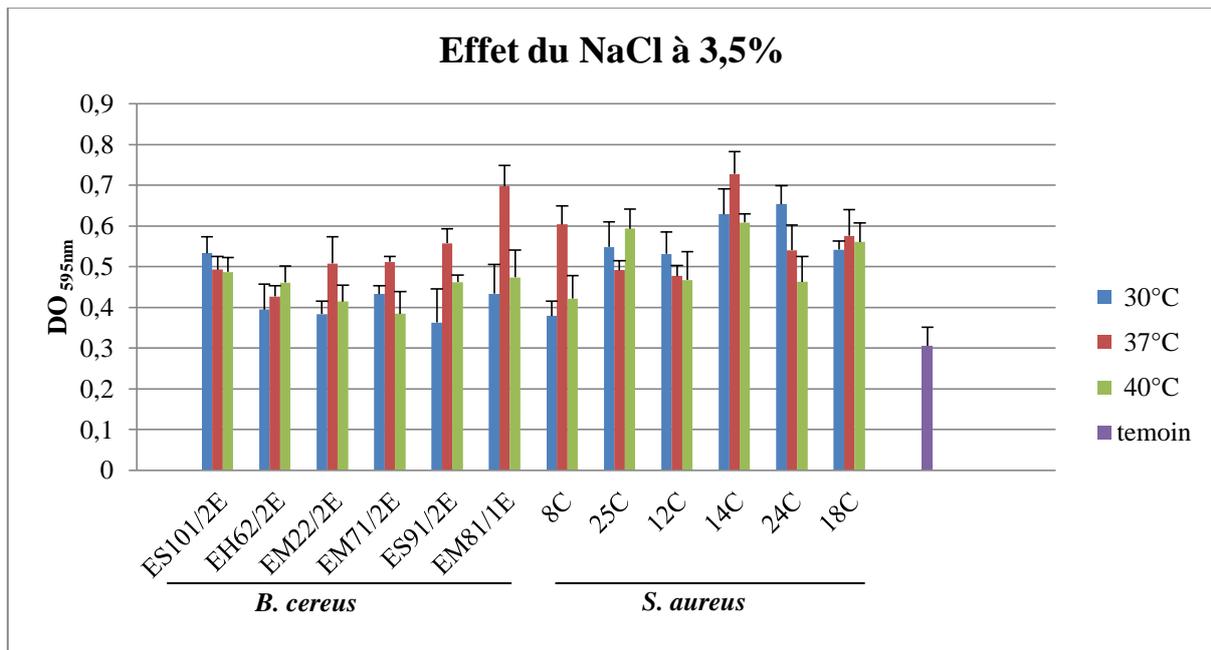


Figure 19 : Effet du NaCl à 3,5%.

Figure 20 : Effet du NaCl et de la température sur la formation de biofilm chez *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

La figure 15 montre l'effet du NaCl couplé à la température sur la formation de biofilm par 12 souches appartenant à *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* après 24h d'incubation. On remarque que chez la plupart des souches de *Bacillus cereus* la production de biofilm atteint son taux maximale lorsque la concentration de NaCl est de 1% et à la température de 40°C. Pour le reste des souches, la plus grande production est lorsque la température est égale à 37°C, alors qu'un taux réduit est observé lorsque l'incubation est à 30°C.

Chez les souches de *Staphylococcus aureus* on observe que le taux maximal de production de biofilm est marqué à une concentration de 1,5% en NaCl et à une température de 30°C. Une réduction est marquée lorsque on augmente la concentration jusqu'à 3,5%.

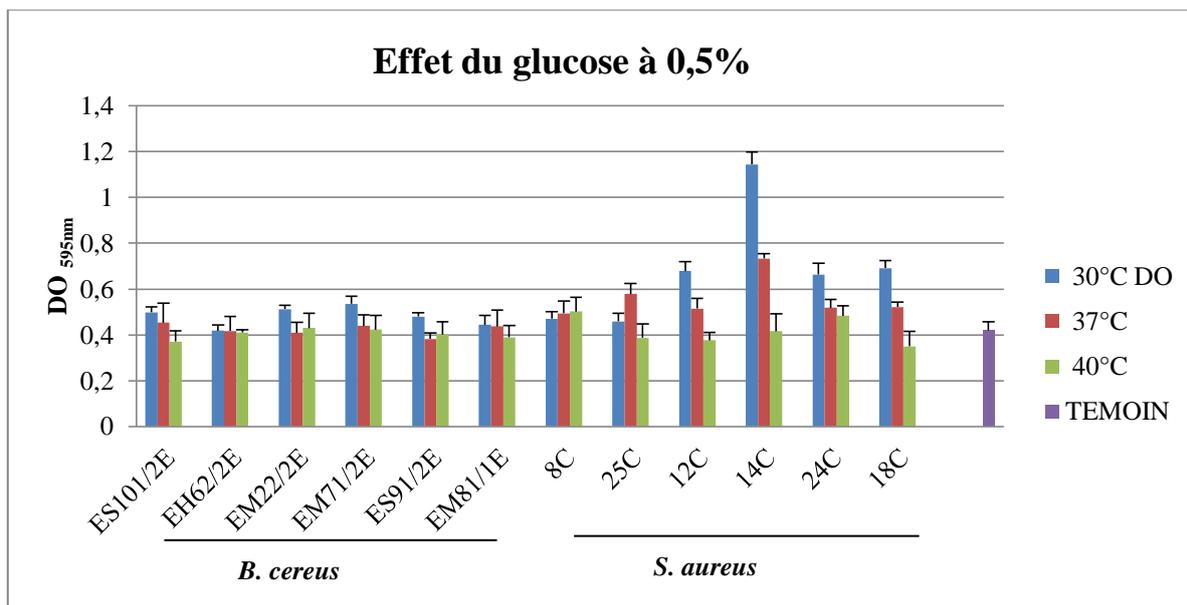


Figure 21 : Effet du glucose à 0,5%.

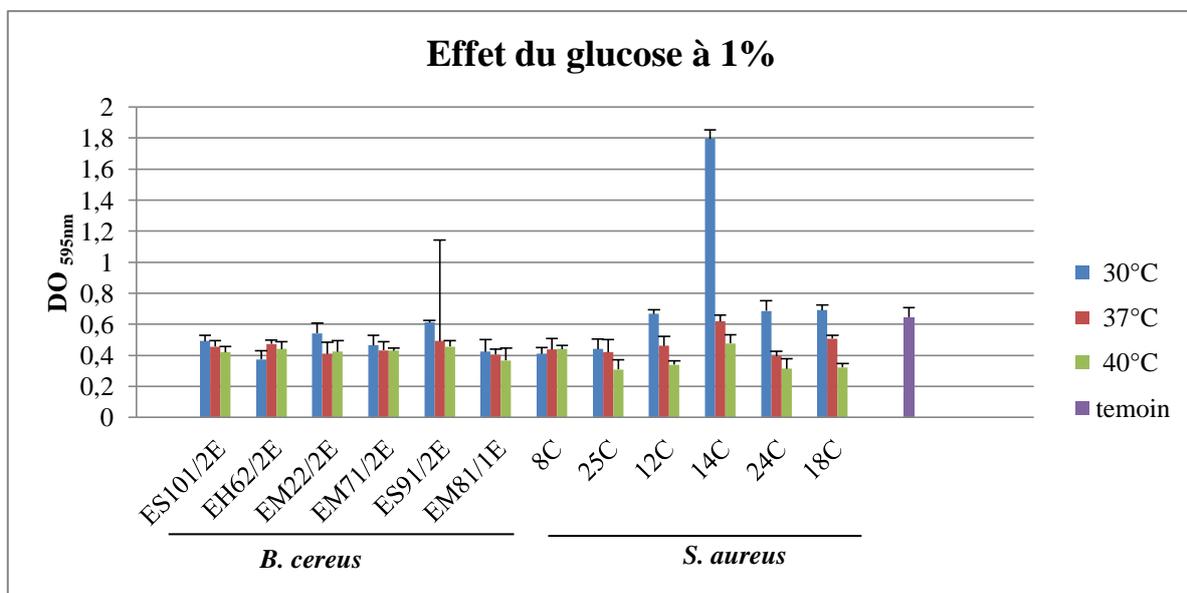


Figure 22 : Effet du glucose à 1%.

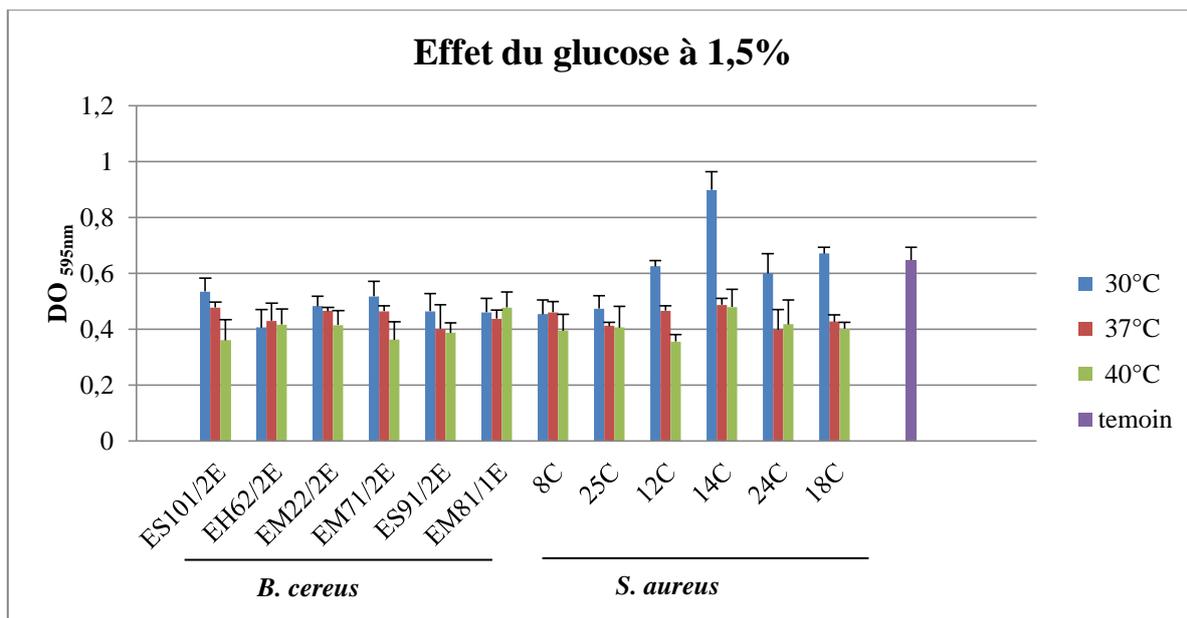


Figure 23 : Effet du glucose à 1,5%.

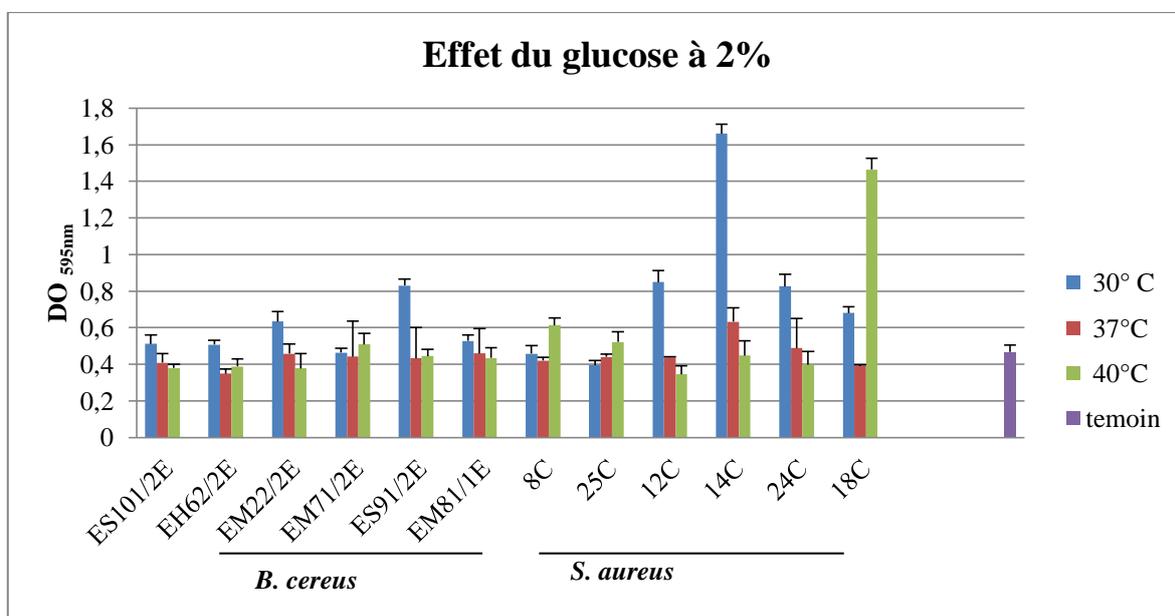


Figure 24 : Effet du glucose à 2%.

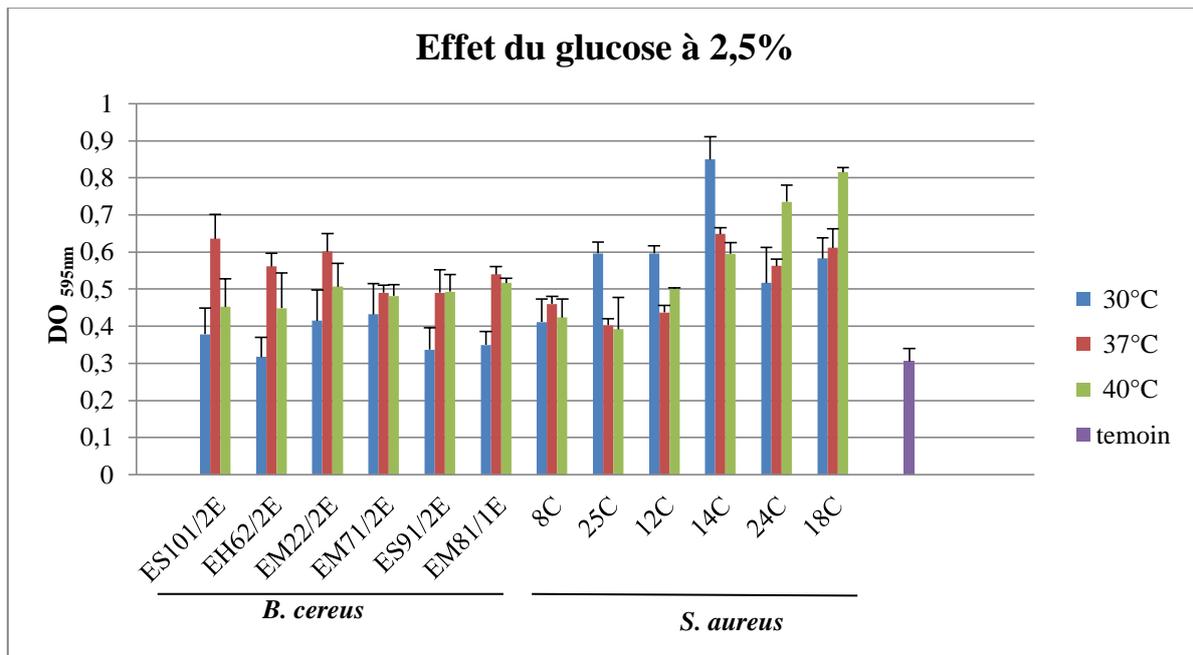


Figure 25 : Effet du glucose à 2,5%.

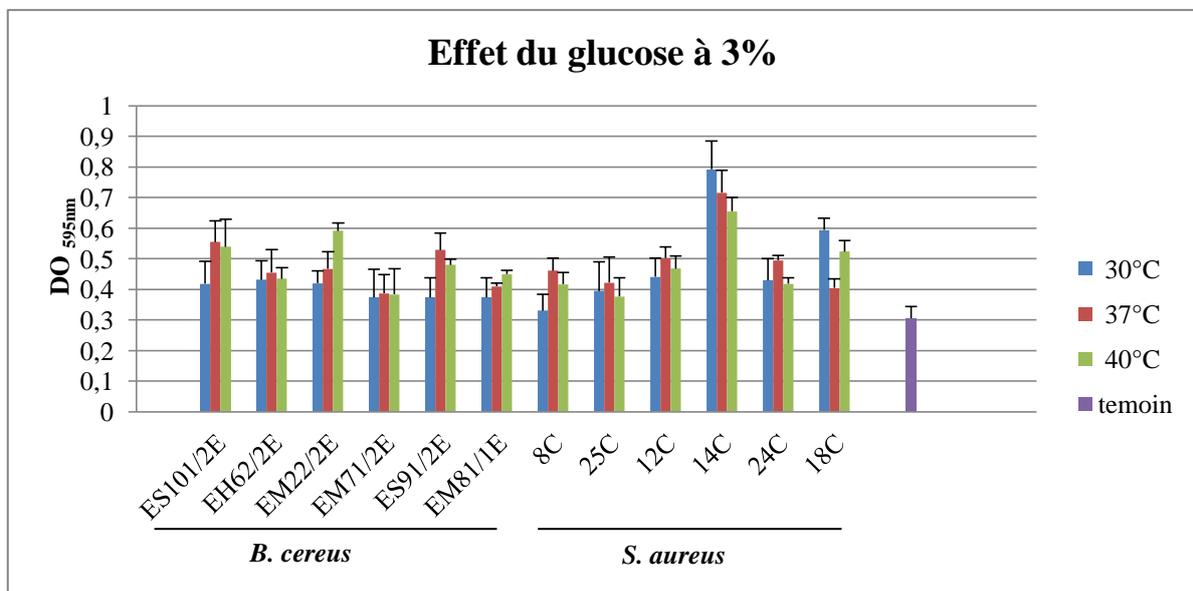


Figure 26 : Effet du glucose à 3%.

Figure 27: Effet du Glucose et de la température sur la formation de biofilm chez *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

D'après la figure 16 qui représente l'effet du glucose couplé à la température sur la formation de biofilm par des souches appartenant aux espèces *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, on observe que la production de biofilms chez les souches de *Bacillus*

cereus atteint son taux maximal lorsque la concentration du Glucose est égale à 2% et à une température de 30°C dont la valeur de la densité optique enregistrée est de l'ordre de 1,62 . Pour les souches de *Staphylococcus aureus* la production est en maximum à 30 °C et a concentration qui égale à 1% avec une valeur de DO égale 1,8.

Discussion :

Plusieurs travaux ont montré que les facteurs environnementaux tel que la température, les nutriments et autres composants présent dans le milieu de culture affectent la fixation des microorganismes à la surface de divers matériaux et pas conséquent la formation de biofilms (Hood et Zottola, 1997 ; Iversen *et al.*, 2004).

La formation de biofilm de 12 souche testées dont 6 appartenant au genre *Bacillus cereus* isolées de la viande de poulet cru commercialisée dans la région de Tlemcen et 6 souches de *Staphylococcus aureus* isolées du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la même région ont été analysée sous différentes conditions (températures, concentrations de glucose et de NaCl). Dans un environnement agro-alimentaire, différentes surfaces et les températures peuvent être utilisées en fonction de l'équipement qui pourrait affecter la formation de biofilm de *B. cereus* (Kwon *et al.*, 2017). Globalement, nos résultats des différentes concentrations testées montrent que la plupart des souches étudiées sont capables de produire un biofilm dans les 3 températures d'incubation testées. Kwon et ses collaborateurs (2017) ont trouvé que sur toutes les souches de *Bacillus cereus* testées, une était capable de former des biofilms à la fois à 25°C et à 30° C après 48 h d'incubation, et que les quantités de biofilms formés sur PS étaient significativement plus faibles que celle de l'acier inoxydable. De même, Hayrapetyan *et al.*, (2015) ont signalé une quantité significativement plus élevée de biofilm formé sur SS comparée à PS pour *B. cereus* d'origine alimentaire et cette plus grande quantité de formation de biofilm par *B. cereus* (capable de produire des spores, qui sont hydrophobe) sur SS (une surface hydrophobe) pourrait être due aux différences dans les propriétés thermodynamiques qui facilitent leur adhérence ensemble. Ces données indiquent que la formation de biofilms par *B. cereus* est substantiellement affectée par les propriétés de surface.

Chez la souche EM81/1^E la quantité de formation de biofilm sur PVC à 37°C était plus élevée que celle marquée à 30° et à 40°C. Ces données suggèrent que la formation de biofilms par *B. cereus* est également affectée par la température. La dépendance à la température de la formation de biofilm de *B. cereus* a été rapportée précédemment par Wijman *et al.*, (2007). Nous avons étudié la formation de biofilms des souches de *S.*

aureus d'origine alimentaire dans différentes conditions à savoir la température, le chlorure de sodium et glucose. D'après nos résultats, la production de biofilm par les souches de *Staphylococcus aureus* est généralement faible à modérée. Des résultats similaires sont rapportés par **Bose et al., (2009)** qui ont enregistré des résultats très inférieurs de production de biofilm en étudiant les souches des staphylocoques. D'autre part des résultats supérieurs ont été rapportés par **Adilson et Maria (2010)** avec des souches cliniques des *Staphylococcus epidermidis* et **Fatima et al. (2011)** avec les souches cliniques des *Staphylococcus aureus*.

D'après le teste sur PVC a différentes températures et concentration les résultats montrent une formation de biofilm plus importante à 30°C qu'à 37° et 40°C. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par **Tomaras et al., (2003)** qui a montré qu'une souche sauvage d'*A. baumannii* était capable de produire plus de biofilm à une température de 30°C qu'à 37°C. Ce phénomène est aussi observé chez d'autres espèces bactériennes tel *Hafnia alvei*, un pathogène opportuniste de l'homme et de l'animal (**Vivas et al., 2008**). Par contre **Miao et al., (2009)** ont indiqué que l'environnement optimal pour la formation de biofilm des souches de *S. aureus* alimentaire était de 37°C. Cette étude a montré que le biofilm de *S. aureus* était sensible à diverses conditions de température.

L'ajout du glucose a un effet positif sur la formation du biofilm pour les six souches testées de *Staphylococcus aureus*. La concentration optimale du glucose ou de NaCl pour la formation du biofilm chez les Staph est de 2% pour le glucose et 1,5% pour le NaCl. Le glucose constitue un facteur important qui influence la formation des biofilms et il est comme une source de carbone pour les micro-organismes. La composition du milieu est capable d'influencer la capacité des bactéries à produire des biofilms in vitro, en particulier la présence de glucose dans le milieu de croissance est notée pour améliorer la formation de celui-ci (**Stepanovic et al., 2007**). Nos résultats sont également en accord avec l'étude de (**stepanovic et al., 2003**) ; (**Mathur et al., 2006**) qui a montré que l'enrichissement du milieu TSB avec glucose augmente la capacité des staphylocoques à former des biofilms. D'autre résultat ont aussi montré que le glucose stimule positivement la formation des biofilms à *staphylococcus aureus* (**Yong et ses collaborateurs., 2010**). Il en est de même pour **Rinaudo et ses collaborateurs (2010)** qui indiquent que la formation de biofilms par staphylocoque augmente lorsque la concentration en glucose environnemental augmente. Aussi **Kara-Terki (2014)** qui a montré que la formation de biofilm par des souches de staphylocoques isolées d'une sonde urinaires augmente de 30% à 49,5% après l'ajout de 1% de glucose. La quantité de biofilm formée augmente avec la concentration de NaCl jusqu'à 1,5%, alors que une

réduction de quantité de biofilm formé est cependant notée chez la plus part des souches restées partir d'une concentration de 1,5%. Plusieurs études ont montré que de fortes concentrations de NaCl peuvent inhiber la formation de biofilm, comme le cas de *Pseudomonas fluorescens* (O'Toole et Kolter, 1998b). De même, la croissance de *Salmonella typhimurium* dans un milieu contenant des concentrations élevées de NaCl inhibe la transcription de CsgD, un gène régulateur de la formation de biofilm et de la production de curli (Romling *et al.*, 1998). Havasi *et al.*, (2008) a montré qu'il existe un effet inhibiteur du NaCl sur la croissance et la mobilité de *Pseudomonas aeruginosa* à une concentration de 2%, 4% et 7%.

Les résultats obtenus à partir de l'addition des différentes concentrations de glucose et de NaCl chez les 6 souches étudiés montrent que la formation de biofilm atteint son maximum à une concentration de 0,5% de glucose et de 1% de NaCl chez les 6 espèces de *Bacillus cereus*. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par M'Hamedi (2015) qui a montré que la formation de biofilm par des souches cliniques d'*A. baumannii* sous différentes concentrations de NaCl atteint son maximum à une concentration 1%. Des résultats similaires ont également été observés avec des espèces de *Staphylococcus* (Lim *et al.*, 2004). Gao *et al.*, (2015) ont rapporté que l'addition de glucose (1%) dans le TSB peut déclencher la formation de biofilm de *B. cereus* en particulier, un biofilm immergé (Foulston *et al.*, 2015). De manière importante, lors de l'ajout d'une concentration élevée de glucose (compris entre 0.5% et 8%) certaines souches ont présenté une diminution de la formation de biofilm. Par conséquent, l'ajout de glucose pourrait contribuer à d'autres facteurs, notamment la diminution du a_w , pouvant affecter de manière significative la formation de biofilm de *B. cereus* (Kwon *et al.*, 2017). Les différentes concentrations de NaCl ajoutées, diminuent la production de biofilm à partir de 1% chez les espèces de *Bacillus cereus*. Les résultats de Kwon *et al.*, (2017) montrent que lorsque la concentration de NaCl a été augmentée (de 2 à 8%), une réduction de la formation de biofilm des souches de *Bacillus cereus* dans le milieu TSB a été enregistrée. Certaines bactéries sont au contraire capables de produire un biofilm sous forte concentration de sel tel que *Vibrio Cholerae* (Kapfhammer *et al.*, 2005) et *Escherichia coli* ou 200 mM de NaCl active la transcription du gène PGA qui code pour les protéines nécessaires à la synthèse de poly N-acetylglucosamine, un polymère essentiel dans la formation de biofilm (Goller *et al.*, 2006).

En générale, l'excès de glucose dans le milieu améliore la croissance des cellules dans le biofilm, où un lien entre la disponibilité des nutriments et le développement du biofilm a été démontré. Les bactéries ont tendance à adhérer et former un biofilm mature

sur des surfaces dont l'environnement procure suffisamment de nutriments plutôt que des surfaces pauvres en nutriments (**Dawei et al., 2012**). D'autre étude ont montré également que le temps d'incubation peut être connu comme le temps pour lequel les bactéries entrent en contact avec la surface. En effet, plus le temps de contact augmente plus les bactéries ont assez de temps pour se fixer et former un biofilm sur les surfaces(**Maczynska et al.,2010**). Toutes ces observations peuvent être expliquées par des différences spécifiques aux espèces dans la régulation des gènes impliqués dans la production de biofilm(**M'Hamed et al.,2015**). Ces résultats indiquent que la capacité de formation de biofilms est dépendante de facteurs environnementaux (**Rode et al., 2007; Takahashi et al., 2009 ; Hua et al., 2010**).

Conclusion

Conclusion

La formation de biofilms les surfaces en contact avec les aliments constitue un risque accru de contamination du produit. La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Au terme de cette étude, portant sur l'étude phénotypique qualitative et quantitative de la production de biofilm *in vitro* selon différentes méthodes à savoir la méthode standard de coloration au CV appliquée en microplaque à 96-puits, la méthode de détection de slime sur la gélose au Rouge Congo (RCA) et l'étude d'adhésion des souches à l'acier inoxydable. Les résultats obtenus ont montré que 12 souches testées de *Bacillus cereus* sont incapables de former des biofilms sur les microplaques de titration et 12 souches de *Staphylococcus aureus* sont faiblement formatrices de biofilm. Par ailleurs les résultats obtenus à l'issue de la méthode RCA indiquent que toutes les souches de *Bacillus cereus* sont incapables de produire le slime et 3 souches seulement de *Staphylococcus aureus* sont productrices de slime. Après 48 et 72 h d'incubation, 71% et 58% des souches étaient non formatrices de biofilm sur l'acier inoxydable, respectivement. 29% et 42% des souches étaient classées comme faiblement formatrices de biofilm après 48 et 72 h d'incubation, respectivement.

La présence du glucose et du NaCl dans le milieu de culture a influencé la formation de biofilm par les souches testées. *Bacillus cereus* a atteint son taux maximal lorsque la concentration du glucose est égale à 2% et à une température de 30°C et lorsque le milieu contenait 1% de NaCl à une température 40°C.

La production maximale de biofilm par *Staphylococcus aureus* était en présence de 1% de glucose à 30°C, et 1,5% de NaCl avec une incubation à 30°C. Cette étude nous a permis de conclure que la formation de biofilm augmente lorsque la concentration du milieu en glucose augmente, mais l'augmentation de la concentration du NaCl provoque une diminution de celui-ci.

Comme perspectives, il serait intéressant :

- D'approfondir les recherches sur d'autres facteurs influençant la formation de biofilm par *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* comme le pH, le type du milieu de culture

Conclusion

- D'étudier l'effet de ces facteurs sur des biofilms bi-espèces à *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*,
- De combiner l'effet de plusieurs facteurs sur la formation des biofilms à *Staphylococcus aureus* et/ou *Bacillus cereus*.

*Références
bibliographiques*

Référence bibliographique

1. **Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, Voort Mvd. 2011** Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology* 28:199-208.
2. **Adilson O. and Maria de Lourdes R.S.C. (2010)**. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research* , **3**:260
3. **Agarwal R.K., Singh S., Bhilegaonkar K.N. and Singh V.P. (2011)**. Optimization microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *Inter. Food Res. J.* **18(4)**: 1493-1498.
4. **Alcaraz L.E., Satorres S.E., Lucero R.M. and Centrorbi O.N.P. (2003)**. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Braz. J. Microbiol.* **34 (1)**, 45-51.
5. **Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET. 2015**. The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79:19-37.
6. **Al-Makhlafi, H., Mcguire, J., et Daeschel, M. 1994**. Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3560-3565.
7. **Alnnasouri, M. (2010)**. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
8. **Asao K, Sarti C, Forsen T et al. (2003)**: Long-term mortality in nationwide cohorts of childhood-onset type 1 diabetes in Japan and Finland. *Diabetes Care* 26: 2037–2042.
9. **Aung M.M. , F.W. Liang , Y.S. Chang . , C. Makatsoris , J. Chang** . Gestion intelligente de la chaîne du froid basée sur RFID et WSN. *Journal international de recherche en fabrication* , 6 (2) (2011) , p. 91 – 109.
10. **Bakker D. P, H. J. Busscher, J. van Zanten, J. de Vries J. W. Klijnstra, H. C. van der Mei. 2004**. Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. *Microbiology*, 150: 1779–1784.

Référence bibliographique

11. **Barnes L. M., Lo M. F., Adams M. R., Chamberlain A. H. L.1999.** Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4543- 4548.
12. **Bate AR, Bonneau R, Eichenberger P. 2014.** *Bacillus subtilis* Systems Biology: Applications of -Omics Techniques to the Study of Endospore Formation. *Microbiology Spectrum* 2.
13. **Baweja, R.B., Zaman, M.S., Mattoo, A.R., Sharma, K., Tripathi, V., Aggarwal, A., Dubey, G.P., Kurupati, R.K., Ganguli, M., Chaudhury, N.K., Sen, S., Das, T.K., Gade, W.N., Singh, Y., 2008.** Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch. Microbiol.*189, 71-79
14. **Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiellapneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université aboubekrbelkaid, Tlemcen.
15. **Beloin, C.; Roux. A. & Ghigo; J. M. (2008).** *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249-289. 84
16. **Bernard, L. 2006.** Mécanismes physiopathologiques des infections orthopédiques. *Rev. Rhumatol.*73: 327-331.
17. **Bonar, E., Międzobrodzki, J., Władyka, B., 2018.** The staphylococcal coagulases. In: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, pp. 95–102.
18. **Bose S., M. Khodke, S. Basak and S. K. Mallick (2009).** Detection of biofilm producing *staphylococci*: Need of the hour. *J. Clin. Diagnostic Res.*, 3: 41915-1920..
19. **Bottone EJ (2010)** *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 382-+. Gaurav, K., 2017. Characterization of *Staphylococcus Aureus* Milk Isolates From Cow With Subclinical Mastitis for Some Virulence and Antibiotic Resistance Genes. Doctoral dissertation. Rajasthan University of Veterinary and Animal Sciences, Bikaner.

Référence bibliographique

20. **Boutaleb N. (2007).** Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
21. **Brajnsholt T., Moser C., Jensen P., Høiby N.** Biofilm Infections Springer (2011) 11–25
22. **Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, Dijon. p.131-164.
23. **Breyers, J. D., & Ratner, J. P. (2004).** Bioinspired implant materials befuddle bacteria. ASM News, 70, 232–237
24. **Chen, J., Rossman, M. L., & Pawar, D. M. (2007).** Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. LWT – Food Science and Biofilms Science and Technology. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 529–549
25. **Cheryan, Munir Mohamed A. Mehaia (1986).** Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor Enzyme and Microbial Technology, 8; 5, 289-292,
26. **Christelle BRESSUIRE-ISOARD . 2015.** Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation: rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus*. l'Université de Montpellier. 195 p.
27. **Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004.** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. Journal of Applied Microbiology 97, 214-219.
28. **Coorevits A., De Jonghe V., Vandroemme J., Reekmans R., Heyrman J., Messens W., De Vos P., Heyndrickx M. 2008.** Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional farms. Syst. Appl. Microbiol., 31: 126-40.
29. **Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science, 284(5418), 1318–1322.

Référence bibliographique

30. **Crossley, K., Solliday, J., 1980.** Comparison of rectal swabs and stool cultures for the detection of gastrointestinal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 11,433–434.
31. **da Silva EP, Pereira De Martinis EC:** Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97:957-968.
32. **Davey, M. E., & O' Toole, G. A. (2000).** Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867.
33. **Dawei, G., Liping, W., Chengping, L. (2012).** In vitro biofilm forming potential of *Streptococcus suis* isolated from human and swine in China. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43 : 993-1004.
34. **Devriese, L.A., Vancanney, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2005.** *Staphylococcus pseudointermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1569–1573.
35. **Diaby Kadi(2018).** Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination. Mémoire de fin d'étude. Université de Lille 2. 55p.
36. **Di Bonaventura G., Stepanović S., Picciani C., Pompilio A., Piccolomini R. (2007).** Effects of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiol.*, 52, 86–90.
37. **Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
38. **Dumas C. (2007).** Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.
39. **Elyajouri A. (2012).** Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie –Rabat.
40. **Euzéby J.P. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire (2004).**

Référence bibliographique

41. **Evreux, F., B. Delaporte, N. Leret, C. Buffet-Janvresse & A. Morel (2007)** [A case of fatal neonatal *Bacillus cereus* meningitis]. *Arch Pediatr*, 14, 365-8.
42. **F. Hamadi, F. Asserne, S. Elabed, S. Bensouda, M. Mabrouki, H. Latrache.** Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control* Volume 38, April 2014, Pages 104-108.
43. **Faille, C., Tauveron, G., Gentil-Lelievre, C.L., Slomianny, C., 2007.** Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *J. Food Prot.* 70, 2346-2353.
44. **Faille.C , T. Bénézech, G. Midelet-Bourdin , Y. Lequette , M. Clarisse , G. Ronse , A. Ronse , C. Slomianny.**Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiology* 40 (2014) 64-74
45. **Fatima K., Indu S., Meher R., Tariq M. and S. C. Sharma (2011).** Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections. *Trends Med. Res.* ISSN 18119-3587.
46. **Fimlaid KA, Shen A. 2015.** Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Current Opinion in Microbiology* 24:88-95.
47. **Fletcher M. (1988).** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, 170: 2027-2030.
48. **Flint S., Plamer J., Bloemen K., Brooks J., Crawford R. 2001.** The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 151-157.
49. **Florjanic, M. & Kristl, J. (2011).**The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *International Journal of Pharmaceutics*, 405(1-2): 16-22..
50. **Folkesson A., Haagenen J. A. J., Zampaloni C., Sternberg C. and Molin S.(2008).** Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides. *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11.

Référence bibliographique

51. **Folsom J.P. and Frank J.F. (2006).** Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance. *J. Food Prot.* 69, 1292–1296.
52. **Francis J. B., B. J. Bency, S. Ramesh and M. Amuthan (2009).** Exopolysaccharide production by *Bacillus subtilis* NCIM 2063, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2862 and *Streptococcus mutans* MTCC 1943 using batch culture in different media. *Afri. J. of Biotech.* 9 (20) : 5454-5457.
53. **Freeman D.J, Falkiner F.R and Keane C.T. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42:872–4.
54. **Galperin MY, Mekhedov SL, Puigbo P, Smirnov S, Wolf YI, Rigden DJ. 2012.** Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* 14:2870-2890.
55. **Gautam, C. K, Srivastav, A. K, Bind, S., Madhav, M. & Shanthi, V. (2013).** An insight into biofilm ecology and its applied aspects. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, ISSN- 0975-1491 Vol 5, Issue 4, 2013 review.
56. **Gerstel, U. and U. Römling (2001).** Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology* 3(10): 638-648.
57. **Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E. and Holah J.T. (1999).** Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 87(1): 41-48..
58. **Gilbert P. Allison DG, Mc Bain AJ:**Biofilm in vitro and in vivo:do singular mechanisms imply cross- resistance? *J Appl Microbiol* 2002, 92: 98S-110S.
59. **Goller C., Wang X., Itoh Y., Romeo T. (2006).** The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilmadhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol.* 188: 8022-32.
60. **Gotz, F. (2002).** *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 43(6): 1367-1378.
61. **Gould GW. 2006.** History of science--spores. *J Appl Microbiol* 101:507-513.

Référence bibliographique

62. **Guinebretiere MH, Girardin H, Dargaignaratz C, Carlin F, Nguyen-The C. 2003.** Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *International Journal of Food Microbiology* 82:223-232.
63. **Hamadi F., Latrache H. 2005.** “Comparison of Contact Angle Measurement and Microbial Adhesion to Solvents for Assaying Electron Donor-Electron Acceptor (Acid-Base) Properties of Bacterial Surface,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 65, No. 1, 2005 pp. 134-139.
64. **Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. 2004.** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. 54:213-225.
65. **Harris, L. G. et R. G. Richards. (2006).** Staphylococci and implants surfaces: a review. *Injury, Int. J. Care Injured* 37: S3-S14.
66. **Hayrapetyan, H., Muller, L., Tempelaars, M., Abee, T., & Nierop Groot, M. (2015).** Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and domesticated food isolates and the effect of free iron. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 72–79
67. **Helke D.M., Somers E.B., Wong A.C.I. 1993.** Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*, 56, 479-484
68. **Henriques M., Azeredo J., et Oliveira R. 2004.** Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33, 235–241.
69. **HICKS, D. B., LIU, J., FUJISAWA, M. & KRULWICH, T. A. 2010.** F₁F₀-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: Lessons from their adaptations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797, 1362-1377.
70. **Higgins D, Dworkin J. 2012.** Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *Fems Microbiology Reviews* 36:131-148.

Référence bibliographique

71. **Hood S.K., Zottola E.A. (1997).** Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *J. Food Protect.* 60 : 1034–1037.
72. **Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., Gohar, M., 2010.** Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* 156, 1009–1018.
73. **Hsueh, Y.-H., E. B. Somers and A. C. L. Wong (2008).** Characterization of the *codY* gene and its influence on biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Archives of Microbiology* 189(6): 557-568.
74. **Hua X., Yunyun Z., Hyeon-Yong L. and Juhee A. (2010).** Effect of NaCl on the Biofilm Formation by Foodborne Pathogens. *J. of Food Sci.* 75 (9)
75. **Iversen C., Lane M., Forsythe S.J. (2004).** The growth profile, thermo-tolerance and biofilms formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 38 : 378–382
76. **J. Miao , Lin.P, Soteyome .T , Peters.B.M , Li.Y ,Chen .H, Su.J, Li .L, Li.B, Xu.Z, Shirliff.M.E, Harro.J.M.** Formation De Biofilm De *Staphylococcus aureus* Dans Des Conditions De Traitement De La Chaleur Des Aliments: Premier Rapport Sur La Production De LMC Dans Le Biofilm. *Scientific Reports* : 1312. Volume 9.
77. **Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L. et Shirliff M.E.(2008).** Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* 21, 26-59.
78. **Jefferson K.K., (2004)** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, 236, 163-173.
79. **Kailas L., Terry C., N. Abbott et Taylor R., N. Mullin, SB Tzokov et al. (2011).** Architecture de surface des endospores de la famille des *Bacillus cereus / anthracis / thuringiensis* à l'échelle subnanométrique . *Proc Natl Acad Sci USA* 108 : 16014-16019.
80. **Kapfhammer D., Karatan E., Pflughoeft K.J., Watnick P.I. (2005).** Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 71: 3840-7.

Référence bibliographique

81. **Karatan, E. and P. Watnick (2009)**. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(2): 310-347
82. **Kara-Terki I. (2014)**. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm des souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen 98 page.
83. **Knobloch J.K., Horstkotte M.A., Rohde H., Mack D. (2002)**. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol. Immunol.* 191: 101–106.
84. **Kokare C. R., S.Chakraborty, CA. N. Khopade, K. R. Mahadik. 2009**. Biofilms importance and application. *Indian journal of biotechnology*, 8: 159-168.
85. **Kukavica-Ibrulj I. (2007)**. Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada.
86. **Kurlenda, J. et M. Grinholc. (2012)**. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *Acta Biochim. Pol.* 59:171-184.
87. **Kwon.M.,M.Hussain.,D.Hwan oh.**Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing related conditions. *Food Sci Biotechnol.*0129.01-09.
88. **Lahaye, E. (2006)**. Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne-Sud, Lorient, France.
89. **Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Marrie T.J. 1992**. Biofilms and biofouling. *In* J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego. p:277-284
90. **Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., Maillard, J.Y., 2012**. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113, 485-498.
91. **Lemon K., P, Darren E. Higgins, R. Kolter. 2007**. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of bacteriology*, 189: 4418–4424.

Référence bibliographique

92. **Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, aguilar C, Kolter R. 2008.** Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, pp 1-16
93. **Lequette Y, Garenaux E, Combrouse T, Dias Tdel L, Ronse A, Slomianny C, Trivelli X, Guerardel Y, Faille C. 2011.** Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation
94. **Liesse Iyamba J-M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France
95. **Lim Y., Jana M., Luong T.T., Lee C.Y. (2004).** Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 186 : 722-729.
96. **Logan NA (2012)** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* **112**: 417-429
97. **Logan NA. 2012.** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* 112:417-429. patterns and role in spore surface properties. *Biofouling* 27:751-761.
98. **Lorite GS, Rodrigues CM, de Souza AA, Kranz C, Mizaikoff B, Cotta MA. 2011.** The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J Colloid Interface Sci.* 359:289-95.
99. **M'Hamedi Imane ep Aboura.** Evaluation de la formation de biofilms des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Tlemcen. 51.
100. **Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M. R., Bayles K., Wozniak D. J. 2009.** Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* **5**: e1000354..
101. **Mączyńska B., Smutnicka D., Przondo-Mordarska A., Bartoszewicz M., Junka A., Janczura A., Nowicka J. (2010).** Biofilm formation by clinical *Klebsiella* strains expressing various types of adhesins on catheters made of different materials. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 19(4), 443-453.

Référence bibliographique

102. **Marchal M. (2010)**. Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, France.
103. **Martinez L. C., Vadyvaloo V., 2014**. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Cellular and Infection Microbiology*, 4(38), doi: 10.3389/fcimb.2014.00038.- 6496(00)00002-7
104. **Martinez L.R., casadevall A. (2007)**. Cryptococcus néoformans biofilm formation depends on surface support and Carbone source and fungel cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 4592-4601.
105. **Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. (2006)**. Detection of biofilm formation among clinical isolates of *Staphylococci* : an avaluation of three differentscreening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24: 25-9.
106. **Maukonen, J., Ma" tto" , J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003)**. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Micro biology and Biotechnology*, 30,327–356
107. **Meldrum R. J., Little C. L., Sagoo S., Mithani V., Mclauchlin J., De P. E. (2009)**. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. *Food Microbiol.* 26 573–577. 10.1016/j.fm.2009.03.013.
108. **Minyeong Kwon, Mohammad ShakhawatHussain,Deog Hwan Oh. (2017)**. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processingrelatedconditions.
109. **Mirouze N, Dubnau D. 2013**. Chance and Necessity in *Bacillus subtilis* Development. *Microbiology Spectrum* 1
110. **Moir A, Corfe BM, Behravan J. 2002**. Spore germination. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:403-409
111. **Moir A. 2006**. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology* 101:526-530.

Référence bibliographique

112. **Moltz A. G. and Martin S. E. (2005).** Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *J. Food Prot.* **68**:92–97.
113. **Momtaz, H., Tajbakhsh, E., Rahimi, E., Momeni, M., 2011.** Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis in Isfahan and ChaharmahalvaBakhtiari provinces of Iran. *Comp. Clin. Pathol.* **20**,519–522.
114. **Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2011.** Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 1409-1417.
115. **Nicolas G.G., Lavoie M.C. (2011).** *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Revcnmicrobiol.* **57**: 1–20.
116. **O. Ouchar Mahamat¹ , A. Tidjani² , A. Savadogo¹ , A. Abakabir Mahamat¹ , M. K. Somda¹ , A. S. Traore¹ .** Isolement Et Caracterisation Des Bacteries Productrices Des Biofilms Issues Des Produits Alimentaires *Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 7, N°2, p : 187-210
117. **O’Toole G.A., Kolter R. (1998b).** Initiation of biofilm formation in *pseudomonasfluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis, *Mol. Microbiol.* **28**: 449- 61.
118. **OHYE.D.F AND MURRELL.W.G.1973.** Exosporium and Spore Coat Formation in *Bacillus cereus*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY.* **115**, No. 3. p. 1179-1190.
119. **Oliveria K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M., Oliveira R. 2006.** Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella Enteritidis* Serotypes to materials 317 used in Kitchens. *Journal of food Protection*, **69**, 2352-2356.
120. **O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., et al. (2008).** A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology*, **190**(11), 3835-3850.

Référence bibliographique

121. **Oosthuizen M. C., B. Steyn, J. Theron, P. Cosette, D. Lindsay, A. von Holy, V. S.Brözel. 2002.** Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* during Biofilm Formation. *Applied and environmental microbiology*, 68: 2770.
122. **Otto, M. (2008).** Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 207-228.
123. **Otto, M. 2012.** MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.* **14**: 1513-1521.
124. **Pakar S.G., Flint S.H., Palmer J.S., Brooks J.D. 2001.** Factors influencing attachment of *thermophilic bacilli* to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 901-908.
125. **Paredes-Sabja D, Sarker MR. 2011.** Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe* 17:78-84
126. **Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. 2014.** *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology* 22:406-416.
127. **Peng J.S., W. C. Tsai, and C.C. Chou. 2001.** Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International journal of food microbiology* 65: 105-111
128. **Perrin, C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I -Claude Bernard, France.
129. **Peters, P.J., Brooks, J.T., McAllister, S.K., Limbago, B., Lowery, H.K., Fosheim, G., Guest, J.L., Gorwitz, R.J., Bethea, M., Hageman, J., Mindley, R., 2013.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of the groin and risk for clinical infection among HIV-infected adults. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (4), 623–629.
130. **Piggot PJ, Hilbert DW. 2004.** Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 7:579-586.

Référence bibliographique

131. **Pratt L. A., R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30 : 285–293.
132. **Pumirat P., M. Vanaporn, Boonyuen, N. Indrawattana, A. Rungruengkitkun, N. Chantaratita.** Effets du chlorure de sodium sur la résistance à la chaleur, la susceptibilité à l'oxydation, la motilité, le biofilm et la formation de plaques de *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiologie ouverte*.00493.
133. **Rahmati T, Labbe R.** Niveaux et toxigénicité de *B. cereus* et de *Clostridium perfringens* dans les fruits de mer vendus au détail. *J Food Prot.* 2008; 71 (6): 1178-1185
134. **Ranieri ML., J.R. Huck M. Sonnen, D.M. Barbano, K.J. Boor.** 2009. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92 (10): 4823-32.
135. **Reen, F.J.(2019).** Microbial Biofilm Reference Module in Life Science.1-9.
136. **Renner L.D., Weibel D B.** 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bull/Mater Research Soc.* 36: 347–355.
137. **Rinaudo CD, Rosini R, Galeotti CL, Berti F, Necchi F, Reguzzi V, Ghezzi C, Telford JL, Grandi G, Maione D.** (2010). Specific Involvement of Pilus Type 2a in Biofilm Formation in Group B *Streptococcus*. *PLoS ONE* 5(2) : e9216.
138. **Rode T. M., Solveig L., Askild H. and Trond M.** (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Inter. J. Food. Microbiol.* 116: 372–383.
139. **Romling U., Sierralta W.D., Eriksson K., Normark S.** (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol*; 28: 249-64.
140. **Rubio C., Costa D., Bellon-Fontaine M.N., Relkin P., Pradier C.M., Marcus P.** 2002. Characterisation of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304

Référence bibliographique

- stainless steel, consequences for the *Pseudomonas Fragi* K1 adhesion. *Colloids and surfaces B*, 24, 332 193-205.
141. **Rupp C. J., Fux C. A., Stoodley P. 2005.** Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2175– 2178.
142. **Ryu J.H., H. Kim, J.F. Frank and L.R. Beuchat (2004).** Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production, *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**: 359- 362.
143. **S. Tsuneda , H. Aikawa , H. Hayashi , A. Yuasa , A. Hirata.** Substances polymères extracellulaires responsables de l'adhérence bactérienne sur une surface solide FEMS Microbiol. Lett. , 223 (2) (2003) , p. 287 – 292
144. **Saitou, K., Furuhashi, K., Kawakami, Y. and Fukuyama, M. (2009).** Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science*, 14: 65-68.
145. **Sauer K. 2003.** The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4:219
146. **Savadogo A., C. A. T. Ouattara, P. W. Savadogo, N. Barro, A. S. Ouattara, A. S. Traoré (2004).** Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *Afri. J. of Biotech.* **3 (3)**: 189-194.
147. **Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR. 2014.** Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atropheus*. *Microbiological Research* 169:931-939.
148. **Setlow B, Cowan AE, Setlow P. 2003.** Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* **95**:637-648.
149. **Setlow P. 2013. Summer meeting 2013 – when the sleepers wake: the germination of spores of Bacillus species.** *Journal of Applied Microbiology* 115:1251-1268.
150. **Setlow P. 2014.** Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* 2.

Référence bibliographique

151. **Setlow P.** 2015. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *Journal of Bacteriology* **196**:1297-1305.
152. **Setlow, P., 2006.** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
153. **Shi X. and Zhu X. (2009).** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* **20**: 407–413.
154. **Silagyi K., Kim S.H., Lo Y.M. and Wei C.I. (2009).** Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiology* **26**: 514-519.
155. **Simões M., Bennett R. N., Rosa E. A. S. 2009.** Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports.* **26**: 746–757.
156. **Simões M., Simões L. C., Machado I., Pereira M. O., Vieira M. J. 2006.** Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing.* **84**: 338–345.
157. **Somers, E. B., & Wong, A. C. (2004).** Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *Journal of Food Protection,* 67, 2218–2229.
158. **Speranza, B.,& Corbo, M.R.(2017).**The impact of Biofilm on Food Spoilage.The Microbiological Quality of Food, 259_282.
159. **Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001).** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology,*183, 6746-6751.
160. **Spormann, A. M. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology,* 322:17-36.
161. **Srey S., I.K. Jahid, S.D. Ha. 2013.** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food control,* 31: 572-585.

Référence bibliographique

162. **Stanley, N. R., R. A. Britton, A. D. Grossman and B. A. Lazazzera (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology* 185(6): 1951-1957.
163. **STENFORS ARNESEN, L., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. 2008.** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 579 - 606.
164. **Stepanovic S., Dragana V., Veronika H., Giovanni D. B., Sodanka D., Ivana I. and Filip R.(2007).** quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci *apmis* **115**: 891–9.
165. **Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.; Vlahovic M S. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40: 175–179.
166. **Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187–209 (2002)
167. **Sutherland, I. W.** (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol.*,147: 3-9.
168. **Szlavik J, Paiva DS, Mork N, van den Berg F, Verran J, Whitehead K, Knochel S, Nielsen DS:** Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. *Int J Food Microbiol* 2012, 152:181-188.
169. **Takahashi H., Satoko M., Igarashi K., Suda T., Kuramoto S. and Kimura B. (2009).** Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. *J Food Prot* **72**:1476–80.
170. **Talukdar PK, Olguín-Araneda V, Alnoman M, Paredes-Sabja D, Sarker MR. 2015.** Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology* 166:225-235.

Référence bibliographique

171. **Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., Cutting, S.M., 2006.** The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology* 188, 2692-2700.
172. **Tan IS, Ramamurthi KS. 2014.** Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports* 6:212-225.
173. **Taponen, S., Pyörälä, S., 2009.** Coagulase-negative staphylococci as cause of bovinemastitis-not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 134 (1–2),29–36.
174. **Teixeira P., Silva S., Araújo F., Azeredo J., Oliveira R. 2007.** Bacterial Adhesion to FoodContacting Surfaces. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pp 13-20.
175. **Tenke P., Kovacs B., Jackel M. et Nagy E.(2006).**The role of biofilm infection inurology. *World J Urol*24,13-20.
176. **Thormann, K. M., Duttler, S. A., Saville, R., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y. & Spormann, A. M. (2006).** Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR- 1 biofilms by cyclic- di- GMP. *Journal of Bacteriology*, 188(7):2681-2691.
177. **Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelman R.E., Actis, L.A. (2003).** Attachment to andbiofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novelchaperone-usher pili assembly system. *Microbiology.* 149: 3473-3484.
178. **Tremblay.Y.D.N, Hathroubi.S, et Jacques.M. 2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique.*Revue Canadienne de recherche vétérinaire.*78(2) :110-116.
179. **Van Houdt R, C.W. Michiels. 2005.** Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Appl Microbiol.*, 109:1117-31..
180. **Vestby LK, Johannesen KCS, Witso IL, Habimana O, Scheie AA,Urdahl AM,Benneche T, Langsud S,Nesse LL :**Synthetic, brominated furanone F202 prevents

Référence bibliographique

- biofilmformation by potentially human pathogenic Echerichia Coli O103 :H2 and Salmonella ser. Agona on arabiotic surfaces . Jappl.Microbiol 2014, 116:258-268.
181. **Victoria O. A. and Tajudeen O. I. (2011).** Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on Wood, Steel and Glass Surfaces. *Global Vet.* **6 (1):** 06-10.
182. **Vijayabaskar P., S. Babinastarlin, T. Shankar, T. Sivakumar and K.T.K. Anandapandian (2011).** Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). *Advances in Biol. Res.* **5 (2):** 71-76.
183. **Vilas-Boas,L.A.,Vilas-Boas,G.F.,Saridakis,H.O.,Lemos,M.V.,Lereclus,D., andArantes,O.M.(2000).**Survivalandconjugationof *Bacillusthuringiensis* inasoilmicrocosm. *FEMS Microbiol .Ecol.* 31,255–259.doi:10.1016/S0168
184. **Vincenot, F., M. Saleh et G. Prévost. 2008.** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Fr. Labo.* **407:** 61-69. **Vincenot, F., M. Saleh et G. Prévost. 2008.** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Fr. Labo.* **407:** 61-69.pouvoir de s. aureus.
185. **Vivas J., Padilla D., Real F., Bravo J., Grasso V., Acosta F. (2008).**Influence ofenvironmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet Microbiol.* 129:150-5.
186. **Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW. 2000.** Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407:897-900.
187. **Whitehead, K. A., & Verran, J. (2015).** Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 2, 84–91. doi:10.1016/j.cofs.2015.02.003.
188. **Wijman, J. G. E., De Leeuw, P. P. L. a, Moezelaar, R., Zwietering, M. H., &Abee, T. (2007).** Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1481–1488.
189. **Wong A.C.I. 1998.** Biofilm in food processing environments. *Journal Dairy Science*, 81,27652770.

Référence bibliographique

190. **Yahaya SYLLA . 2011.** Nettoyage en place des lignes agro-industrielles : Etude Cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires. thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). 192.210
191. **Yildiz, F. H., X. S. Liu, A. Heydorn and G. K. Schoolnik (2004).** Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Molecular Microbiology* 53(2): 497-515.
192. **Yong L, Malabendu J, Thanh TL, Chia YL. (2004).** Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 186 (3) : 722-729.
193. **Youwen P., Frederick B. Jr. and Lisa G. (2010).** Synergistic Effects of Sodium Chloride, Glucose, and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *APPL. Environ. Microbiol.* **76 (5):** 1433–1441.
194. **Zhao, Y., M. P. M. Caspers, K. I. Metselaar, P. Boer, G. Roeselers, R. Moezelaar, M. N. Groot, R. C. Montijn, T. Abee, R. Kort.** Abiotic and Microbiotic Factors Controlling Biofilm Formation by Thermophilic Sporeformers *Applied and Environmental Microbiology* p. 5652–5660
195. **Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994.** Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* **23:**125-148.

Annexe

Annexe

Annexe I : les matériels utilisés dans ce travail

1-Matériels

Autoclave, four pasteur, plaque chauffante, vortex, balance électrique de précision, bain marie, étuves électriques à 30°C, 37 °C et à 60°C, microscope optique, réfrigérateur

2- Petites matériels et verreries :

Bec bunsen, portoirs, boîte de pétri, spatules, pinces, ciseaux, anse de platine, papier film, papiers aluminiums, tubes à essai, flacon stérile, bécher, pipettes pasteurs, pipettes graduées, erlenmeyer, éprouvettes, lames et lamelles.

Annexe II : Milieux de cultures et leur préparation :

- ✓ Milieu BHIB est un milieu polyvalent adapté à la culture d'un grand nombre de microorganismes.
- ✓ Milieu gélose nutritive fortifié pour la suspension sporale.
- ✓ Milieu gélose nutritive pour le dénombrement des *Bacillus*.
- ✓ Bouillant nutritive permet la croissance bactérienne.

Annexe III : Composition des milieux des cultures et leur préparation :

1. Composition de BHIB :

protéase-peptone	10,0 g/l
Infusion de cœur de bœuf	5,0 g/l
Infusion de cervelle de veau	12,5 g/l
hydrogénophosphate de sodium	2,5 g/l
Glucose	2,0 g/l
Chlorure de sodium	5,0 g/l
PH	7,4

1.1. Préparation :

37 g par litre, on dépose 5ml dans des tubes d'essai, stérilisation par l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

2. Composition de gélose nutritive (GN) :

Extrait de viande	1 ,0g/l
Extrait de levure	2,5 g/l
Peptone	5,0 g/l
Chlorure de sodium	5,0 g/l
Agar	15 g/l
Ph	7,0

2.1. Préparation :

28 g pour 1 litre d'eau stérile, stérilisation par l'autoclave à 121 pendant 15 min.

3. Composition de la gélose nutritive fortifiée :

Extrait de viande	1 ,0g/l
Extrait de levure	2,5 g/l
Peptone	5,0 g/l
Chlorure de sodium	5,0 g/l
Agar	15 g/l
MnSo4	50 mg/l
CaCl2	60 mg/l
Ph	7,0

3.1. Préparation :

28 g pour 1 litre d'eau stérile avec l'ajoute de 50 mg/l de MnSo4 et 60 mg/l de CaCl2, stérilisation par l'autoclave à 121 pendant 15 min.

4. Composition de BrainHeart Infusion Agar (BHIA) :

Mélange de peptone	10,0g
infusion de cœur de bœuf	10,0g
Infusion de cerveau de veau	7,50g
Dextrose	2,0g
Phosphate disodique	2,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar bactériologique	15,0g
PH	7,4

5. Composition de PBS :

NaCL	7,6g
Kcl	0.2g
K ₂ HPO ₄	0,71g
NaHPO ₄	0,245g

5.1. Préparation :

Pour 1 litre d'eau distillé, stérilisation par autoclave à 121°C pendant 15 min.

6. Composition de Baird-Parker :

Tryptone	10,0g
Extrait de viande de bœuf	4,0g
Extrait de levure	2,0g
Pyruvate de sodium	10,0g
Glycocolle	12,0g
Chlorure de lithium	5,0g
Agar	20,0g
PH	6,8

6.1. Préparation :

63g par litre, agiter lentement, jusqu'à dissolution complète, répartir en flacons, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

ملخص:

تطوير الأغشية الحيوية بواسطة البكتيريا المسببة للأمراض من أصل الغذاء هو مشكلة في صناعة المواد الغذائية. في العمل الحالي تم اختبار 31 سلالة من *B.cereus* و *S.aureus* وكان تشكيل البيوفيلم من الكونغو الأحمر أجار، مقياس صفيحة الفولاذ المقاوم للصدأ ضعيفة، على التوالي. تمكنت بعض السلالات من بين 20 من العصيات العصوية المدروسة من تكوين بيوفيلم ضعيف، والبعض الآخر غير قادر، وكانت سلالات المكورات العنقودية الذهبية الإحد عشر قادرة على تشكيل بيوفيلم ضعيف إلى متوسط بعد 24 و 48 و 72 ساعة. من ناحية أخرى، تم تقييم تأثير الجلوكوز وكلوريد الصوديوم جنباً إلى جنب مع درجة الحرارة، مما أدى بنا إلى استنتاج أن تكوين الغشاء الحيوي يزداد عندما يزداد تركيز الجلوكوز، لكن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم. يسبب انخفاض في ذلك.

الكلمات المفتاحية: بيوفيلم، باسيلوس سيربيوس، المكورات العنقودية الذهبية، الجلوكوز، كلوريد الصوديوم، درجة الحرارة.

Résumé :

Le développement de biofilms par des bactéries pathogènes d'origines alimentaires constitue une problématique dans l'industrie agroalimentaire. Dans le présent travail 31 souches de *B.cereus* et *S.aureus* ont été testées. . La formation de biofilms par la méthode Gélose Rouge Congo, dosage sur microplaque et sur l'acier inoxydable était respectivement faible. Certaines souches parmi les 20 étudiées de *Bacillus cereus* ont été capable de former des faibles biofilm, certaines d'autres sont incapables, Les 11 souches de *staphylococcus aureus* ont été capable de former des biofilm faible à modérés après 24, 48 et 72h d'incubation. . D'autre part, l'effet du glucose et du NaCl combiné à la température a été évalué ce qui nous a permis de conclure que la formation de biofilm augmente lorsque la concentration du milieu en glucose augmente, mais l'augmentation de la concentration du NaCl provoque une diminution de celui-ci.

Mots clés : Biofilm, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, glucose, NaCl, température.

Abstract

The development of biofilms by pathogenic bacteria of food origin is a problem in the food industry. In the present work 31 strains of *B.cereus* and *S.aureus* were tested. Biofilm formation by Congo Red Agar, microplate assay and stainless steel was weak, respectively. Some strains among the 20 studied *Bacillus cereus* were able to form weak biofilm, some others are unable, The 11 *staphylococcus aureus* strains were able to form weak to moderate biofilm after 24, 48 and 72h incubation. . On the other hand, the effect of glucose and NaCl combined with the temperature was evaluated, which led us to conclude that the formation of biofilm increases when the concentration of glucose medium increases, but the increase of NaCl concentration increases. causes a decrease in it.

Key words: Biofilm, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, glucose, NaCl, temperature.