

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

RAHMOUN Manel

KHELIL Selma

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biologie, Option : Microbiologie fondamentale

Thème

**Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm
par *Klebsiella pneumoniae***

Soutenu le **25/06/2023**, devant le jury composé de :

Président

Mr. BARKA Mohamed Salih

Pr U. Tlemcen

Examinatrice

Mme. BELLIFA Samia

MCA U. Tlemcen

Promotrice

Mme. CHERIF ANTAR Asmaa

MCB U. Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant tout, on remercie le Bon Dieu le Tout Puissant, de nous avoir donné la force, la volonté et la patience de pouvoir mener à bien ce modeste travail et l'achever malgré les diverses difficultés des circonstances vécues.

*En seconde lieu, on tient à remercier notre chère promotrice **Mme CHERIF ANTAR Asmaa** maitre de conférences classe B à l'université ABOU BAKR BELKAID Tlemcen, pour ses précieux conseils, sa confiance et son aide durant toute la période du travail.*

*Nos vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par **Mr BARKA Mohamed Salih** Professeur à l'université ABOU BAKR BELKAID Tlemcen, qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.*

*A **Mme BELLIFA Samia** maitre de conférences classe A à l'université ABOU BAKR BELKAID Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

Nos profonds remerciements vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant notre parcours universitaire, à tous nos camarades de la spécialité Microbiologie Fondamentale, et les personnes qui nous ont aidé et contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

Enfin, on remercie l'ensemble du personnel du laboratoire de l'Institut des Sciences et Techniques Appliquées (ISTA), et du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

A mes chers parents.

A ma chère mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous ses sacrifices et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A mon cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être.

A mes chères et adorables sœurs, au témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance.

A mes tantes, pour leurs encouragements.

A mon binôme Manel, avec qui j'ai tous partagé, du bon et du mauvais, et à qui je souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A tous mes camarades, avec qui j'ai passé de bons comme de mauvais moments mais qui reste tout de même des moments inoubliables.

A mes très chères copines, Lina, Manel, Sonia, Romaiissa.

Selma

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

A mes chers parents, pour leur soutien, les sacrifices, et tous les efforts consentis pour mon éducation et ma formation. Je tiens à vous témoigner ma reconnaissance et mon profond amour. Que dieu, le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur.

A mes chers grands-parents, que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessés de formuler dans vos prières. Puisse ALLAH vous préserver santé et longue vie.

A mes chers frères, je vous souhaite le meilleur dans tous vos projets futurs avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon binôme Selma, pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet. Fière et heureuse d'avoir construit cette amitié avec toi.

A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller et m'encourager.

Manel

ملخص

البيوفيلم عبارة عن هياكل ميكروبية معقدة تتشكل عندما تلتصق مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة بسطح وتغطي نفسها بمصفوفة واقية. يمكن أن يكون تكوين البيوفيلم مشكلة في صناعة الأغذية لأن هذه الهياكل تعزز تلوث المنتجات بمسببات الأمراض وعوامل التلف. تركز هذه الدراسة على تأثير مصادر الكربون على تكوين البيوفيلم في صناعة الألبان. كان الهدف هو تقييم قدرة ثلاث سلالات من *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من خطوط ما بعد بسترة الحليب الخام لتشكيل أغشية حيوية في وجود سكريات مختلفة (اللاكتوز والجلوكوز والجالاكتوز). تضمنت المنهجية حضانة سلالات بتركيزات مختلفة من السكريات وتقييم تكوين البيوفيلم في فترات زمنية محددة. أظهرت النتائج أن السكريات لها تأثيرات متغيرة على تكوين الأغشية الحيوية، اعتمادًا على السلالة وفترة الحضانة. فضل اللاكتوز تكوينًا أوليًا عاليًا للأغشية الحيوية، مما يشير إلى دوره الغالب في ظروف إنتاج الحليب. ومع ذلك، بعد 24 ساعة من الحضانة، وجد أن الجلوكوز هو محفز للأغشية الحيوية لجميع السلالات. في الختام، تسلط هذه الدراسة الضوء على أهمية النظر في مصادر الكربون في صناعة الألبان، لأنها تؤثر على تكوين الأغشية الحيوية. سيساعد فهم هذه التفاعلات في تطوير استراتيجيات التحكم للحفاظ على جودة الأغذية وسلامتها في هذه الصناعة.

الكلمات المفتاحية : *Klebsiella pneumoniae*, البيوفيلم, مصدر الكربون, صناعة الألبان .

Résumé

Les biofilms sont des structures microbiennes complexes qui se forment lorsqu'un groupe de microorganismes adhèrent à une surface et se recouvrent d'une matrice protectrice. La formation de biofilms peut être problématique dans l'industrie alimentaire car ces structures favorisent la contamination des produits par des agents pathogènes et d'altération. Cette étude se focalise sur l'influence des sources de carbone sur la formation de biofilms dans l'industrie laitière. L'objectif était d'évaluer la capacité de trois souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des lignes de post-pasteurisation du lait cru à former des biofilms en présence de différents sucres (lactose, glucose et galactose). La méthodologie comprenait l'incubation des souches avec différentes concentrations de sucres et l'évaluation de la formation de biofilms à des intervalles de temps spécifiques. Les résultats montrent que les sucres ont des effets variables sur la formation de biofilms, en fonction de la souche et de la durée d'incubation. Le lactose a favorisé une formation initiale élevée de biofilms, indiquant son rôle prépondérant dans les conditions de production laitière. Toutefois, après 24 heures d'incubation, le glucose s'est avéré l'inducteur le plus significatif de biofilms pour toutes les souches. En conclusion, cette étude souligne l'importance de prendre en compte les sources de carbone dans l'industrie laitière, car elles influencent la formation de biofilms. Comprendre ces interactions permettra de développer des stratégies de contrôle pour maintenir la qualité et la sécurité alimentaire dans cette industrie.

Mot clés : *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, source de carbone, l'industrie laitière.

Abstract

Biofilms are complex microbial structures that form when a group of microorganisms adhere to a surface and are covered by a protective matrix. The formation of biofilms can be problematic in the food industry as these structures promote contamination of products by pathogens and spoilage agents. This study focuses on the influence of carbon sources on biofilm formation in the dairy industry. The objective was to evaluate the ability of three strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from post-pasteurization lines of raw milk to form biofilms in the presence of different sugars (lactose, glucose, and galactose). The methodology involved incubating the strains with different concentrations of sugars and assessing biofilm formation at specific time intervals. The results show that sugars have varying effects on biofilm formation, depending on the strain and incubation time. Lactose favored high initial biofilm formation, indicating its predominant role in dairy production conditions. However, after 24 hours of incubation, glucose emerged as the most significant inducer of biofilms for all strains. In conclusion, this study highlights the importance of considering carbon sources in the dairy industry as they influence biofilm formation. Understanding these interactions will enable the development of control strategies to maintain quality and food safety in this industry.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, carbon source, dairy industry.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Généralités sur les biofilms	3
1.1 Historique	3
1.2 Définition	4
1.3 Structure et composition des biofilms	5
1.4 Le cycle de formation du biofilm	6
1.4.1 Adhésion initiale réversible	7
1.4.2 Adhésion irréversible	8
1.4.3 Formation de microcolonies	8
1.4.4 Maturation du biofilm	8
1.4.5 Détachement du biofilm	8
1.5 Les biofilms dans l'industrie laitière	10
Chapitre 2 : Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
2.1 Définition	12
2.2 Taxonomie	12
2.3 Habitat	13
2.4 Caractères morphologiques	13
2.5 Caractères culturels	13
2.6 Caractères biochimiques	14
2.7 Pouvoir pathogène	14
2.7.1 Capsule	14
2.7.2 Fimbriae (pili)	15
2.7.3 Lipopolysaccharides (LPS)	15
2.7.4 Sidérophores	16
2.8 Les biofilms à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Chapitre 3 : Les facteurs influençant la formation du biofilm	19
3.1 Les facteurs liés à l'environnement	19
3.1.1 pH	19

3.1.2	Température	20
3.1.3	Présence de nutriments	20
3.1.4	Concentration en oxygène	21
3.1.5	Effets hydrodynamiques	22
3.2	Les facteurs liés aux microorganismes	23
3.2.1	La production d'exopolysaccharides (EPS)	23
3.2.2	La présence de flagelles et de fimbriae	23
3.2.2.1	Flagelles	23
3.2.2.2	Fimbriae	24
3.2.3	L'hydrophobicité de la surface de la cellule	24
3.3	Les facteurs liés aux surfaces	25
3.3.1	La composition chimique de la surface solide	25
3.3.2	La topographie et rugosité de la surface	25
3.3.3	L'énergie de surface et degré d'hydrophobie	26

Partie 2 : Matériel et méthodes

1.	Origine des souches	27
2.	Revivification des souches	27
3.	Observation microscopique	27
4.	Conservation des souches	28
4.1	Conservation à court terme	28
4.2	Conservation à long terme	28
5.	Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
5.1	Préparation de la suspension bactérienne	28
5.2	Formation du biofilm par <i>K. pneumoniae</i>	28
5.2.1	Protocol	28
5.2.2	Quantification des biofilms formés	29

Partie 3 : Résultats et discussion

1.	Observation microscopique des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
1.1	Aspect macroscopique	30
1.2	Aspect microscopique	30
2.	Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31

2.1 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-75	31
2.2 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-63	33
2.3 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-90	33
3. Discussion	35
Conclusion	40
Références bibliographiques	42

Liste des abréviations

µl	:	Microlitre
ADNr	:	Acide DésoxyriboNucléique Ribosomique
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	:	Acide RiboNucleique
ARNr	:	Acide ribonucléique ribosomique
ARDRA	:	Analyse des fragments de Restriction de l'ADN Ribosomique Amplifié
Aw	:	Activité de l'eau
ADH	:	Arginine Di-Hydrolase
BGP	:	Pourpre de BromoCresol
BHIB	:	Bouillon Coeur- Cerveille Infusion
BN	:	Bouillon Nutritif
CV	:	Cristal Violet
CRE	:	Entérobactéries Résistant aux Carbapenemes
CIT	:	Citrate
Ca²⁺	:	Calcium
CAUTI	:	Infections des Voies Urinaires Associées aux Cathéters
DO	:	Densité Optique
EDS	:	Eau Distillée stérile
Eh	:	Potentiel d'oxydoréduction
EPS	:	ExoPolySaccharides
ESKAPE	:	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa et Enterobacter spp</i>
ECDC	:	Centre Européen de prévention et de Contrôle des Maladies
GI	:	Gastro- Intestinal
H₂S	:	Sulfure d'Hydrogène
IND	:	Indole
LDC	:	Lysine DéCarboxylase
LPS	:	LipoPolySaccharides
LAB	:	Bacteries Lactique
mV	:	MilliVolt

mg/ml	:	Milligramme par millilitre
mm/s	:	Millimètre par seconde
ml	:	Millilitres
mM	:	MilliMolaire
nm	:	Nanomètre
NaCl	:	Chlorure de sodium
NEP	:	Nettoyage En Place
ONPG	:	Ortho-Nitrophényl-β GalactoPyranoside
ODC	:	Ornithine-DéCarboxylase
pH	:	Potentiel d'Hydrogène
PTFE	:	PolyTétraFluoroEthylène
RAPD-PCR	:	Amplification aléatoire d'ADN Polymorphe- Réaction en Chaîne par Polymérase
rpm	:	Nombre de tours par minute
Spp	:	Plusieurs espèces
SGB	:	Streptococcus du Groupe B
TLR4	:	Recepteurs de type Toll Like 4
TDA	:	Tryptophane DésAminase
UFC/ml	:	Unites Formant Colonie par millilitre
UTIs	:	Infections du Tractus Urinaires
VP	:	Réaction de Voges Proskauer

Liste des figures

Figure 1 : Visualisation du biofilm par microscopie électronique à balayage.	4
Figure 2 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien.	5
Figure 3 : Structure et composants d'un biofilm.	6
Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien.	7
Figure 5 : Principales interactions bactéries/surfaces impliquées dans l'adhésion bactérienne.	7
Figure 6 : Représentation schématique des différentes formes de détachement d'un biofilm mature.	9
Figure 7 : Les facteurs de virulence chez les souches classiques et hypervirulente de <i>K. pneumoniae</i>	16
Figure 8 : Microscopie électronique à balayage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sessiles dans un biofilm mature formé sur des lames thermanox dans un système de micro-fermenteur après 48 heures à un grossissement de 20000 fois.	17
Figure 9 : Principaux facteurs affectant la formation de biofilm.	19
Figure 10 : Les étapes de l'étude de la source de carbone sur la formation de biofilm par <i>K. pneumoniae</i>	29
Figure 11 : Aspect morphologique de la souche lamaabe4-75 de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu Mac conkey.	30
Figure 12 : Observation microscopique de <i>K. pneumoniae</i> (Grossissement*100).	30
Figure 13 : Quantification de la formation de biofilm (D0 _{596nm}) par la souche lamaabe4-75 à 37°C sous différentes concentrations en sucres.	32
Figure 14 : Quantification de la formation de biofilm (D0 _{596nm}) par la souche lamaabe4-63 à 37°C sous différentes concentrations en sucres.	33
Figure 15 : Quantification de la formation de biofilm (D0 _{596nm}) par la souche lamaabe4-90 à 37°C sous différentes concentrations en sucres.	34

Introduction

La formation de biofilms par les micro-organismes est un phénomène commun dans les industries alimentaires, notamment l'industrie laitière (**Liu et al., 2023**). Le biofilm est un assemblage de cellules microbiennes associées de manière irréversible à une surface et enfermées dans une matrice de substance polymérique extracellulaire (**Donlan, 2002**). Ces biofilms sont un défi pour les industries alimentaires, car les microorganismes qui les composent peuvent adhérer à une gamme de surfaces, notamment le caoutchouc, le polypropylène, le polystyrène, le plastique, le verre, l'acier inoxydable et d'autres nombreux matériaux de surface en contact avec les aliments (**Olanbiwoninu et Popoola, 2023 ; Abdallah et al., 2014**). Ils sont responsables de la détérioration des aliments et de maladies d'origine alimentaire, ainsi que des dommages causés aux équipements de transformation des aliments (**Cirkovic, 2021**).

La formation de biofilms dépend de nombreux facteurs dans l'industrie laitière, parmi ces facteurs la composition du lait y compris le lactose qui peut affecter l'adhésion bactérienne et par conséquent favoriser la formation de biofilm (**Alonso et al., 2022 ; Xue et al., 2014**). Il est donc essentiel de bien comprendre les facteurs favorisant leur développement ou leur croissance, pour pouvoir les éliminer car il est bien connu que les produits laitiers sont très sensibles à la contamination par les biofilms et il est difficile d'éliminer ces microorganismes (**Carrascosa et al., 2021 ; Srey et al., 2013**).

Un nombre considérable de travaux a été publié sur la persistance de certains agents pathogènes d'origine alimentaire sur les surfaces en contact avec les aliments en mode biofilm, affectant la qualité et la sécurité des produits alimentaires (**Satpathy et al., 2016**). *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie qui a déjà été associée à des biofilms installés en industrie laitières (**Cherif-Antar et al., 2016**).

L'objectif de la présente étude est d'étudier l'impact de différentes sources de carbone couramment rencontrées dans l'industrie laitière, à savoir le lactose, le glucose et le galactose, sur la formation de biofilms par *K. pneumoniae*, isolée à partir des lignes de post-pasteurisation de production de lait cru.

Ce mémoire sera scindé en trois parties :

1. La première partie sera consacrée à une synthèse bibliographique (englobant des généralités sur les biofilms et sur *K. pneumoniae* ainsi que les facteurs influençant la formation du biofilm).
2. La seconde partie présentera une description de la méthodologie envisagée.

3. La dernière partie comportera une présentation des résultats obtenus et leur discussion.

Ce travail sera clôturé par une conclusion et des perspectives qui pourront ouvrir de nouveaux axes de recherches.

PARTIE 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les biofilms

1.1 Historique

L'observation de micro-organismes agrégés entourés d'une matrice autoproduite adhérant à des surfaces ou situés dans des tissus est aussi ancienne que la microbiologie (**Høiby, 2014**).

La première description des biofilms remonte à 1684, lorsque Anthony van Leeuwenhoek, l'inventeur du microscope, a vu des agrégats microbiens à partir d'un prélèvement buccal en fait rapport à la Royal Society de Londres. Il a décrit cette croissance comme des «animalcules» (animaux microscopiques) (**Chandki et al., 2011 ; Donlan et Costerton, 2002**). Dans ses observations, il a noté que le nombre de ces animalcules dans la plaque dentaire d'un homme était si élevé qu'il croyait dépassant le nombre d'hommes dans un royaume (**Mogha et al., 2014**). C'est la première déclaration officielle reportant l'existence de biofilm (**Sauer et al., 2007**). Cependant, la compréhension scientifique des biofilms s'accélère lentement jusqu'au 20^{ème} siècle (**Høiby, 2017**).

En 1933, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henrici observa, fixées sur ces lames, des communautés bactériennes (**Costerton, 2004**). Il émit alors l'hypothèse qu'il est tout à fait évident que, pour la plupart, les bactéries de l'eau ne sont pas des organismes flottants librement, mais qu'elles se développent fixées sur des surfaces immergées (**Høiby, 2017**). Le concept « biofilm » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé (**Costerton, 2004**).

Heukelekian et Heller ont observé « l'effet bouteille » pour les micro-organismes marins, c'est-à-dire que la croissance et l'activité bactériennes étaient considérablement améliorées par l'incorporation d'une surface à laquelle ces organismes pouvaient se fixer (**Donlan, 2002**).

En 1935, Claude Zobell a remarqué que les bactéries aquatiques étaient plus nombreuses sur les surfaces solides des récipients d'échantillonnage que sous forme de cellules individuelles en suspension (**Hall-Stoodley et al., 2004**).

Mais ce n'est que dans les années 1970 que la masse de bactéries emprisonnées dans une matrice extracellulaire a été clairement observé et décrit grâce à l'apport de John William (Bill) Costerton, considéré comme un pionnier dans ce domaine, et à l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (**Costerton et al., 1978**).

Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations

hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines, présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.). Elles sont appelées biofilms (**Roux et Ghigo, 2006**).

Par la suite, le terme "biofilm" s'est progressivement imposé comme le terme le plus approprié pour décrire la croissance sessile *in vivo* (**Høiby, 2017**).

En 1999, Costerton a publié une première analyse qui décrit le biofilm bactérien ainsi que les premiers processus impliqués dans la formation de cette structure complexe (**Costerton et al., 1999**). Cette publication, qui a depuis été citée près de 14868 fois, expose également les principaux obstacles que la communauté scientifique doit surmonter pour comprendre les mystères du biofilm.

La recherche sur les biofilms a connu une croissance exponentielle, en partie due à la reconnaissance, par les communautés scientifiques, de l'omniprésence des biofilms dans les environnements naturels, industriels et cliniques (**Parsek et Singh, 2003**).

1.2 Définition

Le biofilm est défini comme une communauté structurée de microorganismes englobée dans une matrice autoproduite de substance polymérique extracellulaire (EPS) et adhérente à une surface inerte ou vivante (**figure 1**) (**Costerton et al., 1999**). L'appellation biofilm provient des deux éléments principaux qui constituent cette structure : les microorganismes « bio » et la matrice « film ». Le biofilm fournit aux microorganismes un environnement unique qui les protège des risques environnementaux (**Guilhen, 2017**).

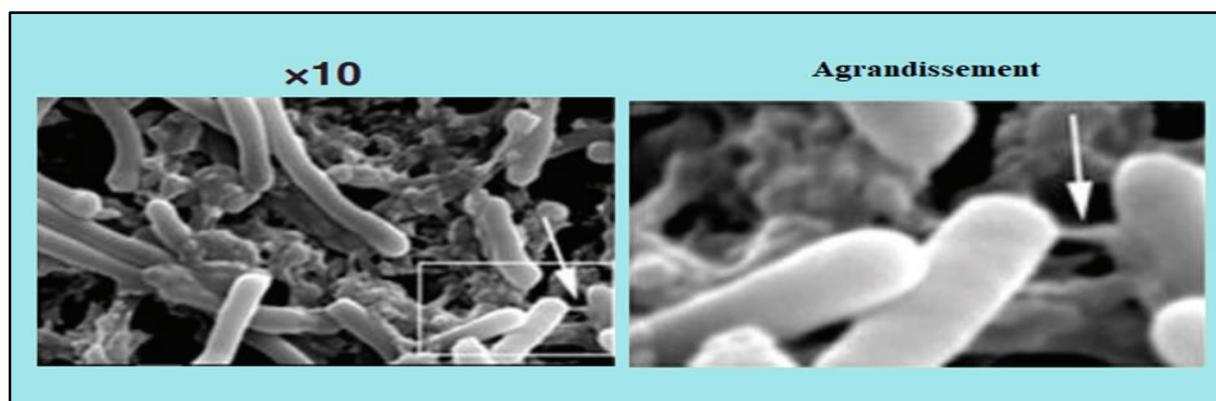


Figure 1 : Visualisation du biofilm par microscopie électronique à balayage (**Dawson et al., 2012**) (la flèche blanche indique les connexions entre les bactéries dans le biofilm âgé de 3 jours).

Les biofilms formés par une seule espèce sont prédominants dans la nature. Cependant, des biofilms polymicrobiens formés par des bactéries, des algues, des champignons et des protozoaires sont également présents dans la nature (Yadav, 2017). De nombreuses espèces microbiennes sont capables de modifier leur mode de vie en fonction de leur état physiologique et des conditions physico-chimiques de leur environnement, profitant de la plus grande disponibilité de matière organique (Balcázar *et al.*, 2015).

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80% de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm (Tremblay *et al.*, 2014).

1.3 Structure et composition des biofilms

Le biofilm est constitué de deux éléments distincts, à savoir la composante microbienne, qui ne représente pas plus de 10 à 15% de la masse, et la matrice qui représente au moins 85 à 90% de la totalité de masse. La structure du biofilm peut donc varier en fonction de la concentration et de la nature de ses composants. La matrice peut former des structures diverses, les plus fréquentes étant de type champignons, avec des canaux permettant la circulation de l'eau (Paolozzi et Liébart, 2015).

La matrice est le matériau extracellulaire, le plus souvent produit par les organismes eux-mêmes, dans lequel les cellules du biofilm sont intégrées. Elle consiste en un conglomérat de différents types de biopolymères appelés substances polymériques extracellulaires (EPS), qui forme l'échafaudage de l'architecture tridimensionnelle du biofilm et qui est responsable de l'adhésion aux surfaces et de la cohésion du biofilm (figure 2) (Flemming et Wingender, 2010).

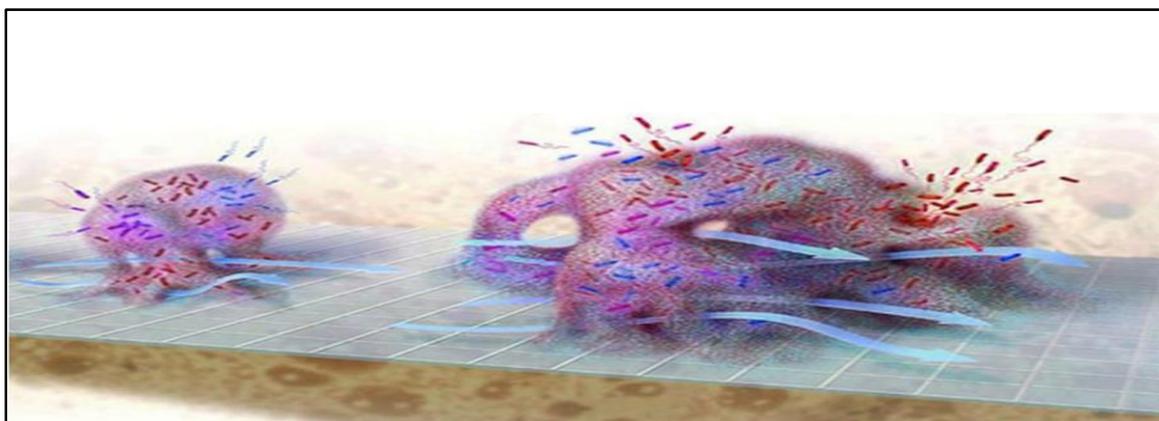


Figure 2 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien (Costerton et Stewart, 2001). (Les flèches bleues représentent le fluide circulant à l'intérieur des canaux hydriques).

La composition de la matrice exopolymérique peut varier en fonction des microorganismes présents, mais aussi de l'environnement physico-chimique (**Paolozzi et Liébart, 2015**). Elle est composée principalement d'eau (jusqu'à 97%), mais également d'un mélange complexe de polymères sécrétés par les bactéries résidentes du biofilm, de nutriments et de métabolites absorbés, de produits de la lyse cellulaire et même de particules issues de l'environnement immédiat du biofilm (**Guilhen, 2017**).

Les polysaccharides extracellulaires sont l'un des principaux composants structurels de la matrice du biofilm (**Lembre et al., 2012**). Elle peut aussi être composée de macromolécules telles que des protéines, l'ADN et l'ARN, des lipides, des phospholipides et d'autres composants cellulaires (**figure 3**) (**Roux et Ghigo, 2006**).

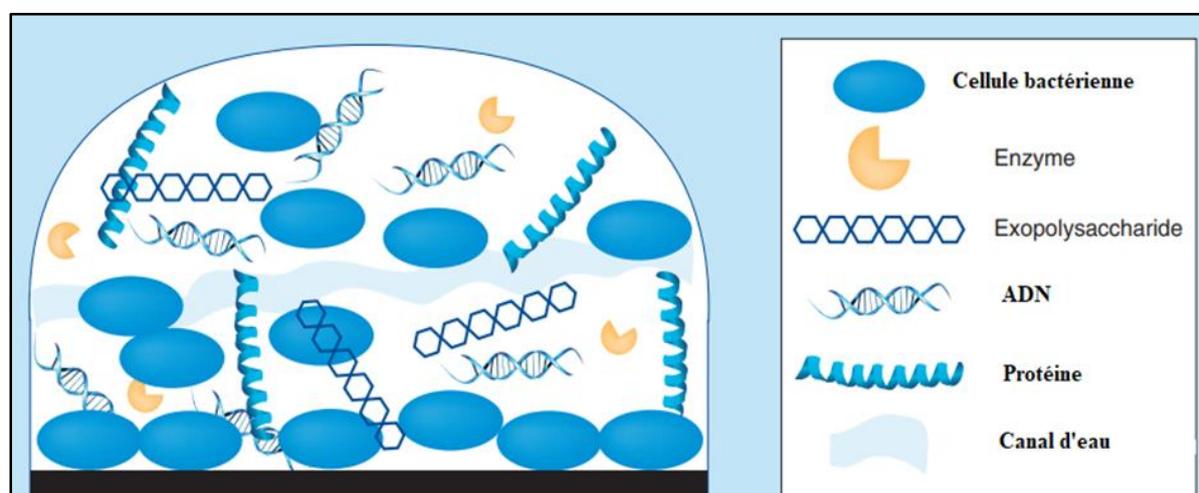


Figure 3 : Structure et composants d'un biofilm (**Rabin et al., 2015**).

1.4 Le cycle de formation du biofilm

La formation de biofilms est un processus de développement qui est initié par des organismes planctoniques formant des agrégats et/ou passant à un mode de vie associé à une surface, et qui fournit aux microorganismes une rigidité architecturale, une protection contre les contraintes environnementales et une matrice pour l'assemblage organisé des communautés microbiennes. Ce processus de développement a été décrit comme un processus séquentiel, hautement régulé, impliquant au moins cinq étapes phénotypiquement distinctes (**figure 4**), chaque étape du développement du biofilm correspondant à des modèles uniques de production de protéines et d'expression de gènes (**Rumbaugh et Sauer, 2020 ; Trego et al., 2020**).

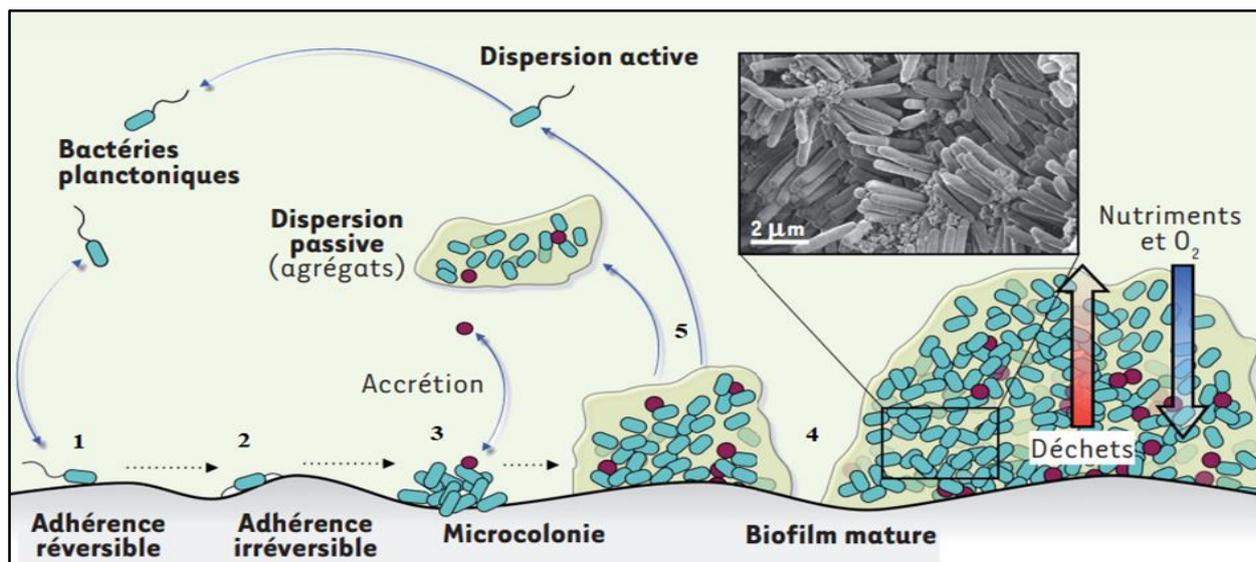


Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

1.4.1 Adhésion initiale réversible : C'est la première étape de la formation du biofilm (Stoodley *et al.*, 2002). Les bactéries planctoniques s'approchent de la surface grâce à la force du flux, à la gravitation ou à leur mobilité intrinsèque (flagelle) (figure 4,1) (Caiazza et O'Toole, 2004). Dans un premier temps, l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries essentiellement des interactions électrostatiques de type van der Waals et des interactions stériques et hydrophobes (figure 5) (Guilhen, 2017). L'attachement initial est réversible et très rapide (de l'ordre de la minute), au cours duquel les bactéries peuvent se détacher et rejoindre la population planctonique si elles sont perturbées par des forces hydrodynamiques (élimination des bactéries de la surface), des forces répulsives ou en réponse à la disponibilité des nutriments (Kostakioti *et al.*, 2013).

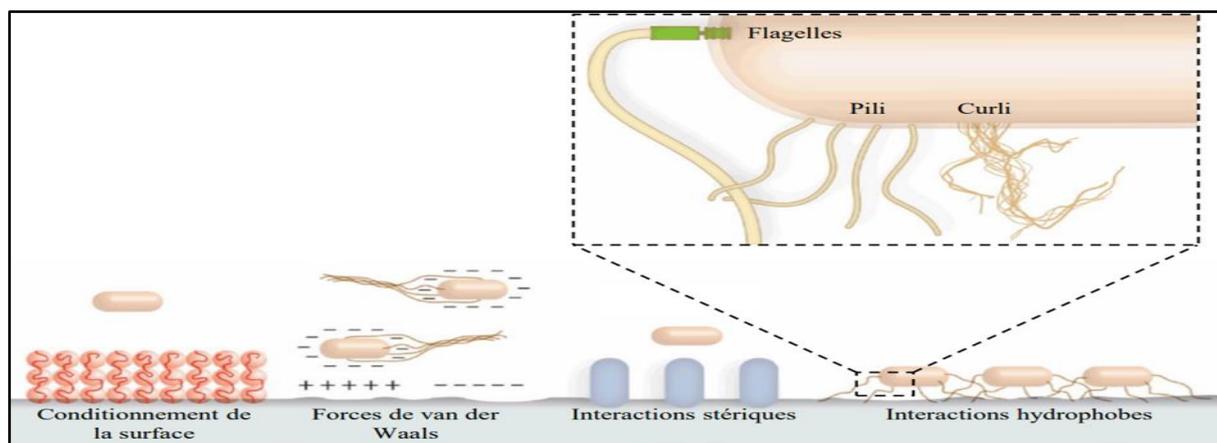


Figure 5 : Principales interactions bactéries/surfaces impliquées dans l'adhésion bactérienne (Tuson et Weibel, 2013).

1.4.2 Adhésion irréversible : La deuxième étape de l'adhésion est la phase d'ancrage ou de verrouillage, et utilise une liaison à médiation moléculaire entre des adhésines spécifiques et la surface. À ce stade, les bactéries faiblement liés consolident le processus d'adhésion en produisant des exopolymères qui se complexent avec des matériaux de surface et/ou des ligands spécifiques aux récepteurs situés sur les pili, les fimbriae et les fibrilles, ou les deux. A l'issue de la deuxième étape, l'adhésion devient irréversible en l'absence d'intervention physique ou chimique, et le microorganisme est solidement fixé à la surface (**figure 4,2**) (**Dunne, 2002**).

1.4.3 Formation de microcolonies : Ces cellules bactériennes attachées de manière irréversible se développent et se divisent en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et le fluide environnant. Elles forment des micro-colonies qui s'agrandissent et fusionnent pour former une couche de cellules recouvrant la surface (**figure 4,3**). Pendant ce temps, les cellules attachées continuent à produire des exopolymères (EPS) qui contribue à l'ancrage des cellules à la surface et stabilise la colonie contre les fluctuations de l'environnement. (**Mogha et al., 2014**).

Une microcolonie est généralement une colonie de cellules bactériennes de trois à cinq couches de profondeur qui évolue à mesure que les cellules bactériennes adhèrent à la surface. Le développement d'interactions stables entre les bactéries individuelles et la surface seule est insuffisant pour former la microcolonie (**Ma et al., 2022**).

1.4.4 Maturation du biofilm : La phase suivante du développement du biofilm est la maturation (**Stoodley et al., 2002**). Durant cette étape, la densité et la complexité globales du biofilm augmentent lorsque les organismes liés à la surface commencent à se répliquer activement jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (**figure 4,4**) (**Dunne, 2002**).

Dans cette architecture complexe, se forment des canaux hydriques, au sein desquelles les flux de nutriments et de déchets sont assurés (**Guilhen, 2017**). À ce stade, le biofilm s'adapte aux conditions extérieures en manipulant sa structure, sa physiologie et son métabolisme (**Dwivedi et Sehgal, 2022**).

1.4.5 Détachement du biofilm : Les micro-organismes qui vivent sous forme de biofilm peuvent bénéficier de ce mode de vie, mais ils peuvent également en souffrir. Les bactéries sessiles doivent faire face à des problèmes tels que la carence en nutriments, l'accumulation de produits métaboliques et les changements environnementaux tels que des variations de température, de pH ou de concentration en oxygène. Pour survivre à ces conditions difficiles, les bactéries peuvent adopter une stratégie consistante à se détacher du biofilm sous forme

individuelle ou en micro-agrégats bactériens (**figure 4,5**), afin de coloniser un nouvel environnement plus favorable. Il existe deux façons de se détacher du biofilm : de manière passive ou active (**figure 6**) (**Guilhen, 2017**).

Le détachement passif implique 4 mécanismes différents : l'érosion, le grazing (broutage), le sloughing (envasement) et l'abrasion (**Guilhen, 2017 ; Davies, 2011**).

Le détachement est considéré comme le principal mécanisme qui limite l'accumulation globale de la biomasse du biofilm et désigne la libération ou la perte passive des particules du biofilm sous l'effet d'une contrainte mécanique ou d'un cisaillement (**Rumbaugh et Sauer, 2020**).

Le détachement actif, appelé dispersion (généralement caractérisée comme le stade terminal du développement du biofilm), est un mécanisme hautement régulé au cours duquel les cellules s'échappent activement du biofilm, laissant derrière elles des biofilms érodés et des biofilms présentant des vides centraux. La dispersion est supposée conduire à la translocation des bactéries vers de nouveaux sites de colonisation (**Rumbaugh et Sauer, 2020**).

La phase de dispersion est une étape essentielle dans le cycle de vie des biofilms, car elle permet aux bactéries de se répandre, de subsister et d'envahir de nouveaux lieux. Les signaux qui induisent la dispersion des biofilms bactériens sont divers et varient selon les espèces de bactéries et les dispositifs expérimentaux utilisés (**Guilhen, 2017**).

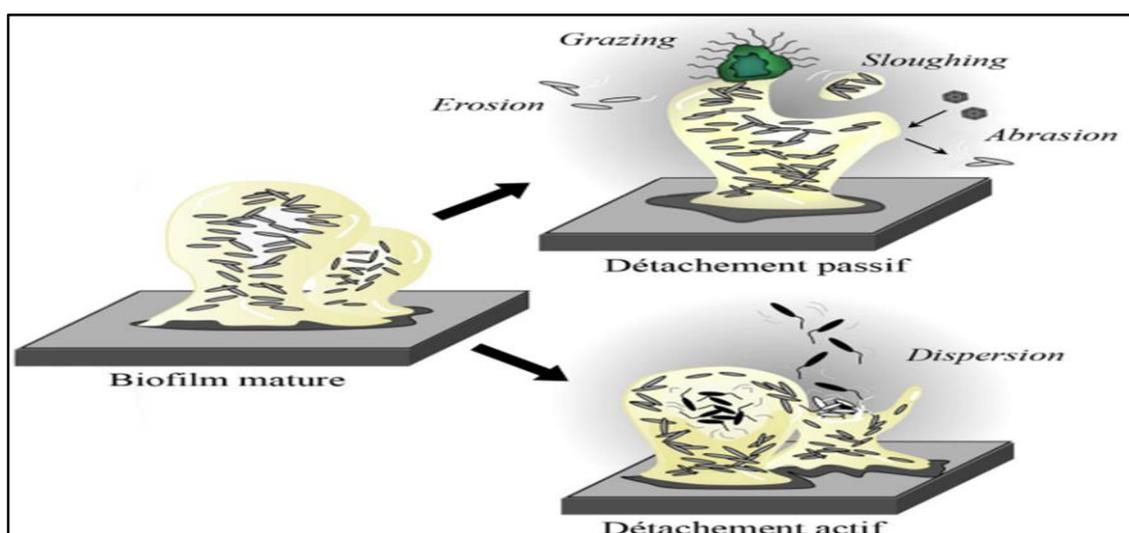


Figure 6 : Représentation schématique des différentes formes de détachement d'un biofilm mature (**Guilhen, 2017**).

1.5 Les biofilms dans l'industrie laitière

La définition du biofilm dans l'industrie laitière est similaire à celle des environnements industriels et cliniques. Cependant, dans l'industrie laitière, la composition du lait peut affecter l'adhésion bactérienne (Alonso *et al.*, 2022).

Le lait est un complexe biochimique riche en protéines, en globules gras, en lactose, en minéraux et en vitamines, avec un pH neutre (6,4-6,8), une activité de l'eau élevée ($A_w : 0,99$) et un potentiel d'oxydoréduction ($E_h > 0,3$ mV) propice à la croissance de divers micro-organismes (Alonso *et al.*, 2022).

Dans les produits laitiers, les molécules organiques et inorganiques comme les protéines du lait sont adsorbées à la surface et forment un film de conditionnement. Ces molécules ainsi que les micro-organismes sont transportées vers la surface par diffusion ou, dans certains cas, par l'écoulement turbulent du liquide. Ils s'accumulent ensuite à l'interface solide-liquide de la surface de contact du lait, où la concentration en nutriments est plus élevée que dans la phase fluide. La microtopographie de la surface de contact du lait est également importante, en particulier si elle comporte des canaux profonds et des crevasses qui retiennent les bactéries (Mogha *et al.*, 2014).

Un grand nombre de bactéries d'altération et/ou pathogènes, y compris *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, ont déjà été associés à des biofilms dans les lignes de production laitières (Cherif-Antar *et al.*, 2016).

Les biofilms peuvent se former dans diverses parties de l'équipement de transformation des produits laitiers. Les réservoirs de stockage, les silos à lait, les extérieurs des pompes, les murs, les conduites de lait, les échangeurs de chaleur et les unités de remplissage sont classés comme des pièces à haut risque pour la formation de biofilm (Fysun *et al.*, 2019). Des biofilms ont été détectés sur des surfaces couramment utilisés en industrie laitière, telles que l'acier inoxydable, l'aluminium, le verre, le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le Caoutchouc nitrile (Buna-N) et les joints en Téflon (Cappitelli *et al.*, 2014).

La présence de biofilms dans les équipements de transformation des produits laitiers pose de nombreux problèmes, tels que l'augmentation de la corrosion des surfaces métalliques, la réduction de l'efficacité du transfert de chaleur, la diminution du débit des canalisations et l'augmentation de la résistance au frottement des fluides, ce qui réduit la qualité microbiologique des produits finaux et entraîne des pertes économiques. Pour toutes ces

raisons, l'élimination des micro-organismes inclus dans le biofilm continue d'être un défi majeur dans l'industrie laitière (**Cherif-Antar *et al.*, 2016**).

Un nombre considérable de travaux ont été publiés sur la persistance de certains agents pathogènes d'origine alimentaire sur les surfaces en contact avec les aliments en biofilms, affectant la qualité et la sécurité des produits alimentaires (**Satpathy *et al.*, 2016**).

Il est donc évident que les équipements de transformation des produits laitiers doivent être contrôlés régulièrement pour détecter la formation de biofilms et être nettoyés efficacement afin d'éviter le gaspillage du lait ou l'exposition des consommateurs aux agents pathogènes (**Marchand *et al.*, 2012**).

Chapitre 2 : Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

2.1 Définition

Klebsiella pneumoniae est à la fois une bactérie commensale de l'organisme et un agent pathogène humain bien connu, ubiquitaire, opportuniste, un fixateur actif de l'azote atmosphérique et indicateur important de contamination fécale. Elle est résistante aux carbapénèmes (CRE) les plus courantes et les plus préoccupante (**Cusumano et al., 2019 ; Siu et al., 2012 ; Leclere et al., 1995**).

K. pneumoniae a été isolée pour la première fois en 1882 par Friedlander à partir des poumons de patients décédés après une pneumonie, initialement nommée bacille de Friedlander, a été rebaptisée « *Klebsiella* » en 1886. Elle est responsable d'un large éventail d'infections communautaires et nosocomiales en particulier dans les pays occidentaux développés, et infecte généralement les patients porteurs de dispositifs médicaux à demeure, en particulier les cathéters urinaires, sur lesquels ce micro-organisme peut se développer sous forme de biofilm (**Vuotto et al., 2014**), et même chez les patients immunodéprimés (**Martin et Bechman, 2018 ; Kuş et al., 2017**). L'acquisition de plus en plus fréquente d'une résistance aux antibiotiques par les souches de *K. pneumoniae* a donné lieu à une propagation mondiale de cet agent pathogène multirésistant principalement au niveau des hôpitaux (**Vuotto et al., 2014**).

Elle possède un grand génome accessoire de plasmides et de locus de gènes chromosomiques. Ce génome accessoire divise les souches de *K. pneumoniae* en groupes opportunistes, « hypervirulents » et « multirésistants » et les sépare de deux autres souches étroitement liées (*Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae*). *K. variicola* et *K. quasipneumoniae* sont souvent impossibles à distinguer cliniquement des *K. pneumoniae* opportunistes. Un troisième groupe de *K. pneumoniae* code des carbapénémases, ce qui les rend hautement résistantes aux antibiotiques. Le génome accessoire peut déterminer si une souche colonisante reste asymptomatique ou évolue vers la maladie (**Martin et Bechman, 2018**).

2.2 Taxonomie

Selon la classification de la 2^{ème} édition de Bergy's manual, *K. pneumoniae* appartient au :

Tableau n°1 : Classification de *Klebsiella pneumoniae* (Garrity *et al.*, 2004).

Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Klebsiella</i>
Espèce type	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

2.3 Habitat

K. pneumoniae est un pathogène opportuniste commun chez l'homme et les animaux, présent naturellement dans les surfaces muqueuses humaines y compris le tractus gastro-intestinal (GI) appelé aussi le tube digestif et l'oropharynx (Lenchenko *et al.*, 2020 ; Paczosa et Meccas, 2016), et dans les voies respiratoires. Elle est fréquemment rencontrée dans la nature : eaux de surface, le sol, la poussière et végétation sur de nombreuses plantes, sur les feuilles d'arbre, réside également sur les dispositifs médicaux (Paczosa et Meccas, 2016 ; Di Martino *et al.*, 2003 ; Leclere *et al.*, 1995).

2.4 Caractères morphologiques

K. pneumoniae est une bactérie à Gram négatif, immobile, (Joseph *et al.*, 2021 ; Fertas-Aissani *et al.*, 2013), bacille, non flagellé, non sporulé, capsulé et aéro-anaérobie facultatif (Fertas-Aissani *et al.*, 2013).

2.5 Caractères cultureux

Après 18-24 heures d'incubation à 37°C, *K. pneumoniae* forme des colonies muqueuses, arrondies généralement bombées et brillantes sur milieux usuels non-enrichis tel que la gélose Mac Conckey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP). Les colonies de *K. pneumoniae* apparaissent lactose-positives sur les milieux contenant du lactose (Iliquer, 2010).

2.6 Caractères biochimiques

K. pneumoniae est oxydase négative, catalase positive, fermentation du D-glucose et de nombreux sucres avec production de gaz dont le rhamnose, mannose, arabinose.

Réduction des nitrates en nitrites, uréase positive, VP (réaction de Voges-Proskauer) positive, O-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG) positive, arginine di-hydrolase (ADH) négative, lysine décarboxylase (LDC) positive, ornithine-décarboxylase (ODC) négative, citrate (CIT) positive, une absence de production d'H₂S (sulfure d'hydrogène), tryptophane désaminase (TDA) négative, indole (IND) négative (Murray *et al.*, 2020).

2.7 Pouvoir pathogène

K. pneumoniae est une cause fréquente d'infections opportunistes résistantes aux antimicrobiens chez les patients hospitalisés. Au cours de la dernière décennie, *K. pneumoniae* est devenu une menace clinique et de santé publique majeure, en raison de la prévalence croissante des infections associées aux soins de santé ou nosocomiales (Wyres *et al.*, 2020), mais aussi les infections respiratoires communautaires (Candan et Aksöz, 2015).

Elle est responsable notamment de pneumonies nosocomiales, d'infections du tractus urinaires (UTIs), de bactériémies (Joseph, 2022 ; Remya *et al.*, 2019 ; Huynh *et al.*, 2017 ; Di Martino *et al.*, 2003), et présente une cause majeure de septicémie néonatale (Wyres *et al.*, 2020 ; Di Martino *et al.*, 2003). L'appareil urinaire est le site le plus fréquent d'infection par *K. pneumoniae*. Il y a les infections urinaires dues à *K. pneumoniae* qui sont associées au diabète sucré et les infections des voies urinaires associées aux cathéters (CAUTI) causée par *K. pneumoniae* (Martin et Bechman, 2018).

Les facteurs de virulence jouant un rôle important dans la gravité des infections à *K. pneumoniae* sont les suivants : les polysaccharides capsulaires, les pili de type 1 et de type 3, les sidérophores et les capsules qui sont essentielles à la virulence des *Klebsiella* (Remya *et al.*, 2019 ; Huynh *et al.*, 2017 ; Kuş *et al.*, 2017 ; Vuotto *et al.*, 2014).

2.7.1 Capsule : Les souches de *K. pneumoniae*, en particulier les isolats cliniques, produisent fréquemment une capsule visqueuse de polysaccharide. La complexité biochimique de ces capsules donne lieu à la production de types de matériel capsulaire antigénique spécifiques aux souches, et ces antigènes ont été utilisés pour distinguer entre les souches au cours des infections cliniques. Bien que les infections chez l'homme ne puissent être attribuées uniquement à un sérotype capsulaire distinct. Les infections récemment décrites dues à *K. pneumoniae* qui se

traduisent par des infections pyogènes disséminées sont généralement causées par les sérotypes **K1**. Le sérotype **K2** est le plus fréquemment associé aux infections urinaires (**Remya et al., 2019 ; Clegg et Murphy, 2017**).

Le matériel capsulaire, qui forme des structures fibrillaires recouvrant la surface bactérienne, protège la bactérie de la phagocytose, d'une part, et empêche la destruction de la bactérie par des facteurs sériques bactéricides, d'autre part (**Clegg et Murphy, 2017 ; Vuotto et al., 2014**).

2.7.2 Fimbriae (pili) : *K. pneumoniae* peut exprimer plusieurs facteurs adhésifs, avec une prédominance pour les pili de type 1 et de type 3 (**Kassis-Chikhani, 2012 ; Di Martino et al., 2003**). Ce sont des structures protéiques non flagellaire et filamenteuse, formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Bien que les pili et fimbriae soient habituellement considérés comme synonymes, ils devraient être différenciés : les fimbriae pour l'adhésion aux cellules et pili pour les appendices formés lors de la conjugaison (**Kassis-Chikhani, 2012**).

Les fimbriae de type 1 de *K. pneumoniae* sont étroitement liés aux fimbriae de type 1 exprimés par d'autres espèces membres de la famille des Enterobacteriaceae. Les pili de type 1 sont bien connus pour leur capacité à se lier aux trisaccharides contenant du mannose des glycoprotéines de l'hôte, et leurs expression a été étroitement associée aux infections des voies urinaires (**Wu et al., 2010**). Les pili de type 3 médient l'adhérence à plusieurs types de cellules de mammifères comme les cellules endothéliales humaines et les cellules de la vessie urinaire, les cellules buccales trypsinées, les cellules trachéales et les tissus respiratoires (**Huynh et al., 2017**). Ils sont également impliqués dans l'attachement de la souche saprophyte aux poils des racines des plants de trèfle rouge et de cresson. Il a été démontré que les fimbriae de type 3, via leur arbre fimbrial, facilitent la formation de biofilms sur des surfaces abiotiques. Néanmoins, le mécanisme est encore inconnu (**Di Martino et al., 2003**).

2.7.3 Lipopolysaccharides (LPS) : Les LPS sont des composants de la membrane externe des bactéries, composés d'un antigène O, d'un oligosaccharide central et d'un lipide A. De nombreux agents pathogènes utilisent leurs LPS modifiés structurellement pour échapper aux mécanismes microbicides de l'hôte, tels que l'action phagocytaire et macrophagique. Au cours des infections à *K. pneumoniae*, les antigènes O du LPS peuvent se lier au composant C3b du complément, ce qui nuit à la destruction par le complément et favorise la survie des bactéries (**Bulati et al., 2021 ; Huynh et al., 2017**). Cependant, le LPS peut induire une inflammation

par la liaison du lipide A au TLR4 (Toll Like Receptor 4) et le déclenchement consécutif d'une cascade inflammatoire (Bulati *et al.*, 2021).

2.7.4 Sidérophores : Les sidérophores sont de petites molécules liant le fer qui est synthétisé à l'intérieur des bactéries et sécrété à l'extérieur des cellules, au fer de l'environnement et le transportent vers les cellules (Zhu *et al.*, 2021).

Les sidérophores sont également des facteurs nécessaires à la pathogenèse de *K. pneumoniae*. Ils peuvent influencer directement l'immunité de l'hôte en modulant l'homéostasie du fer cellulaire (Namikawa *et al.*, 2022). *K. pneumoniae* possèdent un système d'acquisition du fer dépendant des sidérophores tel que l'hôte, avec une affinité plus élevée pour le fer que l'hôte, ce qui constitue une stratégie prédominante d'acquisition du fer afin de survivre à la compétition avec les hôtes (Zhu *et al.*, 2021), en favorisant la dissémination bactérienne et en régulant la production de multiples facteurs de virulence bactérienne. La *K. pneumoniae* hypervirulente sécrète une plus grande quantité de sidérophores que la *K. pneumoniae* classique (figure 7). En outre, ils ont signalé que des niveaux élevés de production de sidérophores étaient associés à une maladie grave ou à la mort dans des modèles murins de septicémie (Namikawa *et al.*, 2022).

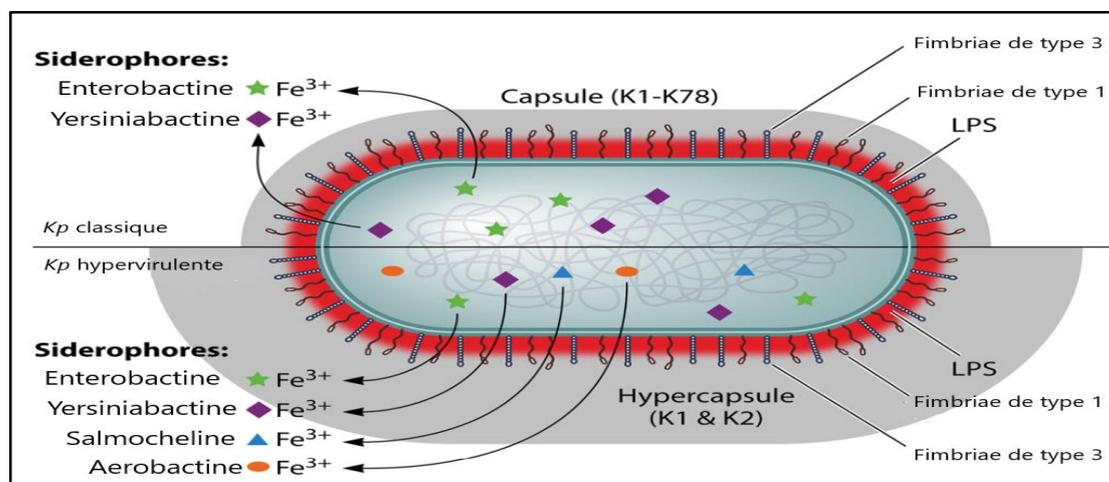


Figure 7 : Les facteurs de virulence chez les souches classiques et hypervirulente de *K. pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

2.8 Les biofilms à *Klebsiella pneumoniae*

La formation de biofilms est une caractéristique importante de la pathogenèse de *K. pneumoniae*, favorisant une résistance accrue contre les facteurs de stress environnementaux et fournissant un réservoir pour la dissémination et l'échange ultérieur de gènes associés à la résistance aux antimicrobiens (Guerra *et al.*, 2022). *K. pneumoniae* est l'une des principales causes mondiales d'infections urinaires contractées à l'hôpital, ainsi que d'autres maladies chez

des patients de la communauté. L'incidence des infections à *K. pneumoniae* a augmenté dans les hôpitaux, et selon le Centre Européen de prévention et de Contrôle des Maladies (ECDC), elle fait partie des six bactéries : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp* (ESKAPE) responsables de deux tiers de l'ensemble des infections nosocomiales (**Bandeira et al., 2014**).

K. pneumoniae forme des biofilms sur des surfaces abiotiques comme les dispositifs médicaux et les cathéters, ainsi que sur les tissus de l'hôte. Plusieurs facteurs contribuent à la formation de biofilms chez *K. pneumoniae*, soit directement, en favorisant l'augmentation de l'adhérence et/ou la maturation du biofilm (tel que la capsule polysaccharidique, le métabolisme du fer et la présence de différentes espèces bactériennes...), soit indirectement, en inhibant la formation de biofilms par des bactéries concurrentes dans leur niche de colonisation (**figure 8**) (**Guerra et al., 2022 ; Seifi et al., 2016**).

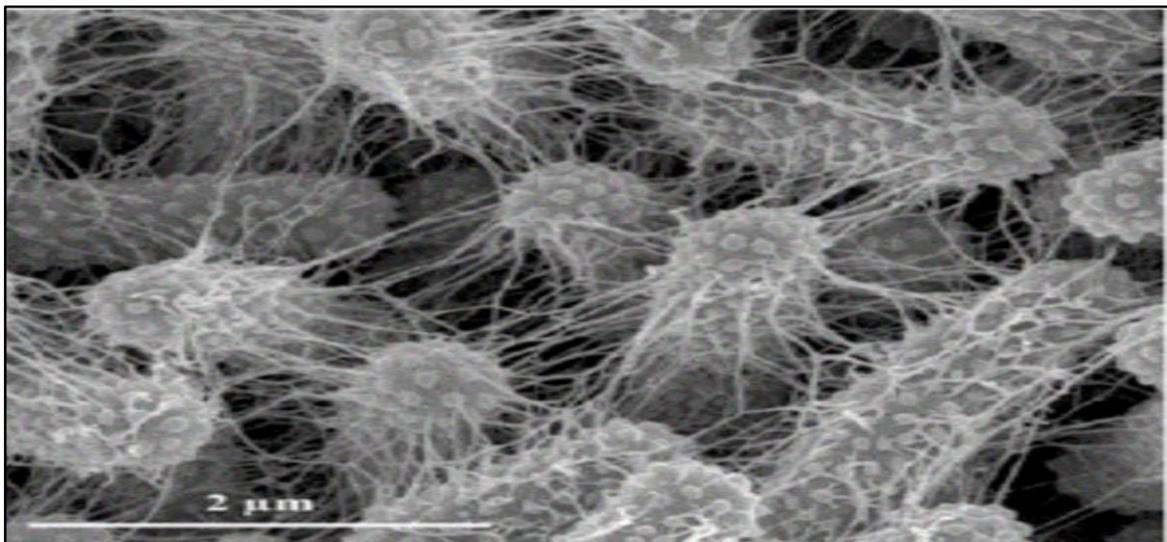


Figure 8 : Microscopie électronique à balayage de *K. pneumoniae* sessiles dans un biofilm mature formé sur des lames thermanox dans un système de micro-fermenteur après 48 heures à un grossissement de 20000 fois (**Hammond et al., 2013**).

L'espèce la plus importante isolée du lait de vaches souffrant de mammites cliniques est *K. pneumoniae*, suivie de *K. oxytoca*. Elle est isolée dans 2 à 9% des échantillons de lait provenant de cas de mammites cliniques. Les infections de la glande mammaire par *K. pneumoniae* sont caractérisées par des signes cliniques sévères et de faibles taux de guérison bactériologique après administration d'antimicrobiens. L'infection à *K. pneumoniae* est également associée à une baisse importante de la production laitière et entraîne donc d'importantes pertes économiques. Les animaux affectés sont fréquemment retirés du troupeau. L'un des

mécanismes proposés pour la persistance de *K. pneumoniae* dans les infections humaines est la formation de biofilms, qui consistent des bactéries intégrées dans une matrice polysaccharidique autoproduite. Dans une étude récente, il a été démontré que 84% des isolats de *Klebsiella spp* produisaient des quantités visibles de biofilm par la méthode en tube (la seule étude décrivant la formation de biofilms pour cet agent pathogène dans des isolats récupérés dans des cas de mammite bovine) (**Massé et al., 2020**).

Dans l'industrie laitière, *K. pneumoniae* peut être présente dans les équipements de transformation du lait, les réservoirs de stockage et les canalisations sous forme de biofilms afin de se protéger des conditions défavorables telles que les processus de pasteurisation et de nettoyage en place (NEP). Après une étude d'évaluation de la diversité du microbiote attaché aux surfaces en acier inoxydable dans les conduites de pré-pasteurisation, et de post-pasteurisation d'une usine de transformation du lait, *K. pneumoniae* est parmi les espèces pour lesquelles le nombre de souches productrices de biofilms est le plus élevé (**Cherif-Antar et al., 2016**).

La présence de *K. pneumoniae* dans l'industrie laitière peut être préoccupante car elle peut causer des infections chez les personnes qui consomment des produits laitiers contaminés. De plus, cette bactérie peut produire des enzymes capables de dégrader les protéines du lait, ce qui peut entraîner des altérations de la qualité des produits laitiers.

Pour prévenir la contamination par *K. pneumoniae* dans l'industrie laitière, il est important de maintenir des normes élevées de propreté et d'hygiène dans les installations de traitement et de stockage. Les équipements doivent être régulièrement nettoyés et désinfectés, et les employés doivent suivre des protocoles de sécurité alimentaire stricts pour éviter toute contamination croisée. Les tests réguliers pour la présence de *K. pneumoniae* dans les installations de traitement et de stockage peuvent également aider à prévenir la propagation de cette bactérie (**Li et al., 2019 ; Ranghino et al., 2017**).

Chapitre 3 : Les facteurs influençant la formation du biofilm

La formation de biofilm peut être influencée par plusieurs facteurs, notamment la souche bactérienne, les caractéristiques de surface et les conditions environnementales (**Cappitelli et al., 2014**) (figure 9).

Dans le processus de fabrication des aliments incluant les produits laitiers, une variété de conditions favorables dans les équipements de transformation pourraient induire la formation de biofilm, notamment la présence d'humidité, des plages de températures favorables à la croissance des bactéries et une teneur élevée en nutriments (**Fysun et al., 2019**).

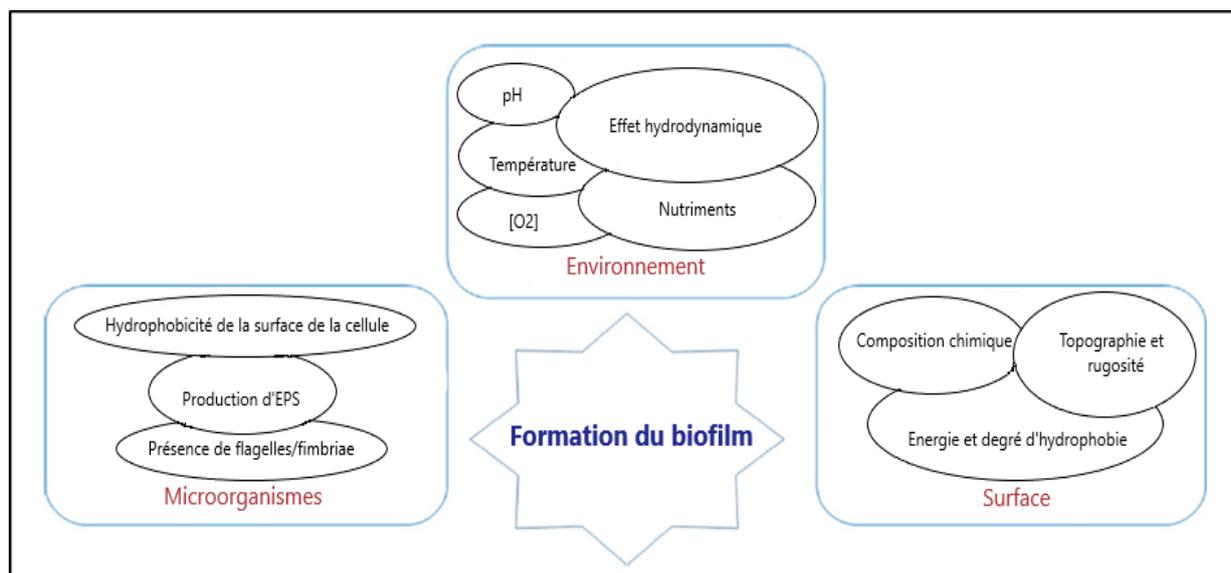


Figure 9 : Principaux facteurs affectant la formation de biofilm (**Speranza et Corbo, 2017**).

3.1 Les facteurs liés à l'environnement

3.1.1 pH : Les variations de la valeur du pH dans l'environnement influencent l'adhésion bactérienne et la croissance du biofilm (**McWhirter et al., 2002**). Les études ont montré que le pH influence la formation de biofilms chez différentes espèces bactériennes. Par exemple, pour *Staphylococcus epidermidis*, le pH est un facteur déterminant de l'adhérence aux surfaces (**Nostro et al., 2012**). Des conditions très acides ou alcalines ont un effet négatif sur la formation de biofilms de *S. aureus*, tandis qu'un pH neutre favorise cette formation (**Zmantar et al., 2010**).

Des études spécifiques sur *Escherichia coli* et *Streptococcus agalactiae* ont également montré l'effet du pH sur la formation de biofilms. Pour *E. coli*, des conditions neutres favorisent la formation de biofilms à une température de 25°C, tandis que des conditions acides favorisent

une meilleure formation à 37°C. Pour *S. agalactiae*, un pH acide favorise également la formation de biofilms (Mathlouthi *et al.*, 2018 ; D'Urzo *et al.*, 2014).

Le pH optimal pour la sécrétion de polysaccharides varie selon les espèces, mais la plupart des bactéries ont un pH optimal d'environ 7 (Tilahun *et al.*, 2016). Les EPS jouent un rôle essentiel dans la protection du biofilm contre les stress environnementaux, y compris les changements de pH (Bogino *et al.*, 2013). Les cellules bactériennes présentes dans le biofilm ont une plus grande capacité à résister aux variations de pH par rapport aux cellules bactériennes libres dans le milieu (D'Urzo *et al.*, 2014). Par exemple, dans des conditions très acides, la structure gélatineuse du biofilm bactérien aide à limiter la diffusion rapide des ions, créant ainsi un gradient de pH dans la matrice extracellulaire (Alotaibi et Bukhari, 2021). Cependant, dans des conditions alcalines, on observe un biofilm mal structuré et mince, causé par une perturbation de la maturation du biofilm, ce qui inhibe également l'adhésion de certaines bactéries telles que *S. aureus* et *S. epidermidis* (Nostro *et al.*, 2012).

3.1.2 Température : La température de croissance est également une condition importante pour l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms (Abdallah *et al.*, 2014). Il a été constaté qu'une température de croissance élevée augmentait la biomasse et la capacité d'attachement des bactéries, probablement en raison de la production de protéines de stress thermique associées à la surface des cellules. Par exemple une étude de Hošťacká *et al* a démontré que la biomasse du biofilm de *P. aeruginosa* augmente avec l'augmentation de la température d'incubation (Hošťacká *et al.*, 2010 ; Smoot & Pierson, 1998). Par ailleurs, différentes études concernant la formation du biofilm de *S. aureus* ont montré que les variations de température n'avaient pas d'effet clair sur la biomasse (Da Silva Meira *et al.*, 2012). Par conséquent, une température optimale favorise la formation du biofilm. La température affecte également la composition des polymères de la surface bactérienne, qui diminue à basse température et réduit les propriétés adhésives des bactéries (Herald et Zottola, 1988).

3.1.3 Présence de nutriments : Un autre facteur important dans la formation du biofilm est la disponibilité des nutriments. En effet, les nutriments influencent la charge de surface des bactéries. Par exemple, le glucose et l'acide lactique dans le milieu de croissance diminuent l'électronégativité de la paroi cellulaire bactérienne par la neutralisation de la charge de surface (Brocklehurst *et al.*, 1987). Ainsi, un effet synergique entre les facteurs environnementaux peut se produire et affecter la formation du biofilm (Khelissa, 2017).

Les structures des biofilms qui poussent sous des concentrations de nutriments faibles et élevées, respectivement, diffèrent (Purevdorj *et al.*, 2002). Il a été rapporté que les biofilms

poissant sous des concentrations élevées de nutriments ont une densité cellulaire élevée et que la structure du biofilm (EPS) semble être épaisse et complexe, alors que des concentrations de nutriments plus faibles ont tendance à conduire à une structure plus compacte avec une densité cellulaire plus faible. Cette variabilité démontre que la morphologie structurale du biofilm dépend de la disponibilité des nutriments (**Molobela et Ilunga, 2012**).

La formation de biofilms chez les bactéries pathogènes telles que *S. aureus* et *P. aeruginosa* semble être influencée par la présence de glucose et de NaCl (**Huang et al., 2009 ; Rode et al., 2007**). De plus, il a été observé que la présence de fer augmente la quantité de biomasse dans le biofilm de *P. aeruginosa* et *S. aureus* (**Lin et al., 2012 ; Banin et al., 2005**). Dans les systèmes biologiques, le Ca^{2+} , principalement connu en tant que molécule messagère intracellulaire, joue un rôle dans la formation et la stabilité de la structure du biofilm (**Shukla et Rao, 2013**).

3.1.4 Concentration en oxygène : La présence d'oxygène dans l'environnement est essentielle et peut avoir un impact significatif sur la composition et le développement des biofilms (**Alotaibi et Bukhari, 2021**). La disponibilité d'oxygène influence la capacité des bactéries à produire de l'énergie, ce qui peut potentiellement affecter la formation du biofilm. À l'intérieur des biofilms, des micro-environnements se créent, avec des zones où la concentration en oxygène est réduite, ce qui ralentit la croissance bactérienne. Lorsque la quantité d'oxygène diminue dans les biofilms, l'activité métabolique bactérienne diminue et la croissance des bactéries s'arrête (**Anderson et O'Toole, 2008**). Cette condition peut ne pas fournir suffisamment d'énergie pour maintenir l'adhérence cellulaire, ce qui peut entraîner le détachement des bactéries (**Pagán et García-Gonzalo, 2015**).

De plus, la quantité d'oxygène présente peut également influencer l'hydrophobicité de la surface, ce qui détermine les interactions hydrophobes. En général, une augmentation de l'oxygène à la surface conduit à une réduction de l'hydrophobicité de cette dernière (**Moreno-Castilla, 2004**).

Mashruwala *et al* ont démontré la formation de biofilm médiée par l'hypoxie chez *S. aureus*. Dans une condition de limitation d'oxygène, la respiration cellulaire est altérée, ce qui active à son tour la mort cellulaire programmée dans les bactéries. En conséquence, les cellules bactériennes lysent et libèrent des protéines et de l'ADN (composants qui composent l'EPS) dans l'environnement, ce qui suggère que l'hypoxie induit effectivement la formation de biofilms (**Mashruwala et al., 2017**). De même, Cramton *et al* ont rapporté une augmentation

de la formation de biofilm de *S. aureus* en raison de la diminution des niveaux d'oxygène. En plus d'induire la formation de biofilm, de faibles concentrations d'oxygène peuvent également affecter la maturation du biofilm (**Cramton et al., 2001**). Une étude de Zhu *et al* ont constaté que les concentrations d'oxygène appauvries peuvent altérer le processus de maturation du biofilm, en déduisant que le taux de maturation du biofilm est proportionnel au taux d'appauvrissement en oxygène (**Zhu et al., 2007**).

3.1.5 Effets hydrodynamiques : Les biofilms dans différents environnements sont exposés à une variété de conditions hydrodynamiques qui peuvent avoir un effet sur la matrice du biofilm (**Lembre et al., 2012**). Ces conditions affectent la formation du biofilm en modifiant l'apport de nutriments et d'oxygène et en appliquant des forces de cisaillement, ce qui peut affecter l'attachement des cellules aux surfaces (**Gomes et al., 2014**). Le taux de transport des cellules bactériennes, des nutriments et de l'oxygène du fluide en vrac vers le biofilm s'est également avéré être déterminé par l'hydrodynamique des fluides (**Gomes et al., 2018**). En outre, ces conditions peuvent influencer les propriétés physiques du biofilm, telles que la densité et la résistance, qui à leur tour pourraient affecter la diffusion des nutriments et des signaux dans le biofilm (**Purevdorj et al., 2002**).

Il existe des preuves considérables que la contrainte de cisaillement a des effets sur le taux de croissance, la structure du biofilm, la production d'EPS, le transfert de masse et le comportement métabolique/génétique du biofilm (**Alotaibi et Bukhari, 2021**). Par exemple, l'analyse des populations microbiennes qui se sont développées sous une force de cisaillement de paroi donnée a montré que la contrainte de cisaillement ralentit la maturation du biofilm de *P. putida* (**Rochex et al., 2008**). La détection du quorum dans le biofilm de *P. aeruginosa* s'est également avérée influencée par les conditions hydrodynamiques (**Simões et al., 2007**). Dans le biofilm de *P. aeruginosa*, il a été constaté qu'une contrainte de cisaillement élevée causée par une vitesse d'écoulement élevée induisait le détachement cellulaire (**Zhang et al., 2011**).

Le détachement se produit généralement lorsque les forces de cisaillement externes sont supérieures à la résistance interne de la matrice qui relie le biofilm (**Fu et al., 2017**). Deux mécanismes peuvent conduire au détachement des cellules du biofilm, soit une augmentation des forces de cisaillement externes, soit une diminution de la résistance interne (par exemple, par hydrolyse de la matrice polymère du biofilm) (**Horn et al., 2003**).

Un débit élevé est connu pour provoquer deux phénomènes de nature opposée : il favorise le transport des nutriments vers la surface, contribuant à la croissance de la cellule dans la

couche microbienne et à la production d'exopolymères ; d'autre part, avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement, les taux de cisaillement augmentent également, ce qui provoque une érosion et un détachement supplémentaires des parties du biofilm, puis une diminution de la quantité de biomasse attachée au support solide (Gomes *et al.*, 2014). Cependant, le détachement du biofilm sous les forces hydrodynamiques conduit à une réduction viable de la biomasse, ce qui diminue également la sécrétion d'EPS ; ainsi, des contraintes de cisaillement plus élevées peuvent entraîner un biofilm plus dense et plus mince (Qi *et al.*, 2008 ; Liu et Tay, 2001). Une adhérence plus forte et des taux de détachement plus faibles ont été observés pour les cellules cultivées dans des conditions de cisaillement élevé (Karimi *et al.*, 2015).

3.2 Les facteurs liés aux microorganismes

3.2.1 La production d'exopolysaccharides (EPS) : EPS est l'un des principaux composants du biofilm (Petruzzi et Inzana, 2016). Ce sont des macromolécules appartenant au groupe des carbohydrates (Barcelos *et al.*, 2020), ainsi que des polymères hydrosolubles constitués de motifs répétitifs de sucre qui remplissent un large éventail de fonctions pour les espèces bactériennes qui les produisent. Ces fonctions comprennent la constitution d'une matrice de biofilm, la rétention des nutriments, la protection contre les menaces environnementales et même la pathogénicité (Bagnol *et al.*, 2022).

Certaines souches d'*E. coli* sont capables de former des biofilms dans les voies urinaires, les intestins et les aliments. Les EPS produits par *E. coli* sont également importants pour la formation et la stabilité de ces biofilms (Danese *et al.*, 2000).

S. thermophilus est l'une des bactéries thermophiles homofermentaires les plus commercialisables et largement utilisée dans l'industrie laitière. Certaines souches de *S. thermophilus* sont capables de synthétiser des EPS, ce qui a suscité un grand intérêt pendant longtemps, car les EPS peuvent améliorer la viscosité, la texture et la sensation en bouche des produits laitiers. Les EPS sont utilisés aussi dans l'industrie alimentaire comme épaississants, stabilisateurs et agents de conservation, ainsi que comme émulsifiants, gélifiants.

La production d'EPS est donc l'une des propriétés les plus importantes et les plus attrayantes des souches de *S. thermophilus* (Cui *et al.*, 2017).

3.2.2 La présence de flagelles et de fimbriae

3.2.2.1 Flagelles : Le mécanisme non réciproque de la motilité bactérienne le plus étudié est le flagelle, une hélice hélicoïdale filamenteuse reliée par un crochet à un moteur rotatif. Grâce aux flagelles les bactéries nagent à des vitesses moyennes de 30 mm/s (Conrad, 2012). Les flagelles

influencent les étapes du développement de biofilm, car la suppression ou la modification des flagelles entraîne des variations ou des déficiences dans l'attachement et la croissance des cellules à la surface (Conrad *et al.*, 2011).

3.2.2.2 Fimbriae (pili) : Ce sont des polymères protéiques multisubunitaires à la surface des cellules (Mandlik *et al.*, 2008), chez les bactéries Gram-négatives sont généralement formés par l'homopolymérisation non covalente des protéines de la sous-unité majeure du pilus (pilines), qui génère la tige du pilus. En revanche, les pili récemment découverts chez les bactéries Gram-positives sont formés par polymérisation covalente des sous-unités de piline dans un processus qui nécessite une enzyme sortase spécifique (Proft et Baker, 2008).

L'adhésion et le moment différent du développement du biofilm entre les souches piliées et non piliées (Nagar *et al.*, 2017), l'absence des pili chez certaines espèces bactériennes présente un défaut important dans la formation du biofilm, alors que chez d'autres espèces non piliées il y a formation du biofilm (Mandlik *et al.*, 2008).

Les fimbriae de type 3 sont responsables de l'attachement de *K. pneumoniae* à la matrice extracellulaire, se lieraient aux cellules endothéliales et vésicales humaines et favoriseraient la formation de biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (Hornig *et al.*, 2021). La synthèse de fimbriae de type 1 par des bactéries est un processus complexe, contrôle par les statuts nutritionnels des cellules et par les conditions environnementales (Goller et Romeo, 2008).

B. cereus est une bactérie couramment présente dans les produits laitiers, elle peut causer des intoxications alimentaires lorsqu'elle produit des toxines. Les flagelles chez *B. cereus* peuvent jouer un rôle dans la motilité de la bactérie, lui permettant de se déplacer dans l'environnement laitier, cela peut faciliter la dispersion de la bactérie dans les produits laitiers et favoriser sa croissance et sa colonisation. Alors que les fimbriae peuvent jouer un rôle dans l'adhésion aux surfaces des équipements de transformation laitière, des conduites et des surfaces de contact, cela peut favoriser la formation de biofilms bactériens, ce qui est un problème potentiel dans l'industrie laitière, car les biofilms protègent les bactéries des procédés de nettoyage et de désinfection (Banykó et Vyletřlová, 2009 ; Magnusson *et al.*, 2007 ; Te Giffel et Beumer, 1998).

3.2.3 L'hydrophobicité de la surface de la cellule : L'hydrophobie de la surface cellulaire est très importante pour l'attachement cellulaire et la formation de biofilms. La compatibilité cellule-surface solide est définie comme l'affinité entre les hydrophobies relatives de la cellule

et de la surface solide, alors la fixation des cellules dépend positivement de la compatibilité hydrophobe entre les cellules et les surfaces solides (**Oda et Tanikawa, 2022**).

L'hydrophobicité de la surface des microorganismes est un aspect important dans l'industrie laitière. Elle joue un rôle dans divers processus tels que la formation de biofilms, l'adhésion aux surfaces et la résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. Dans cet environnement, les microorganismes peuvent être bénéfiques, comme les bactéries lactiques utilisées dans la fermentation des produits laitiers, ou indésirables, comme certaines bactéries pathogènes. *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène couramment associée aux produits laitiers contaminés. Les souches de *L. monocytogenes* les plus hydrophobes sont plus résistantes aux procédés de nettoyage et de désinfection, ce qui souligne l'importance de l'hydrophobicité de surface dans la persistance des microorganismes dans l'environnement laitier (**Lianou et Koutsoumanis, 2017**).

3.3 Les facteurs liés aux surfaces

3.3.1 La composition chimique de la surface solide : L'adhésion bactérienne à la surface et la formation de biofilms dépendent de la chimie de la surface solide. Les surfaces peuvent avoir différents groupes fonctionnels qui influencent l'attachement bactérien qui dépend également de l'hydrophobie et de la charge du matériau (**Katsikogianni et Missirlis, 2004**).

Un exemple courant est l'adhérence des bactéries aux surfaces chargées positivement. Étant donné que les bactéries ont généralement une charge négative nette sur leur paroi cellulaire en raison de groupes carboxyle, amino et phosphate, une plus grande adhérence est souvent observée sur les surfaces présentant une charge positive (**Zheng et al., 2021**).

3.3.2 La topographie et rugosité de la surface : La rugosité de l'acier inoxydable est considérée comme un facteur primordial dans l'attachement des bactéries et la formation de biofilms (**Hilbert et al., 2003**). L'influence de la rugosité du matériau sur l'adhésion bactérienne a été étudiée de près. De nombreuses études portant sur la topographie de différents types de surfaces ont révélé que les irrégularités des surfaces abiotiques favorisent l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms, tandis que les surfaces lisses réduisent la capacité d'adhésion bactérienne (**Fratamico et al., 2009**). En effet, les surfaces rugueuses ont une plus grande surface et offrent aux bactéries un abri protecteur contre les agents de nettoyage et des sites plus favorables à la colonisation (**Khelissa, 2017**). Par exemple, l'adhésion de *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* et *Ralstonia pickettii* sur des surfaces rugueuses avec de plus

grandes surfaces était remarquablement plus élevé, par rapport aux surfaces plus lisses (**James et al., 2019**).

En outre, la porosité des matériaux a un effet significatif sur l'attachement bactérien. Il a été constaté que les taux d'infection du site implantaire sont différents entre les matériaux poreux et les matériaux denses, les matériaux poreux présentant un taux beaucoup plus élevé. Cela montre que les bactéries adhèrent et colonisent préférentiellement la surface poreuse. En effet, les bactéries adhèrent d'avantage aux surfaces poreuses et rainurées qu'aux surfaces denses et plates en raison de leur plus grande surface de contact (**Fratamico et al., 2009**).

3.3.3 L'énergie de surface et degré d'hydrophobie : Les propriétés physico-chimiques des surfaces abiotiques dans l'industrie alimentaire sont soupçonnées d'influencer de manière significative la formation de biofilms, principalement par le biais de l'attachement initial des bactéries. En fait, l'attachement des bactéries dépend de la tension superficielle critique de la surface solide (**Khelissa, 2017**). L'énergie de surface d'une surface solide est un indicateur direct des forces d'attraction interfaciales. La modification de l'énergie de surface a une influence directe sur l'adhésion bactérienne (**Bos, et al., 2000**).

Il a été rapporté que l'adhésion de *Staphylococcus xylosus* dépend des propriétés physico-chimiques de la surface et de la force ionique du milieu environnant (**Regina et al., 2014**). Il a été défini que les interactions hydrophobes sont les plus fortes de toutes les interactions non covalentes dans les systèmes biologiques (**van Oss, 1997**). Les forces physico-chimiques impliquées dans l'adhésion dépendent les unes des autres relations entre l'hydrophobie et la charge de la surface ont été observées. Une diminution de la charge de la surface s'accompagne souvent d'une augmentation de l'hydrophobie (**Daeschel et McGuire, 1998**). L'hydrophobie de surface a été considérée comme un facteur déterminant pour l'adhésion des cellules microbiennes (**Alsteens et al., 2007**).

En outre, plusieurs études ont examiné la relation entre le degré d'hydrophobie et le taux d'adhésion bactérienne. La relation entre le degré d'hydrophobie de différentes surfaces abiotiques et le nombre de cellules *S. epidermidis* et *Alcaligenes denitrificans* attachées a été évaluée et les résultats ont montré que les taux d'adhésion augmentaient avec l'hydrophobie de la surface. Dans le même contexte, Sheng *et al* ont rapporté que l'adhésion bactérienne est plus faible sur les surfaces métalliques présentant une hydrophobie réduite (**Sheng et al., 2008 ; Van Loosdrecht et al., 1987**).

Partie 2

Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'Institut des Sciences et Techniques Appliquées (ISTA) et au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE) Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen, durant la période allant du 26 février au 15 mars pendant l'année universitaire 2022/2023.

1. Origine des souches

Cette étude a porté sur trois souches (lamaabe4-75, lamaabe4-63 et lamaabe4-90) appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. L'isolement, l'identification et la caractérisation des souches ont été réalisés dans une étude préalable (**Cherif-Antar et al., 2016**).

Les souches ont été isolées à partir des lignes de post-pasteurisation de production de lait cru après application du nettoyage en place (NEP). L'identification moléculaire des souches a été réalisée à l'aide des techniques RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) et le séquençage de l'ADNr 16s. Les souches ont montré une bonne capacité à former le biofilm *in vitro* sur les microplaques de titration en polychlorure de vinyle.

2. Revivification des souches

Dans le cadre de cette étude, deux milieux différents sont préparés, le milieu Mac Conkey (**Fluka, Inde**) et le Bouillon au Cœur-Cervelle Infusion (BHIB) (**Fluka, Inde**). Afin de revivifier les souches, une fraction issue du stock des cultures sur glycérol à -80°C de chaque souche est transférée dans 5 ml de BHIB puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Une fois la durée d'incubation achevée, les souches sont homogénéisées par agitation au vortex etensemencées en surface par épuisement sur le milieu Mac Conkey puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

3. Observation microscopique

Après incubation, une observation microscopique est réalisée afin de vérifier la pureté des souches. A partir des souches de *K. pneumoniae* des frottis bactériens sont préparés, et colorés avec le bleu de méthylène pendant une minute. Ensuite, rincés avec de l'eau, séchés et observés au microscope optique avec un grossissement de 100 (l'ajout de l'huile d'immersion).

Cette technique de coloration simple nous permet de vérifier la présence de toute contamination bactérienne et de vérifier la pureté des souches utilisées dans notre étude.

4. Conservation des souches

Deux techniques de conservation sont appliquées pour nos souches à savoir :

4.1 Conservation à court terme : La préparation de tubes de gélose inclinée peut être effectuée en utilisant des tubes en verre stériles. Dans chaque tube, 7 ml de gélose fondue est ajoutée. Une fois la gélose solidifiée, une colonie de chaque souche de *K. pneumoniae* est ensemencée sur la surface inclinée en utilisant une technique de stries, puis incubée à une température de 37°C pendant 24 heures, afin de favoriser la croissance bactérienne. Après l'incubation, les tubes peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C pendant une période maximale de 20 jours avant d'être utilisés pour des expériences ultérieures.

4.2 Conservation à long terme : Les souches sont stockées sur le glycérol à -80°C pour maintenir leur viabilité. Pour cela, chaque souche de *K. pneumoniae* est ensemencée dans 3 ml de BHIB et incubée à 37°C pendant 24 heures. Un volume de 1 ml de chaque suspension est centrifugé à 13200 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est additionné de 500 µl de BHIB stérile, et de 500 µl de glycérol stérile à une concentration finale de glycérol à 50% (**Merck, Germany**) en tant qu'agent cryo-protecteur.

5. Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

5.1 Préparation de la suspension bactérienne : Pour étudier la formation du biofilm chez les souches, une colonie de chaque souche à étudier issue de la culture bactérienne revivifiée est transférée dans 10 ml de BHIB et incubée à 37°C pendant une nuit. Après incubation, l'inoculum est ajusté à une concentration finale de $\approx 10^8$ UFC/ml à l'aide d'un densitomètre.

5.2 Formation de biofilm par *K. pneumoniae*

5.2.1 Protocole : Un total de 3 souches de *K. pneumoniae* est sélectionné pour étudier l'effet de la source de carbone sur leur capacité de formation de biofilm (**figure 10**). Pour cela, 3 sucres souvent rencontrés dans l'industrie laitière sont choisies à savoir le glucose (**Specilab, Algérie**) le lactose (**Biochem chemopharma, France**) et le galactose (**Biochem chemopharma, France**). Des concentrations variables de ces sources de carbone sont étudiées, allant de 0,5 à 2%, soit 0,5, 1, 1,5 et 2%.

La formation de biofilm est réalisée sur les microplaques de titration à 96 puits. Pour chaque souche, 3 puits de la microplaque de titration sont remplis indépendamment par 200 µl du bouillon nutritif (BN) (**Pronadisa, Spain**) additionné d'un type de sucre à une concentration précise. Ensuite 10 µl de la suspension bactérienne est inoculée dans chaque puits (**figure 10, A**). Les microplaques sont incubées en aérobiose pendant 2, 4, 6 et 24h à 37°C. Les puits de

contrôle négatif sont remplis uniquement avec le milieu de culture BN. Pour chaque souche la technique est réalisée en triplicata.

5.2.2 Quantification des biofilms formés : Pour quantifier le biofilm formé, les étapes suivantes sont appliquées:

Premièrement, le contenu de chaque puits est jeté afin d'éliminer les cellules bactériennes non adhérentes, puis rincé à trois reprises avec de l'eau distillée stérile (**figure 10, B**). Les microplaques sont ensuite laissées sécher à température ambiante pendant 15 minutes.

Ensuite, les puits des microplaques sont remplis avec 200 μ l d'une solution de cristal violet (CV) (**Loba Chemie Pvt. Ltd, Inde**) à 0,1% pendant 15 minutes à température ambiante (**figure 10, C**). L'excès du cristal violet est éliminé et les microplaques sont rincées avec l'eau distillée stérile (**figure 10, D**). Un séchage à l'air est effectué par la suite pendant 15 minutes.

Enfin, solubilisation des puits avec 150 μ l d'une solution d'acide acétique à 33% (**figure 10, E**). L'adhérence des cellules bactériennes est mesurée par l'absorbance à 596 nm (DO_{596}) à l'aide d'un lecteur de microplaque de titration automatique (**Bio Tek, Etats- Unis**) (**figure 10, F**).

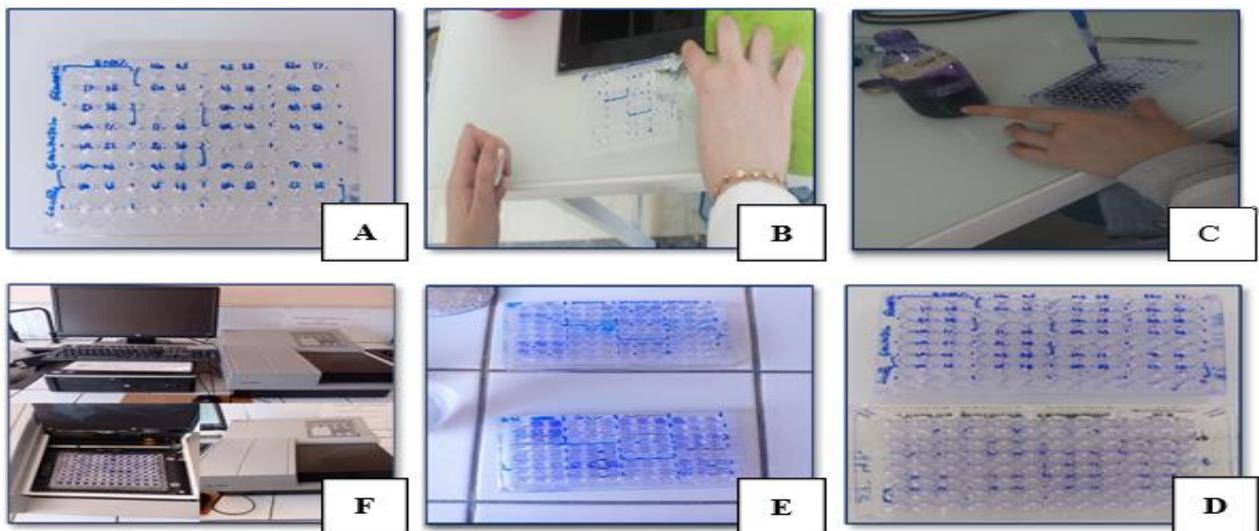


Figure 10 : Les étapes de l'étude de la source de carbone sur la formation de biofilm par *K.*

pneumoniae : (A) La microplaque de titrage a 96 puits rempli avec la suspension bactérienne, (B) Elimination de la culture bactérienne après incubation et rinçage des microplaques avec l'EDS, (C) Remplissage des microplaques avec une solution du Cristal Violet à 0,1%, (D) Elimination du cristal violet et rinçage de la microplaque, (E) Solubilisation du contenu des puits avec de l'acide acétique à 33%, (F) Lecture de microplaques de titration par le lecteur automatique.

Partie 3

Résultats et discussion

L'effet de différentes sources de carbone couplé à différentes périodes d'incubation sur la formation de biofilm par *K. pneumoniae* isolée, a fait l'objet de la présente étude.

1. Observation macroscopique et microscopique des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Deux méthodes microbiologiques standards sont utilisées afin de vérifier la pureté des souches de *K. pneumoniae*, à savoir la croissance sur milieu gélosé de Mac Conkey et la coloration simple par le bleu de méthylène.

1.1 Aspect macroscopique : Après 24 heures d'incubation à 37°C, les souches de *K. pneumoniae* forment des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes sur gélose Mac Conkey (**figure 11**).

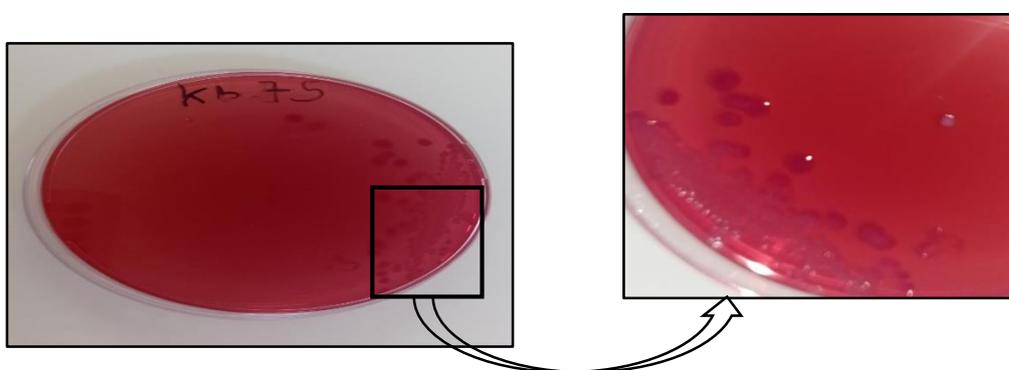


Figure 11 : Aspect morphologique de la souche lamaabe4-75 de *K. pneumoniae* sur milieu Mac conkey.

1.2 Aspect microscopique : Une coloration simple avec du bleu de méthylène est réalisée, pour l'observation microscopique. Toutes les cellules sont des bacilles, immobile (**figure 12**).

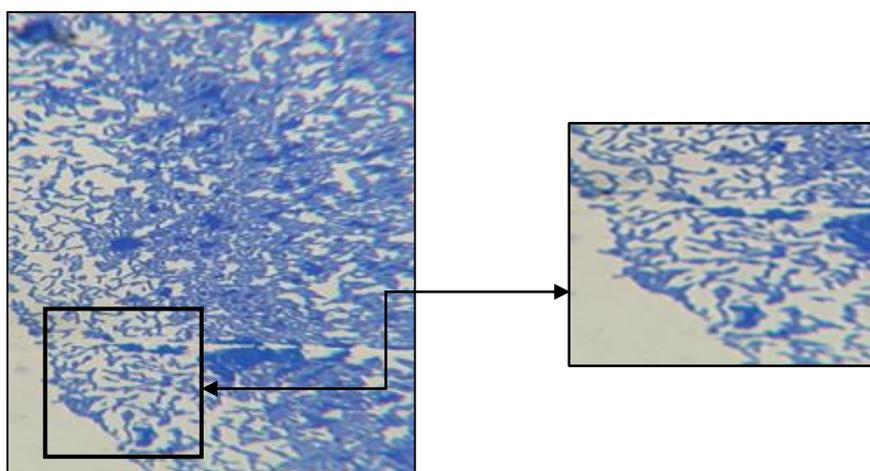


Figure 12 : Observation microscopique de *K. pneumoniae* (Grossissement* 100).

2. Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par *K. pneumoniae*

Cette étude visait à évaluer l'effet de différentes sources de carbone, couramment rencontrées dans l'industrie laitière, sur la formation de biofilms par *Klebsiella pneumoniae*. Pour cela, trois types de sucres à savoir : le lactose, le glucose et le galactose sont sélectionnés.

Afin d'atteindre notre objectif, un total de 04 concentrations est choisi : 0,5%, 1%, 1,5% et 2% couplés à différente durée d'incubation 2, 4, 6 et 24h.

Les valeurs de l'absorbance à 596 nm après incubation et coloration au CV sont des valeurs indiquant le biofilm formé par les souches étudiées.

2.1 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-75 : Pour cette souche lamaabe4-75 (**figure 13**), les résultats obtenus après 2 heures d'incubation variaient de 0,234 à 0,50 pour les différentes sources de carbone testées, tandis que la valeur du contrôle négatif sans l'ajout de sucre était de 0,24. Pour le glucose a une concentration de 2%, la valeur la plus élevée obtenue était de 0,39, alors que celle du galactose était de 0,50 à la même concentration, et celle du lactose était de 0,49 (**figure 13, A**).

Il est important de noter que la concentration de 2% pour chaque source de carbone a donné les valeurs de DO les plus élevées.

Ces résultats indiquent également que, le galactose a le plus grand effet sur la formation de biofilms par *Klebsiella pneumoniae* après 2 heures d'incubation suivi par le lactose.

Les résultats obtenus pour la même souche après 4 heures d'incubation variaient de 0,464 à 1,02, tandis que la valeur du témoin est de 0,31. La valeur la plus élevée observée pour le glucose était de 0,66 à une concentration de 1,5%, alors que pour le galactose, la valeur la plus élevée observée était de 1,02 à une concentration de 2%. Le lactose a donné une plus grande valeur à 2% (0,99) (**figure 13, B**).

Il est intéressant de noter que, pour cette durée d'incubation, la concentration de 2% a montré les valeurs les plus élevées pour le galactose (1,02) et le lactose (0,99), tandis que pour le glucose (0,66), la concentration de 1,5 % a donné la valeur la plus élevée. Cela indique que les différentes sources de carbone peuvent avoir des réponses différentes en fonction de la concentration utilisée.

Les résultats obtenus après 6 heures d'incubation variaient de 0,87 à 1,15. La concentration de 2% a montré les valeurs les plus élevées pour le glucose (1,02), le galactose (1,03) et le

lactose (1,15), indiquant une dépendance de la formation de biofilms à la concentration de la source de carbone utilisée (**figure 13, C**).

Après 24 heures d'incubation, nous avons obtenus des valeurs de DO qui variaient de 1,30 à 2,22. En comparant ces résultats, le glucose à 2% a montré la valeur la plus élevée de formation de biofilms (2,22), suivi par le lactose à 2% (2,13) et le galactose à 1,5% (1,97) à différentes concentrations. Cela suggère que le glucose est l'inducteur le plus efficace de formation de biofilms pour la souche lamaab4-75 après 24 heures d'incubation (**figure 13, D**).

Ces données, nous révèlent une augmentation de la formation de biofilms au fil du temps d'incubation, quelle que soit le sucre et la concentration testé.

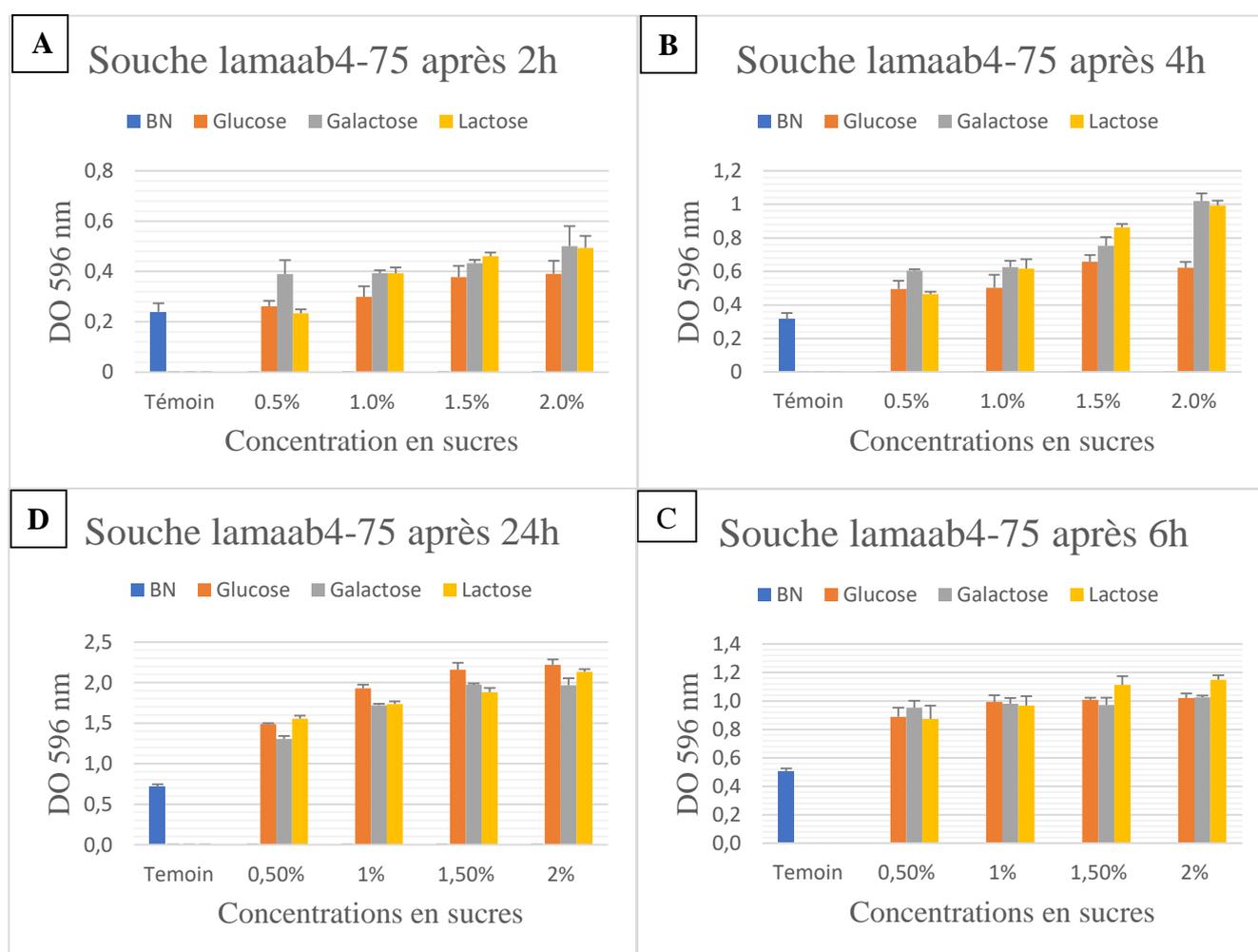


Figure 13 : Quantification de la formation de biofilm (DO_{596nm}) par la souche lamaabe4-75 à 37°C sous différentes concentrations en sucres ((**A**): Après 2h d'incubation, (**B**): Après 4h d'incubation, (**C**): Après 6h d'incubation, (**D**): Après 24h d'incubation).

2.2 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-63 : En ce qui concerne la seconde souche lamaabe4-63 (**figure 14**), les résultats obtenus indiquaient que le lactose à 2% a donné la plus grande valeur après 2h (0,49) (**figure 14, A**) et 4h (0,94) d'incubation respectivement (**figure 14, B**). Après 6h (1,07) (**figure 14, C**) et 24h (2,16) (**figure 14, D**), le glucose à 2% a montré une grande valeur de DO.

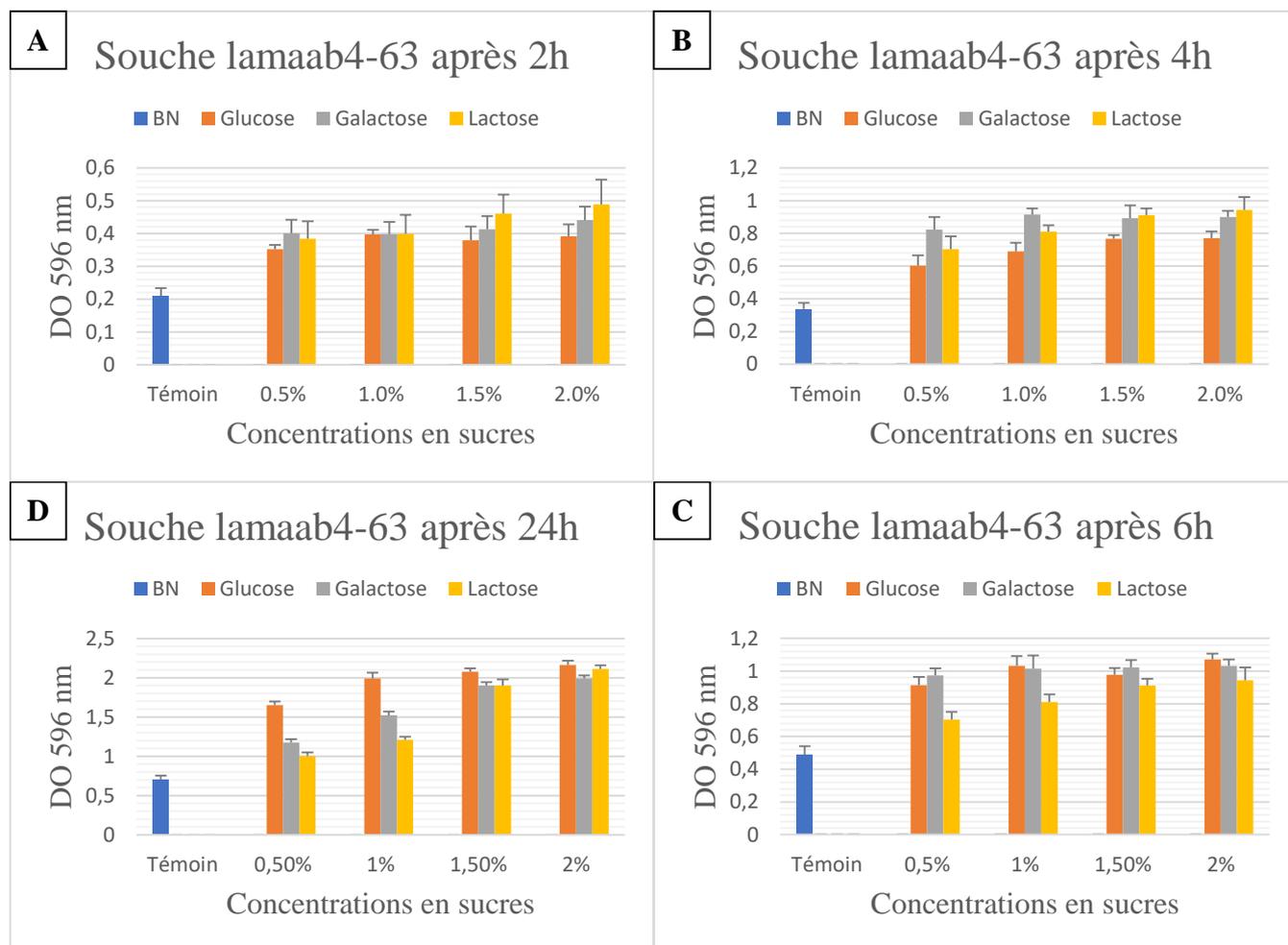


Figure 14 : Quantification de la formation de biofilm (DO_{596nm}) par la souche lamaabe4-63 à 37°C sous différentes concentrations en sucres ((**A**): Après 2h d'incubation, (**B**): Après 4h d'incubation, (**C**): Après 6h d'incubation, (**D**): Après 24h d'incubation).

2.3 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-90 : Pour la dernière souche lamaabe4-90 (**figure 15**), les résultats obtenus indiquaient que le lactose à 2% a montré la valeur la plus élevée après 2h (0,59) (**figure 15, A**) et 6h (1,21) d'incubation (**figure 15, C**), ainsi qu'après 4h (0,93) à 1,5% et 2% (**figure 15, B**). Après 24h, le glucose à 2% a montré la valeur la plus élevée (2,61) (**figure 15, D**).

En analysant ces valeurs, on a observé une tendance générale d'augmentation de la formation de biofilms au fil du temps pour chaque sucre. Les valeurs les plus élevées sont généralement obtenues après 24 heures d'incubation.

Il est important de mentionner que pour chaque souche et chaque période d'incubation, les différentes sources de carbone, à des concentrations spécifiques, ont conduit à des valeurs plus élevées par rapport au témoin. Cela suggère que le glucose, le galactose et le lactose favorisent la formation de biofilms.

Les différents sucres ont démontré une capacité variable à former des biofilms en fonction de la souche étudiée et de la durée d'incubation. Le galactose, le lactose et le glucose ont tous montré des effets significatifs sur la formation des biofilms après différentes périodes d'incubation.

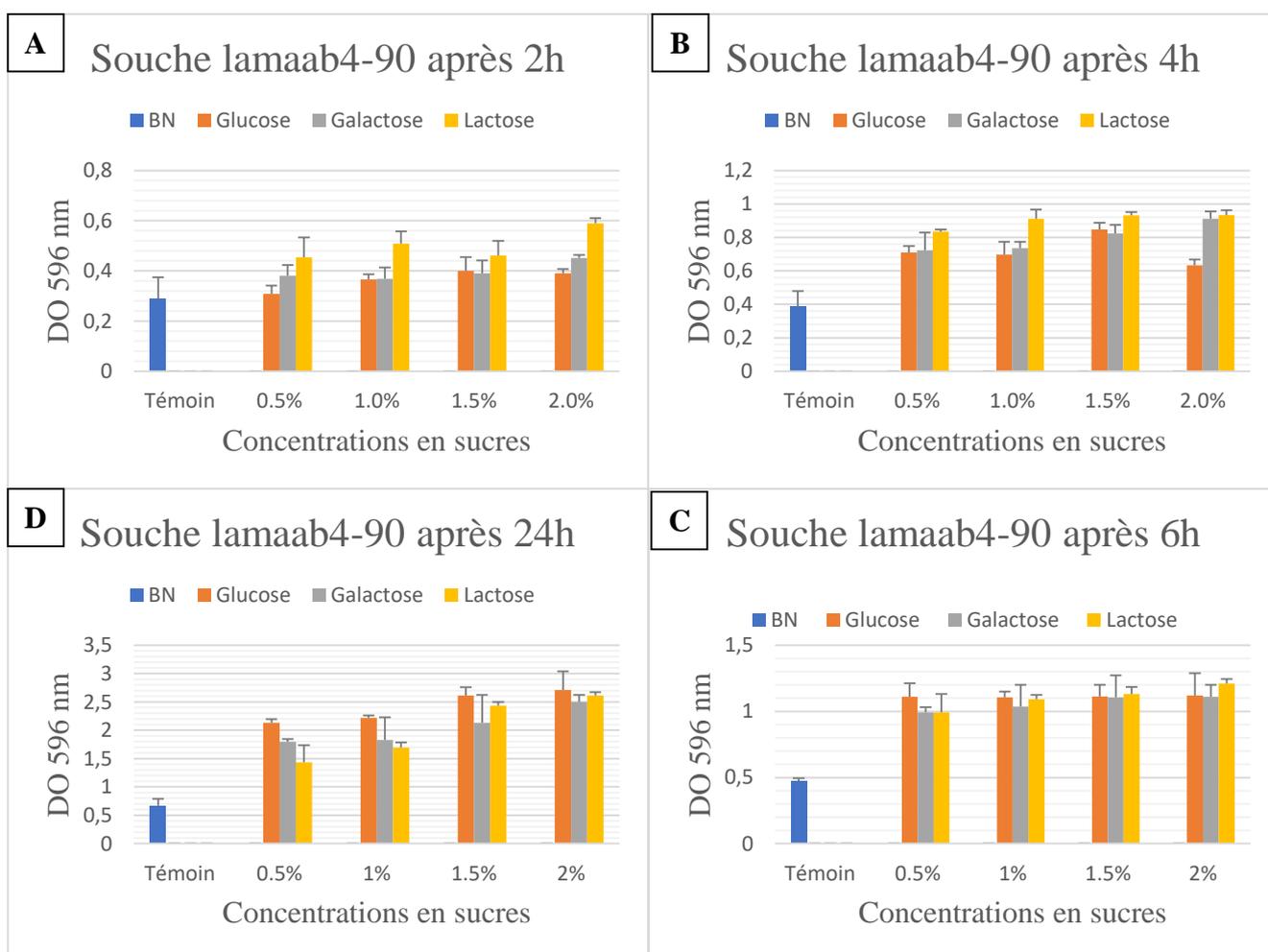


Figure 15 : Quantification de la formation de biofilm (DO_{596nm}) par la souche lamaabe4-90 à 37°C sous différentes concentrations en sucres ((A): Après 2h d'incubation, (B): Après 4h d'incubation, (C): Après 6h d'incubation, (D): Après 24h d'incubation).

Lors de l'incubation pendant 2 heures, les trois souches ont montré des valeurs similaires pour chaque sucre testé. Les valeurs de formation de biofilms étaient relativement faibles pour toutes les souches, avec des variations mineures entre elles. Cela suggère que les souches ont une capacité similaire à amorcer la formation de biofilms à ce stade précoce de l'incubation.

Après 4 heures d'incubation, des différences plus significatives sont observées. La souche lamaabe4-75 a montré les valeurs les plus élevées pour la formation de biofilms avec du galactose, tandis que la souche lamaabe4-63 a montré les valeurs les plus élevées avec du lactose. La souche lamaabe4-90 a montré des valeurs intermédiaires pour tous les sucres. Cela suggère que les différentes souches peuvent avoir des préférences métaboliques différentes en fonction du type de sucre utilisé.

Lors de l'incubation de 6 heures, des différences significatives entre les souches deviennent plus évidentes. La souche lamaabe4-90 a montré les valeurs les plus élevées pour la formation de biofilms avec tous les sucres testés, suivie par les souches lamaabe4-75 et lamaabe4-63. Ces résultats indiquent que la souche lamaabe4-90 a une meilleure capacité à former des biofilms à ce stade d'incubation par rapport aux autres souches.

Enfin, après 24 heures d'incubation, les différences entre les souches deviennent encore plus marquées. La souche lamaabe4-90 a montré les valeurs les plus élevées pour la formation de biofilms avec tous les sucres testés, montrant ainsi une capacité plus élevée à former des biofilms en particulier lors des périodes d'incubation plus longues. Les souches lamaabe4-75 et lamaabe4-63 ont montré des valeurs légèrement inférieures, avec des variations mineures entre les différents sucres.

3. Discussion

Dans l'industrie alimentaire, divers facteurs environnementaux peuvent influencer la formation de biofilms. Parmi ceux-ci, on trouve les surfaces en contact avec les aliments, la disponibilité des nutriments, la température et le temps de maturation (**Kwon et al., 2017**). Dans le secteur laitier, les résidus alimentaires, tels que les produits laitiers contenant des protéines, de la matière grasse et des glucides, servent de substrat aux micro-organismes, favorisant ainsi la formation de biofilms (**Dutra et al., 2018**).

Afin d'étudier l'effet des sources de carbone sur la formation de biofilm chez *K. pneumoniae*, un total de trois sucres à différentes concentrations a été testé pendant quatre durées d'incubation. Les mesures de la densité optique à 596 nm du colorant CV lié au biofilm

formé ont révélé une production significativement plus élevée en présence de sources de carbone supplémentaires par rapport au milieu de culture non additionné. Les résultats obtenus dans cette étude montrent clairement que la concentration optimale pour la formation de biofilm par *K. pneumoniae* était 2% pour tous les sucres testés.

Cependant, une étude récente menée par Silva et ses collaborateurs sur l'effet du glucose à différentes concentrations (0,5%, 1%, 1,5%, 2% et 2,5%) sur la formation de biofilms de staphylocoques a montré que la concentration optimale pour la formation de biofilms dans tous les isolats était de 0,5% de glucose (Silva *et al.*, 2022).

D'autres études antérieures telles que celle effectuée par Rasha *et al.*, (2012), Mathur *et al.*, (2006), ainsi que celle Agarwal et Jain (2013), ont montré une augmentation significative de la formation du biofilm par des isolats de *Staphylococcus* à des différentes concentrations de glucose (Agarwal et Jain 2013 ; Rasha *et al.*, 2012 ; Mathur *et al.*, 2006).

Une comparaison des études de Voronkova et Shevchenko, et Vashchenko *et al.*, concernant l'effet des sucres sur la formation de biofilms par les souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* révèle des similarités. Il a été observé que des concentrations de sucre de 2,5% ou plus ont un effet inhibiteur marqué sur la formation du biofilm, tandis que des concentrations de 0,5% ont un effet presque neutre. De plus, la présence de glucose a un effet stimulant sur la formation de biofilm, tandis que l'ajout de lactose et de galactose a un effet négatif (Vashchenko *et al.*, 2021 ; Voronkova et Shevchenko, 2017).

Akoğlu (2020), a étudié l'effet de certaines conditions environnementales sur la croissance planctonique et la formation de biofilms par certaines bactéries lactiques (LAB) isolées à partir de fromage Mengen, qui est un fromage traditionnel local en Turquie. Il a constaté que l'augmentation des concentrations de lactose et de glucose avait un effet stimulant sur la formation du biofilm de toutes les bactéries lactiques. En fonction de l'augmentation de la concentration en lactose, la souche *Enterococcus faecalis* EC41 est devenue un meilleur producteur de biofilm qu'*Enterococcus lactis* EC61, la meilleure souche productrice de biofilm de l'étude. Dans le milieu contenant 1,5% et plus de lactose, la formation de biofilm a été multipliée par sept. Pour d'autres souches, la concentration en lactose n'a pas pu être aussi efficace pour la formation de biofilms. L'augmentation de la concentration en glucose a également augmenté la capacité de formation de biofilm de la souche *Enterococcus faecalis* EC41 (Akoğlu, 2020).

Une étude menée par Mirkar *et al.*, (2016) avait comme objectif d'étudier l'effet du glucose sur la formation de biofilms par *K. pneumoniae* en utilisant des concentrations de 2%, 4%, 6%, 8% et 10%. Les résultats ont révélé qu'une augmentation de la concentration de glucose favorisait de manière significative la formation de biofilms de *K. pneumoniae*. Cependant, au-delà d'une concentration de 8%, une diminution de la formation de biofilms a été observée (Mirkar *et al.*, 2016). Aussi Ignatova *et al.*, (2023), ont montré que la présence de glucose dans le milieu a stimulé la production de biomasse matricielle uniquement chez les souches de *K. pneumoniae*, quel que soit le pH du milieu, alors que pour les autres espèces telles que *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, la présence de glucose dans le milieu n'a pas stimulé de manière significative la formation de la matrice (Ignatova *et al.*, 2023).

Dans notre étude, des différences significatives ont été observées entre la densité cellulaire des biofilms obtenus après 4, 6 et 24 heures à 37°C pour toutes les souches. La biomasse du biofilm a atteint son pic après 24 heures. De plus, il a été constaté que chaque sucre avait des valeurs élevées à différents durée d'incubation selon les souches étudiées. Cependant, le glucose a montré une influence plus marquée sur la formation de biofilm que le lactose et le galactose après 24 heures d'incubation. Ces résultats suggèrent que les sucres utilisés comme sources de carbone favorisent la formation de biofilms par les souches étudiées.

Dans l'étude de Zou et Liu (2020), les effets des sources de carbone à des concentrations allant de (0 à 10 mg/ml) et de la température (37°C et 55°C) sur la formation des biofilms de *Staphylococcus epidermidis* d'origine alimentaire ont été examinés. Les résultats ont révélé que la présence de glucose, maltose, lactose et saccharose a amélioré la production de biofilm par *S. epidermidis*, avec des variations selon la concentration des suppléments. Des augmentations de biomasse de biofilm ont été observées pour chaque sucre à des concentrations spécifiques (Le rendement de biomasse le plus élevé a été atteint à 2,5 mg/ml pour toutes les sources de carbone à 37°C), montrant ainsi leur rôle dans la formation de biofilms (Zou et Liu, 2020).

Bien que les souches bactériennes et les conditions expérimentales diffèrent entre les deux études, les résultats concordent dans le sens où l'ajout de sources de carbone, favorise la formation de biofilms.

Selon une étude menée par Pan *et al.*, (2010) les effets du glucose (à des concentrations allant de 0,25% à 10%), du sel (de 0,5% à 7%) et de la température (22,5°C, 30°C et 37°C) sur la formation de biofilm de 36 souches de *Listeria monocytogenes* ont été examinés. Les résultats ont révélé que 97% des souches (soit 35 souches) ont développé des biofilms plus épais dans

les milieux contenant du glucose (de 1% à 10%), par rapport aux milieux sans glucose, quelles que soient les trois températures étudiées (**Pan et al., 2010**).

Dans une étude menée par Chai *et al.*, (2012) sur l'effet du métabolisme du galactose sur la formation de biofilm de *Bacillus subtilis*, il a été constaté que les gènes du métabolisme du galactose jouent un rôle majeur dans la formation du biofilm et le développement d'une matrice polysaccharidique (**Chai et al., 2012**).

Les sucres fournissent des nutriments essentiels aux bactéries, favorisant ainsi leur croissance et leur adhésion, ce qui conduit à une augmentation de la biomasse du biofilm. Gauri *et al.*, (2009) ont rapporté que la production d'EPS était affectée par les sources de carbone, le glucose étant identifié comme le promoteur le plus efficace (**Gauri et al., 2009**). En outre, la production d'EPS par les cellules d'*Aureobasidium pullulans* a augmenté dans des conditions où la croissance était prolongée par la forte teneur en glucides du milieu, tels que le glucose, le fructose, le mannose, le maltose, xylose, ribose, arabinose, saccharose et lactose (**Czaczyk et Myszka, 2007**).

Un travail mené par Rinaudo *et al.*, (2010), pour évaluer la capacité des Streptococcus du Groupe B (SGB) a formé des biofilms en présence du glucose. En présence d'une concentration de 0,4% de glucose qu'ils ont observé une adhésion des SGB à la surface et une prolifération (**Rinaudo et al., 2010**).

Selon Ryu et ces collaborateurs (2020), le D-galactose a significativement inhibé la formation de biofilm de *Streptococcus mutans* à toutes les concentrations (0,002-200 mM) utilisées par rapport à un contrôle sans D-galactose. En revanche, le D-galactose a augmenté de manière significative la formation du biofilm de *Streptococcus oralis* à la concentration de 2-200 mM et n'a pas eu d'effet à des concentrations inférieures à 2 mM. Le L-galactose a également inhibé de manière significative la formation du biofilm chez *S. mutans* à des concentrations de 20 mM et 200 mM mais pas à 2 mM. Contrairement au D-galactose, L-galactose n'a pas augmenté la formation du biofilm de *S. oralis*. Au contraire, ce traitement a inhibé la formation du biofilm de *S. oralis* de 52% à 200 mM par rapport au contrôle, et aucun changement significatif n'a été observé aux concentrations de 2 mM ou de 20 mM. Le D-galactose a significativement augmenté la formation de biofilm chez deux souches de *S. mitis* similaire à celle de *S. oralis*. Cependant, l'effet inhibiteur du L-galactose était beaucoup moins important que celui du D-galactose aux concentrations (20 mM et 200 mM). L'application de L-galactose à 200 mM a montré un effet inhibiteur de 70% sur la formation du biofilm par

rapport à 200 mM de D-galactose, alors qu'une activité inhibitrice de seulement 15% de 20 mM de L-galactose par rapport à 20 mM de D-galactose (**Ryu *et al.*, 2020**).

Dans la présente étude, le lactose et le galactose se sont tous révélés être une aussi bonne source de carbone que le glucose, malgré la concentration et le temps d'incubation.

Conclusion

L'objectif de la présente étude est d'étudier l'impact de différentes sources de carbone couramment rencontrées dans l'industrie laitière, notamment le lactose, le glucose et le galactose, sur la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir des lignes de post-pasteurisation de production de lait cru. En analysant les résultats obtenus, nous pouvons tirer plusieurs conclusions significatives.

Dans l'ensemble, les résultats ont montré que les différentes sources de carbone influencent de manière significative la formation de biofilms par *K. pneumoniae* dans l'industrie laitière. Lors des premières heures d'incubation, le lactose a présenté la valeur la plus élevée de formation de biofilms par rapport au glucose et au galactose. Cela suggère que le lactose, en tant que principal sucre présent dans le lait, favorise la formation initiale des biofilms par *K. pneumoniae* dans les conditions de production laitière. Cependant, il est important de noter que le glucose et le galactose ont également montré une capacité significative à induire la formation de biofilm à des concentrations spécifiques.

A mesure que la durée d'incubation augmentait, les sucres continuaient à favoriser la formation de biofilms, avec des valeurs croissantes observées après 4, 6 et 24 heures d'incubation. Cela souligne l'importance des sources de carbone pour la formation de biofilms par *K. pneumoniae* dans l'industrie laitière.

Il est clair que les différentes sources de carbone ont un impact sur la formation de biofilms, mais leur efficacité varie en fonction de la souche bactérienne et de la durée d'incubation. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte ces facteurs lors de la sélection de la source de carbone pour favoriser la formation de biofilm dans divers contextes.

Il est essentiel de noter que cette étude offre un aperçu précieux sur la formation de biofilms par *K. pneumoniae* dans l'industrie laitière, mais elle comporte également certaines limites. Les résultats obtenus *in vitro* doivent être interprétés avec prudence, car des facteurs environnementaux et biologiques supplémentaires peuvent influencer la formation de biofilm.

Dans l'industrie laitière, la formation de biofilms peut entraîner des problèmes de contamination et d'altération de la qualité des produits laitiers, ce qui peut avoir des conséquences économiques et sanitaires importantes. Comprendre les facteurs qui influencent la formation de biofilm, tels que les sources de carbone étudiées dans ce travail est essentiel pour développer des stratégies de prévention et de contrôle efficaces dans l'industrie laitière.

En conclusion, cette étude souligne l'importance des sucres en tant que inducteurs de formation de biofilms par *K. pneumoniae* dans l'industrie laitière. Ces résultats peuvent servir de base pour le développement de mesures préventives et de protocoles de nettoyage appropriés pour minimiser la formation de biofilms et réduire les risques associés dans l'industrie laitière. Des études supplémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents et pour développer des approches plus spécifiques à l'industrie laitière pour contrôler les biofilms bactériens.

Références bibliographiques

A

- **Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014).** Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, vol. 196(7), pp. 453–472.
- **Agarwal, A et Jain, A. (2013).** Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian Journal of Medical Research*, vol. 138(2), pp. 262-266.
- **Akoğlu, A. (2020).** The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology letters*, vol. 42, pp. 481-492.
- **Alonso, V. P. P., de Campos Ferreira, R. C., Cotta, M. A., & Kabuki, D. Y. (2022).** Influence of milk proteins on the adhesion and formation of *Bacillus sporothermodurans* biofilms: Implications for dairy industrial processing. *Food Control*, vol. 134, pp. 108743.
- **Alotaibi, G. F., & Bukhari, M. A. (2021).** Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *Am. J. Biomed. Sci. Res*, vol. 12(6), pp. 617-626.
- **Alsteens, D., Dague, E., Rouxhet, P. G., Baulard, A. R., & Dufrêne, Y. F. (2007).** Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir*, vol. 23(24), pp. 11977-11979.
- **Anderson, G. G., & O'toole, G. A. (2008).** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Bacterial biofilms*, pp. 85-105.

B

- **Bagnol, R., Grijpma, D., Eglin, D., & Moriarty, T. F. (2022).** The production and application of bacterial exopolysaccharides as biomaterials for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, pp. 119550.
- **Balcázar, J. L., Subirats, J., & Borrego, C. M. (2015).** The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, vol. 6, pp. 1216.
- **Bandeira, M., Almeida Carvalho, P., Duarte, A., & Jordao, L. (2014).** Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. *Pathogens*, vol. 3(3), pp. 720-731.
- **Banin, E., Vasil, M. L., & Greenberg, E. P. (2005).** Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102(31), pp. 11076-11081.

- **Banykó, J., & Vyletřlová, M. (2009).** Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in applied microbiology*, vol. 48(3), pp. 318-323.
- **Barcelos, M. C., Vespermann, K. A., Pelissari, F. M., & Molina, G. (2020).** Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 60(9), pp. 1475-1495.
- **Bogino, P. C., Oliva, M. L., Sorroche, F. G., & Giordano, W. (2013).** The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International journal of molecular sciences*, vol. 14(8), pp. 15838–15859.
- **Bos, R., Van der Mei, H. C., Gold, J., & Busscher, H. J. (2000).** Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS microbiology letters*, vol. 189(2), pp. 311-315.
- **Brocklehurst, T. F., Zaman-Wong, C. M., & Lund, B. M. (1987).** A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 63(5), pp. 409-415.
- **Bulati, M., Busà, R., Carcione, C., Iannolo, G., Di Mento, G., Cuscino, N., & Douradinha, B. (2021).** *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharides serotype O2afg induce poor inflammatory immune responses ex vivo. *Microorganisms*, vol. 9(6), pp. 1317.

C

- **Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. (2004).** SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*. vol. 186, pp. 4476-85.
- **Candan, E. D., & Aksöz, N. (2015).** *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochimica Polonica*, vol. 62(4), pp. 867–874.
- **Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F. (2014).** Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, vol. 6, pp. 29-42.
- **Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021).** Microbial Biofilms in the Food Industry-A Comprehensive Review. *International journal of environmental research and public health*, vol. 18(4), pp. 2014.
- **Chai, Y., Beauregard, P. B., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2012).** Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *MBio*, vol. 3(4), pp. e00184-12.

- **Chandki, R., Banthia, P., & Banthia, R. (2011).** Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*, vol. 15(2), pp. 111.
- **Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016).** Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy science & technology*, vol. 96, pp. 27-38.
- **Cirkovic, I. (2021).** Biofilms in the food industry—impact on human health. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 854(1), pp. 012015. IOP Publishing.
- **Clegg, S., & Murphy, C. N. (2017).** Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, pp. 435-457.
- **Conrad, J. C. (2012).** Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Research in Microbiology*, vol. 163(9-10), pp. 619-629.
- **Conrad, J. C., Gibiansky, M. L., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A., Wong, G. C. L. (2011).** Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, vol. 100(7), pp. 1608–1616.
- **Costerton, J. W. (2004).** A short history of the development of the biofilm concept. *Microbial biofilms*, pp. 4-19.
- **Costerton, J. W., & Stewart, P. S. (2001).** Battling biofilms. *Scientific American*, vol. 285(1), pp. 74-81.
- **Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978).** How bacteria stick. *Scientific American*, vol. 238(1), pp. 86-95.
- **Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, vol. 284(5418), pp. 1318-1322.
- **Cramton, S. E., Ulrich, M., Götz, F., & Döring, G. (2001).** Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*, vol. 69(6), pp. 4079-4085.
- **Cui, Y., Jiang, X., Hao, M., Qu, X., & Hu, T. (2017).** New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus*. *Archives of Microbiology*, vol. 199, pp. 799-809.
- **Cusumano, J. A., Caffrey, A. R., Daffinee, K. E., Luther, M. K., Lopes, V., & LaPlante, K. L. (2019).** Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 95(4), pp. 114877.

- **Czaczyk, K., & Myszka, K. (2007).** Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 16(6), pp. 799.

D

- **Da Silva Meira, Q. G., de Medeiros Barbosa, I., Athayde, A. J. A. A., de Siqueira-Júnior, J. P., & de Souza, E. L. (2012).** Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*, vol. 25(2), pp. 469-475.
- **Daeschel, M. A., & McGuire, J. (1998).** Interrelationships between protein surface adsorption and bacterial adhesion. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 15(1), pp. 413-438.
- **Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000).** Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of bacteriology*, vol. 182(12), pp. 3593-3596.
- **Davies, D. G. (2011).** Biofilm dispersion. *Biofilm highlights*, pp. 1-28.
- **Dawson, L. F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E. H., & Wren, B. W. (2012).** Characterisation of *Clostridium difficile* biofilm formation, a role for Spo0A. *PloS one*, vol. 7(12), pp. 50527.
- **Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2003).** *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in microbiology*, vol. 154(1), pp. 9-16.
- **Donlan R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, vol. 8(9), pp. 881–890.
- **Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, vol. 15(2), pp. 167–193.
- **Dunne Jr, W. M. (2002).** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, vol. 15(2), pp. 155-166.
- **D'Urzo, N., Martinelli, M., Pezzicoli, A., De Cesare, V., Pinto, V., Margarit, I., Telford, J. L., Maione, D., & Members of the DEVANI Study Group (2014).** Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* strains. *Applied and environmental microbiology*, vol. 80(7), pp. 2176–2185.
- **Dutra, T. V., Fernandes, M. D. S., Perdoncini, M. R. F. G., Anjos, M. M. D., & Abreu Filho, B. A. D. (2018).** Capacity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to produce

biofilm on stainless steel surfaces in the presence of food residues. *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 42(4), pp. 13574.

- **Dwivedi, D., & Sehgal, T. (2022).** Biofilm Development in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Focus on Bacterial Biofilms*.

F

- **Fertas-Aissani, E. L. R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, vol. 61(5), pp. 209-216.
- **Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, vol. 8(9), pp. 623-633.
- **Fratamico, P. M., Annous, B. A., & Guenther, N. W. (Eds.). (2009).** *Biofilms in the food and beverage industries*. Elsevier.
- **Fu, L., Wu, C., Zhou, Y., Zuo, J., & Ding, Y. (2017).** Investigation on evaluation criteria of backwashing effects for a pilot-scale BAF treating petrochemical wastewater. *Environmental technology*, vol. 38(20), pp. 2523–2533.
- **Fysun, O., Kern, H., Wilke, B., & Langowski, H. C. (2019).** Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing equipment. *Food and bioproducts processing*, vol. 113, pp. 39-48.

G

- **Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, TG. (2004).** Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, pp. 26-120.
- **Gauri, S. S., Mandal, S. M., Mondal, K. C., Dey, S., & Pati, B. R. (2009).** Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter sp.* SSB81. *Bioresource Technology*, vol. 100(18), pp. 4240-4243.
- **Goller, CC., Romeo, T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, vol. 322, pp. 37-66.
- **Gomes, I. B., Meireles, A., Gonçalves, A. L., Goeres, D. M., Sjollema, J., Simões, L. C., & Simões, M. (2018).** Standardized reactors for the study of medical biofilms: a review of the principles and latest modifications. *Critical reviews in biotechnology*, vol. 38(5), pp. 657–670.

- **Gomes, L. C., Moreira, J. M., Teodósio, J. S., Araújo, J. D., Miranda, J. M., Simões, M., Melo, L. F., & Mergulhão, F. J. (2014).** 96-well microtiter plates for biofouling simulation in biomedical settings. *Biofouling*, vol. 30(5), pp. 535–546.
- **Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., & Converso, T. R. (2022).** *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, pp. 555.
- **Guilhen, C. (2017).** *Caractérisations transcriptionnelle et phénotypique de bactéries dispersées de biofilm à Klebsiella pneumoniae* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne [2017-2020]).

H

- **Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, vol. 2(2), pp. 95–108.
- **Hammond, J. F., Stewart, E. J., Younger, J. G., Solomon, M. J., & Bortz, D. M. (2013).** Spatially heterogeneous biofilm simulations using an immersed boundary method with lagrangian nodes defined by bacterial locations. *arXiv preprint arXiv:1302.3663*, pp.3
- **Herald, P. J., & Zottola, E. A. (1988).** Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food science*, vol. 53(5), pp. 1549-1562.
- **Hilbert, L. R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., & Gram, L. (2003).** Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International biodeterioration & biodegradation*, vol. 52(3), pp. 175-185.
- **Høiby, N. (2014).** A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and disease*, vol. 70(3), pp. 205-211.
- **Høiby, N. (2017).** A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, vol. 125(4), pp. 272-275.
- **Horn, H., Reiff, H., & Morgenroth, E. (2003).** Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 81(5), pp. 607–617.
- **Horng, Y. T., Panjaitan, N. S. D., Chang, H. J., Wei, Y. H., Chien, C. C., Yang, H. C., & Soo, P. C. (2021).** A protein containing the DUF1471 domain regulates biofilm formation and capsule production in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.

- **Hošťacká, A., Čížnár, I., & Štefkovičová, M. (2010).** Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia microbiologica*, vol. 55, pp. 75-78.
- **Huang, C. Y., Hsieh, S. P., Kuo, P. A., Jane, W. N., Tu, J., Wang, Y. N., & Ko, C. H. (2009).** Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 63(8), pp. 998-1007.
- **Huynh, D. T. N., Kim, A. Y., & Kim, Y. R. (2017).** Identification of pathogenic factors in *Klebsiella pneumoniae* using impedimetric sensor equipped with biomimetic surfaces. *Sensors*, vol. 17(6), pp. 1406.

I

- **Ignatova, N., Abidullina, A., Streltsova, O., Elagin, V., & Kamensky, V. (2023).** Effect of pH, Norepinephrine and Glucose on Metabolic and Biofilm Activity of Uro pathogenic Microorganisms. *Microorganisms*, vol. 11(4), pp. 862.

J

- **James, G. A., Boegli, L., Hancock, J., Bowersock, L., Parker, A., & Kinney, B. M. (2019).** Bacterial adhesion and biofilm formation on textured breast implant shell materials. *Aesthetic plastic surgery*, vol. 43, pp. 490-497.
- **Joseph, L.** Étude de nouveaux facteurs de pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae* : caractérisation du fimbriae de type “ chaperone-usher ” Kpg et de la pompe à efflux MdtJI. Th. doct : Microbiologie et parasitologie : Université Clermont Auvergne, 2022.
- **Joseph, L., Merciecca, T., Forestier, C., Balestrino, D., & Miquel, S. (2021).** From *Klebsiella pneumoniae* colonization to dissemination: an overview of studies implementing murine models. *Microorganisms*, vol. 9(6), pp. 1282.

K

- **Karimi, A., Karig, D., Kumar, A., & Ardekani, A. M. (2015).** Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods. *Lab on a Chip*, vol. 15(1), pp. 23-42.
- **Kassis-Chikhani, N.** *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial résistance et virulence. Th. doct : Microbiologie : Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 2012.

- **Katsikogianni, M., & Missirlis, Y. F. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*, vol. 8(3), pp. 37-57.
- **Khelissa, S. O. (2017).** *Characterization of physiological properties associated with biofilm-detached cells and study of interactions between bacteria and materials: case of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa* (Doctoral dissertation, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I).
- **Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013).** Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 3(4), pp. 010306.
- **Kuş, H., Arslan, U., Dağı, H. T., & Findik, D. (2017).** Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, vol. 51(4), pp. 329-339.
- **Kwon, M., Hussain, M. S., & Oh, D. H. (2017).** Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. *Food science and biotechnology*, vol. 26, pp. 1103-1111.

L

- **Lebeaux, D., & Ghigo, J. M. (2012).** Infections associées aux biofilms : quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? [Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?]. *Medecine sciences : M/S*, vol. 28(8-9), pp. 727-739.
- **Leclere, H., Gaillard, J-L., & Simonet, M. (1995).** Microbiologie générale « la bactérie et le monde bactérien ». Paris : Doin, pp. 419-425.
- **Lembre, P., Lorentz, C., & Di Martino, P. (2012).** Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. *The complex world of polysaccharides*, pp. 371-392.
- **Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., & Ibragimova, A. (2020).** Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Veterinary world*, vol. 13(1), pp. 197.
- **Li, X., Wang, Y., Yao, Z., Chen, S., Shen, J., & Wang, Y. (2019).** *Klebsiella pneumoniae* in raw milk: prevalence, antibiotic resistance and pathogenicity factors. *Journal of dairy science*, vol. 102(4), pp. 2907-2915.

- **Lianou, A., Koutsoumanis, K.P. (2017).** Assessment of cell surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* under various environmental conditions by using microbial adhesion to hydrocarbons method. *Journal of Food Protection*, vol. 80(9), pp. 1509-1514.
- **Lin, M. H., Shu, J. C., Huang, H. Y., & Cheng, Y. C. (2012).** Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PloS one*, vol. 7(3), pp. 34388.
- **Liu, X., Yao, H., Zhao, X., & Ge, C. (2023).** Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*, vol. 28(6), pp. 2432.
- **Liu, Y., & Tay, J. H. (2001).** Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *Journal of applied microbiology*, vol. 90(3), pp. 337–342.
- **Iliquer, M.** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U. de Nantes, 2010.

M

- **Ma, R., Hu, X., Zhang, X., Wang, W., Sun, J., Su, Z., & Zhu, C. (2022).** Strategies to prevent, curb and eliminate biofilm formation based on the characteristics of various periods in one biofilm life cycle. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 12, pp. 1003033.
- **Magnusson, M., Christiansson, A., & Svensson, B. (2007).** *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *Journal of dairy science*, vol. 90(6), pp. 2745-2754.
- **Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A., & Ton-That, H. (2008).** Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in microbiology*, vol. 16(1), pp. 33-40.
- **Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2012).** Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 11(2), pp. 133-147.
- **Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018).** Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 8, pp. 4.

- **Mashruwala, A. A., Guchte, A. V. D., & Boyd, J. M. (2017).** Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Elife*, vol. 6, pp. 23845.
- **Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020).** Characterization of Klebsiella isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *Journal of dairy science*, vol. 103(4), pp. 3392-3400.
- **Mathlouthi, A., Pennacchietti, E., & De, B. D. (2018).** Effect of temperature, pH and plasmids on in vitro biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, vol. 10.4 (39), pp. 129-132.
- **Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, DJ., Fatma, T., Rattan, A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, vol. 24 (1), pp. 25-9.
- **McWhirter, M. J., McQuillan, A. J., & Bremer, P. J. (2002).** Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZnSe and to TiO₂ monitored by ATR-IR spectroscopy. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 26(4), pp. 365-372.
- **Mirkar, K., Rawat, A., & Satish, R. (2016).** Effect of environmental factors on biofilm formation. *Indian Journal of Life Sciences*, vol. 5(2), pp. 53-65.
- **Mogha, K. V., Shah, N. P., Prajapati, J. B., & Chaudhari, A. R. (2014).** Biofilm-A threat to dairy industry. *Indian J. Dairy Sci*, vol. 67(6), pp. 459-466.
- **Molobela, I. P., & Ilunga, F. M. (2012).** Impact of bacterial biofilms: the importance of quantitative biofilm studies. *Annals of microbiology*, vol. 62, pp. 461-467.
- **Moreno-Castilla, C. (2004).** Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon*, vol. 42(1), pp. 83-94.
- **Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020).** *Medical microbiology E-book* (9th Edition). Elsevier Health Sciences.

N

- **Nagar, E., Zilberman, S., Sendersky, E., Simkovsky, R., Shimoni, E., Gershtein, D., & Schwarz, R. (2017).** Type 4 pili are dispensable for biofilm development in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environmental microbiology*, vol. 19(7), pp. 2862-2872.

- **Namikawa, H., Niki, M., Niki, M., Oinuma, K. I., Yamada, K., Nakaie, K., & Shuto, T. (2022).** Siderophore production as a biomarker for *Klebsiella pneumoniae* strains that cause sepsis: A pilot study. *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 121(4), pp. 848-855.
- **Nostro, A., Cellini, L., Di Giulio, M., D'Arrigo, M., Marino, A., Blanco, A. R., Favaloro, A., Cutroneo, G., & Bisignano, G. (2012).** Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation. *APMIS. acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 120(9), pp. 733–742.

O

- **Oda, S., & Tanikawa, A. (2022).** A new plate-hanging method for biofilm quantification and its application to evaluate the role of surface hydrophobicity. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 203, pp. 106608.
- **Olanbiwoninu, A. A., & Popoola, B. M. (2023).** Biofilms and their impact on the food industry. *Saudi journal of biological sciences*, vol. 30(2), pp. 103523.

P

- **Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016).** *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, vol. 80(3), pp 629-661.
- **Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2015).** Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: a review. *Postdoc j.*, (ART-2015-95845).
- **Pan, Y., Breidt Jr, F., & Gorski, L. (2010).** Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76(5), pp. 1433-1441.
- **Paolozzi, L., & Liébart, J. C. (2015).** Microbiologie. *Dunod*, France.
- **Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003).** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology*, vol. 57, pp. 677–701.
- **Petruzzi, B., & Inzana, T. J. (2016).** Exopolysaccharide production and biofilm formation by *Histophilus somni*. *Histophilus somni: Biology, Molecular Basis of Pathogenesis, and Host Immunity*, pp. 149-160.
- **Proft, T., & Baker, E. N. (2008).** Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66(4), pp. 613–635.

- **Purevdorj, B., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2002).** Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68(9), pp. 4457–4464.

Q

- **Qi, P. S., Wang, W. B., & Qi, Z. (2008).** Effect of shear stress on biofilm morphological characteristics and the secretion of extracellular polymeric substances. In *2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 3438-3441).

R

- **Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015).** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, vol. 7(4), pp. 493-512.
- **Racha A N., Abu Shady H M., Hussein H S. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic*, vol. 13, pp. 269–274.
- **Ranghino, P., Pavan, M. E., Rivas, M., & Quiroga, M. E. (2017).** *Klebsiella pneumoniae* in the dairy industry: Dynamics of biofilm formation and biocide tolerance. *Food control*, vol. 80, pp. 191-198.
- **Regina, V. R., Lokanathan, A. R., Modrzyński, J. J., Sutherland, D. S., & Meyer, R. L. (2014).** Surface physicochemistry and ionic strength affects eDNA's role in bacterial adhesion to abiotic surfaces. *PloS one*, vol. 9(8), pp. 105033.
- **Remya, P. A., Shanthi, M., & Sekar, U. (2019).** Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian journal of medical microbiology*, vol. 37(2), pp. 210-218.
- **Rinaudo, C. D., Rosini, R., Galeotti, C. L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., Ghezzi, C., Telford, J. L., & Maione, D. (2010).** Specific Involvement of Pilus Type 2a in Biofilm Formation in Group B Streptococcus. *PLoS One*, vol. 5(2).
- **Rochex, A., Godon, J. J., Bernet, N., & Escudié, R. (2008).** Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water research*, vol. 42(20), pp. 4915–4922.

- **Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., & Møretrø, T. (2007).** Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International journal of food microbiology*, vol. 116(3), pp. 372-383.
- **Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, vol. 159(3), pp. 261-268.
- **Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020).** Biofilm dispersion. *Nature reviews. Microbiology*, vol. 18(10), pp. 571–586.
- **Ryu, E. J., An, S. J., Sim, J., Sim, J., Lee, J., & Choi, B. K. (2020).** Use of d-galactose to regulate biofilm growth of oral streptococci. *Archives of Oral Biology*, vol. 111, pp. 104666.

S

- **Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016).** Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 7, pp. 56–66.
- **Sauer, K., Rickard, AH., Davies, DG. (2007).** Biofilms and biocomplexity, vol. 2, pp. 347–353.
- **Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., Rezagholizadeh, F., Saeed, Y., Shirvani, F., & Hourri, H. (2016).** Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur journal of microbiology*, vol. 9(1).
- **Sheng, X., Ting, Y. P., & Pehkonen, S. O. (2008).** The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 321(2), pp. 256-264.
- **Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2013).** Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 103, pp. 448-454.
- **Silva, V., Pereira, J. E., Maltez, L., Poeta, P., & Igrejas, G. (2022).** Influence of Environmental Factors on Biofilm Formation of Staphylococci Isolated from Wastewater and Surface Water. *Pathogens*, vol. 11(10), pp. 1069.
- **Simões, M., Pereira, M. O., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Vieira, M. J. (2007).** The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, vol. 23(3-4), pp. 249–258.

- **Siu, L. K., Yeh, K. M., Lin, J. C., Fung, C. P., & Chang, F. Y. (2012).** *Klebsiella pneumoniae* liver abscess : a new invasive syndrome. *The Lancet infectious diseases*, vol. 12(11), pp. 881-887.
- **Smoot, L. M., & Pierson, M. D. (1998).** Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of food protection*, vol. 61(10), pp. 1293-1298.
- **Speranza, B., & Corbo, M.R. (2017).** The impact of Biofilm on Food Spoilage. *The Microbiological Quality of Food*, pp. 259-282.
- **Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013).** Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food control*, vol. 31(2), pp. 572-585.
- **Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 56(1), pp. 187-209.

T

- **Te Giffel, M. C., & Beumer, R. R. (1998).** Isolation, identification and characterization of *Bacillus cereus* in the dairy industry. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, vol. 123(21), pp. 628-632.
- **Tilahun, A., Haddis, S., Teshale, A., & Hadush, T. (2016).** Review on biofilm and microbial adhesion. *Int J Microbiol Res*, vol. 7(3), pp. 63-73.
- **Trego, A. C., O'Sullivan, S., Quince, C., Mills, S., Ijaz, U. Z., & Collins, G. (2020).** Size Shapes the Active Microbiome of Methanogenic Granules, Corroborating a Biofilm Life Cycle. *mSystems*, vol. 5(5), pp. 00323-20.
- **Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms : their importance in animal health and public health]. *Canadian journal of veterinary research : Revue canadienne de recherche veterinaire*, vol. 78(2), pp. 110-116.
- **Tuson, H. H., & Weibel, D. B. (2013).** Bacteria–surface interactions. *Soft matter*, vol. 9(17), pp. 4368-4380.

V

- **Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., & Zehnder, A. (1987).** The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and environmental microbiology*, vol. 53(8), pp. 1893-1897.

- **Van Oss, C. J. (1997).** Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 2(5), pp. 503-512.
- **Vashchenko, A. O., Voronkova, Y. S., Kulyk, E. E., Snisar, O. S., Sidashenko, O. I., & Voronkova, O. S. (2021).** Influence of sugars on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, vol. 12(2), pp. 321-325.
- **Voronkova, O. S., & Shevchenko, T. M. (2017).** Influence of different concentrations of sugars on the *staphylococcus aureus* biofilm formation. *Social Science and Humanity*, vol. (2), pp. 29-36.
- **Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014).** Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, vol. 3(3), pp. 743-758.

W

- **Wu, C. C., Huang, Y. J., Fung, C. P., & Peng, H. L. (2010).** Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpCI. *Microbiology*, vol. 156(7), pp. 1983-1992.
- **Wyres, K. L., Lam, M. M., & Holt, K. E. (2020).** Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 18(6), pp. 344-359.

X

- **Xue, T., Chen, X., & Shang, F. (2014).** Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *Journal of dairy science*, vol. 97(10), pp. 6129–6134.

Y

- **Yadav, M. K. (2017).** Role of biofilms in environment pollution and control. *Microbial Biotechnology : Applications in Agriculture and Environment*, vol. 1, pp. 377-398.

Z

- **Zhang, W., Sileika, T. S., Chen, C., Liu, Y., Lee, J., & Packman, A. I. (2011).** A novel planar flow cell for studies of biofilm heterogeneity and flow-biofilm interactions. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 108(11), pp. 2571–2582.
- **Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H. E., He, L., Heo, J., & Hwang, G. (2021).** Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on

Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 9, pp. 643722.

- **Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021).** Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, vol. 12, pp. 642484.
- **Zhu, Y., Weiss, E. C., Otto, M., Fey, P. D., Smeltzer, M. S., & Somerville, G. A. (2007).** *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infection and immunity*, vol. 75(9), pp. 4219-4226.
- **Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2010).** A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *The new microbiologica*, vol. 33(2), pp. 137–145.
- **Zou, M., & Liu, D. (2020).** Effects of carbon sources and temperature on the formation and structural characteristics of food-related *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Food Science and Human Wellness*, vol. 9(4), pp. 370-376.

Annexes

1. Milieux de culture : Quatre milieux de culture différents sont utilisés dans ce travail : le BHIB (Brain Heart Infusion Broth) (Fluka, Inde), le milieu Mac Conkey (Fluka, Inde), la gélose nutritive et le BN (Bouillon Nutritif) (Pronadisa, Spain).

2. Matériel et équipements de laboratoire : Le matériel de laboratoire utilisé est stérilisé pour éviter toutes contaminations qui pourraient nuire à l'interprétation des résultats durant la manipulation. Le matériel et équipements de laboratoire sont :

2.1 Le gros matériel : autoclave, étuves d'incubation (37°C), microonde, four pasteur, spectrophotomètre.

2.2 Le petit matériel : microscope optique, densitomètre, plaque chauffante agitatrice, bec bunsen, balance de précision, micropipettes (de 100 à 1000 µl, et de 2 à 20 µl), pince, anse de platine, boîtes de pétri, microplaques de titration, barreau magnétique, portoir.

2.3 Les verreries : tubes à essai, verre de montre (coupelle), entonnoir, éprouvette graduée (1000 ml), pipette graduée, flacons, Erlen Meyer (500 ml), lame, lamelle, pipette pasteur.

2.4 Les produits : Bleu de méthylène, huile d'immersion, eau distillée stérile, source de carbone (galactose, lactose, glucose), cristal violet à 0,1%, acide acétique à 33%, papier aluminium, papier essuie tout, parafilm.

3. Préparation des milieux

3.1 BHIB : On mesure 9,25 g de poudre de BHIB à l'aide d'une balance, puis on l'ajoute à 250 ml d'eau distillé, le tout dans une Erlen Meyer avec un barreau magnétique sur une plaque chauffante.

3.2 Le milieu Mac conkey : On mesure 52 g de poudre du Mac conkey à l'aide d'une balance, puis on l'ajoute à 1 litre d'eau distillé, le tout dans une Erlen Meyer avec un barreau magnétique sur une plaque chauffante.

La stérilisation des deux milieux se fait dans l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

ملخص

البيوفيلم عبارة عن هياكل ميكروبية معقدة تتشكل عندما تلتصق مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة بسطح وتغطي نفسها بمصفوفة واقية. يمكن أن يكون تكوين البيوفيلم مشكلة في صناعة الأغذية لأن هذه الهياكل تعزز تلوث المنتجات بمسببات الأمراض وعوامل التلف. تركز هذه الدراسة على تأثير مصادر الكربون على تكوين البيوفيلم في صناعة الألبان. كان الهدف هو تقييم قدرة ثلاث سلالات من *K. pneumoniae* المعزولة من خطوط ما بعد بسترة الحليب الخام لتشكيل أغشية حيوية في وجود سكريات مختلفة (اللاكتوز والجلوكوز والجالاكتوز). تضمنت المنهجية حضانة سلالات بتركيزات مختلفة من السكريات وتقييم تكوين البيوفيلم في فترات زمنية محددة. أظهرت النتائج أن السكريات لها تأثيرات متغيرة على تكوين الأغشية الحيوية، اعتمادًا على السلالة وفترة الحضانة. فضل اللاكتوز تكوينًا أوليًا عاليًا للأغشية الحيوية، مما يشير إلى دوره الغالب في ظروف إنتاج الحليب. ومع ذلك، بعد 24 ساعة من الحضانة، وجد أن الجلوكوز هو أهم محفز للأغشية الحيوية لجميع السلالات. في الختام، تسلط هذه الدراسة الضوء على أهمية النظر في مصادر الكربون في صناعة الألبان، لأنها تؤثر على تكوين الأغشية الحيوية. سيساعد فهم هذه التفاعلات في تطوير استراتيجيات التحكم للحفاظ على جودة الأغذية وسلامتها في هذه الصناعة.

الكلمات المفتاحية : *Klebsiella pneumoniae*, البيوفيلم, مصدر الكربون, صناعة الألبان.

Résumé

Les biofilms sont des structures microbiennes complexes qui se forment lorsqu'un groupe de microorganismes adhère à une surface et se recouvre d'une matrice protectrice. La formation de biofilms peut être problématique dans l'industrie alimentaire car ces structures favorisent la contamination des produits par des agents pathogènes et d'altération. Cette étude se focalise sur l'influence des sources de carbone sur la formation de biofilms dans l'industrie laitière. L'objectif était d'évaluer la capacité de trois souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des lignes de post-pasteurisation du lait cru à former des biofilms en présence de différents sucres (lactose, glucose et galactose). La méthodologie comprenait l'incubation des souches avec différentes concentrations de sucres et l'évaluation de la formation de biofilms à des intervalles de temps spécifiques. Les résultats montrent que les sucres ont des effets variables sur la formation de biofilms, en fonction de la souche et de la durée d'incubation. Le lactose a favorisé une formation initiale élevée de biofilms, indiquant son rôle prépondérant dans les conditions de production laitière. Toutefois, après 24 heures d'incubation, le glucose s'est avéré l'inducteur le plus significatif de biofilms pour toutes les souches. En conclusion, cette étude souligne l'importance de prendre en compte les sources de carbone dans l'industrie laitière, car elles influencent la formation de biofilms. Comprendre ces interactions permettra de développer des stratégies de contrôle pour maintenir la qualité et la sécurité alimentaire dans cette industrie.

Mot clés : *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, source de carbone, l'industrie laitière.

Abstract

Biofilms are complex microbial structures that form when a group of microorganisms adhere to a surface and are covered by a protective matrix. The formation of biofilms can be problematic in the food industry as these structures promote contamination of products by pathogens and spoilage agents. This study focuses on the influence of carbon sources on biofilm formation in the dairy industry. The objective was to evaluate the ability of three strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from post-pasteurization lines of raw milk to form biofilms in the presence of different sugars (lactose, glucose, and galactose). The methodology involved incubating the strains with different concentrations of sugars and assessing biofilm formation at specific time intervals. The results show that sugars have varying effects on biofilm formation, depending on the strain and incubation time. Lactose favored high initial biofilm formation, indicating its predominant role in dairy production conditions. However, after 24 hours of incubation, glucose emerged as the most significant inducer of biofilms for all strains. In conclusion, this study highlights the importance of considering carbon sources in the dairy industry as they influence biofilm formation. Understanding these interactions will enable the development of control strategies to maintain quality and food safety in this industry.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, carbon source, dairy industry.