

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par
ALLAOUA Rania
KHELKHEL Aimene
En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences Biologiques, Option Microbiologie fondamentale

**L'effet des conditions environnementales sur la formation de
biofilm par *Pseudomonas aeruginosa***

Soutenu le 23/06/2023, devant le jury composé de :

Présidente	Mme. BENDIMERAD Nahida	MCB	Université de Tlemcen
Promotrice	Mme. CHERIF ANNTAR Asmaa	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BELLIFA Samia	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2023/2024

Remerciements

Avant toute chose, nos remerciements vont à Dieu le tout puissant qui nous a éclairé les chemins du savoir et nous a maintenu en santé pour mener à bien cette année d'étude et de nous avoir donné la volonté, le courage et la patience pour réaliser ce travail de recherche.

Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre encadrant Madame **CHERIF ANNTAR Asma**, Maître de Conférences A, Université de Tlemcen. Cela a été un réel plaisir de travailler sous sa direction. Ses capacités d'encadrement, d'orientation, et d'écoute ainsi que sa patience, et surtout sa disponibilité à diriger ce travail, nous ont permis de nous améliorer. Nous n'espérons que la confiance que vous nous avez accordée et que ce mémoire est à la hauteur de vos espérances. Veuillez croire, à tout notre respect et nos reconnaissances.

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

Madame **BENDIMRED Nahida**, Maître de Conférences B, Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury de ce mémoire, merci pour votre confiance, votre bienveillance et votre joie de vivre. Soyez assurée de notre profonde reconnaissance.

Madame **BELLIFA Samia**, Maître de Conférences A, Université de Tlemcen, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements vont également à Monsieur **GEZZENE Samir**, ingénieur du laboratoire, Université de Tlemcen, son orientation au laboratoire, sa rigueur et façon de travailler nous ont permis d'être plus attentives. Votre gentillesse et vos conseils nous ont beaucoup touchés et encouragés tout au long de ce travail.

Ce mémoire a été effectué dans le laboratoire de Microbiologie de l'Institut des Sciences et Techniques Appliquées (ISTA-Université de Tlemcen) et le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE- Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen). Cela a été un grand privilège d'y travailler. Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avant tout, louange au Dieu le plus puissant pour ce qu'il nous a donné, comme santé, volonté et surtout patience pour pouvoir achever ce modeste travail

Je dédie ce travail,

À mon adorable et très chère maman

Ce travail est le fruit de vos efforts, aucune dédicace ne pourrait exprimer ma profonde gratitude, mon éternel amour, mon respect et ma considération pour tous vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement.

Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée.

Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

À mon très cher père

Tout l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers un être très cher. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin.

Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père.

J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

À ma chère sœur HADJER WISSAL

Qui fait de mon univers une merveille, les mots ne suffisent pas pour exprimer l'attachement et l'affection que je porte pour toi, j'ai vraiment été bénie d'avoir une sœur innocente comme toi.

Félicitations pour ta licence ma petite sœur, que ta licence soit le début d'un parcours brillant qui te mènera jusqu'au doctorat, incha'Allah.

J'implore Dieu qu'il t'apporte le bonheur et t'aide à réaliser tous tes rêves.

À mon cher frère AYMEN

A toi, mon bras droit pour que tu sois fier de ta grande sœur. Il n'y a rien de tel qu'un ami le plus cool au monde et un frère réuni en un seul, c'est l'occasion pour moi de te remercier très sincèrement pour tes encouragements, les mots sont insuffisants pour exprimer ma profonde estime.

Je te souhaite le meilleur de ce que la vie peut t'offrir, que dieu te protège et te bénisse pour moi.

À la mémoire de mes grands-parents

J'imagine quelle serait ta joie aujourd'hui, j'aurai voulu que vous assistiez à l'aboutissement de ces années de dur labeur, Dieu en a décidé autrement.

Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour votre âme. Que vous reposiez dans le paradis du seigneur.

À ma très chère tante ZINEB

Je vous dédie cette thèse pour tes attentions particulières, tes prières et ton amour inconditionnel. Merci pour tout et que Dieu te donne bonne santé et longue vie parmi nous.

Ces quelques lignes, ne sauraient traduire le profond amour que je te porte. Ta bonté, ton précieux soutien, ton encouragement tout au long de mes années d'étude, ton amour et ton affection, ont été pour moi l'exemple de persévérance.

À mes très chères copines LINA, ASMA, KHOULOUUD et ABIR

Avec qui j'ai passée de bons comme de mauvais moments mais qui reste tout de même des moments inoubliables. Fière et heureuse d'avoir construit cette amitié avec vous.

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



Avec toute mon affection, Rania

Dédicaces

Avant tout, louange au Dieu le plus puissant pour ce qu'il nous a donné, comme santé, volonté et surtout patience pour pouvoir achever ce modeste travail

Je dédie ce travail,

À ma très chère maman

Ce travail est le fruit de vos efforts, aucune dédicace ne pourrait exprimer ma profonde gratitude, mon éternel amour, mon respect et ma considération pour tous vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement.

Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée.

Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

À mon très cher père

Tout l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers un être très cher. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin.

Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père.

J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

À mon cher frère Khaled

À la mémoire de mes grands-parents

Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour votre âme. Que vous reposiez dans le paradis du seigneur.

*À mes très chères amis RACIM, MEHDI, MOHAMED, ABD-EL-KARIM,
HADJER WISSAL ET ASMA*



*Avec toute mon affection, **Aimene***

Table des matières

Introduction	1
Première partie : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1: Généralités sur les biofilms	
1 Définition.....	5
2 Historique	5
3 Les étapes de formation d'un biofilm	7
3.1 Conditionnement de la surface	7
3.2 Transport de la bactérie vers son support	8
3.3 Adhésion	8
3.3.1 Adhésion réversible	8
3.3.2 Adhésion irréversible	9
3.4 Formation de micro-colonies et maturation de biofilm	9
3.5 Dispersion du biofilm	9
4 Composition et organisation	10
4.1.1 Les microorganismes	11
4.1.2 La matrice	11
5 Les facteurs influençant la formation des biofilms	12
5.1 Les facteurs liés à l'environnement	13
5.1.1 pH	13
5.1.2 Température	14
5.1.3 Présence de nutriments	14
5.1.4 Concentration en oxygène	15
5.1.5 Effets hydrodynamiques	15
5.2 Les facteurs liés aux surfaces	16
5.2.1 La composition chimique de la surface solide	16
5.2.2 La topographie et rugosité de la surface	17
5.2.3 L'énergie de surface et degré d'hydrophobie	17
5.2.4 Présence de film protéique sur la surface	18
5.3 Les facteurs liés aux microorganismes	19
5.3.1 La production d'exopolysaccharides (EPS)	19
5.3.2 La présence de flagelles et de fimbriae	19
5.3.3 L'hydrophobicité de la surface de la cellule	20
6 Le quorum sensing	21
7 Les biofilms dans l'industrie laitière.....	21
Chapitre 2: Généralités sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1 Introduction.....	25
2 Définition	25
3 Historique	25
4 Habitat	26
5 Etymologie et Taxonomie	26
6 Bactériologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
7 Caractères phénotypiques.....	27
7.1 Caractères morphologiques	27
7.2 Caractères cultureux	28
7.2.1 Milieux	28

7.2.2	Température	28
7.2.3	Atmosphère	28
7.2.4	Odeur	29
7.2.5	PH	29
7.2.6	Aspect des colonies	29
7.3	Caractères biochimiques	30
8	Caractères génotypiques	30
9	Facteurs de pathogénicité et pouvoir pathogène	31
9.1	Facteurs de pathogénicité	31
9.2	Les facteurs de virulence membranaires (structuraux)	31
9.3	Les facteurs de virulence extracellulaires (sécrétés)	32
9.3.1	Hémolysines ; deux hémolysines sont produites	32
9.3.2	Toxines qui perturbent la production de protéines dans les cellules eucaryotes	32
9.3.3	Système de sécrétion de type III et ses toxines qui permet à la bactérie d'injecter directement ses toxines dans le cytoplasme des cellules cibles. Elles incluent	33
9.3.4	Protéases qui provoquent des lésions tissulaires qui facilitent l'implantation et inhibent des protéines de défense de l'hôte. Elles incluent	33
9.3.5	Lectine qui pourrait être impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion bactérie-hôte, bactérie-bactérie ou encore bactérie-biofilm	33
10	Biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans l'industrie alimentaire	34
11	Élimination du biofilm en industrie alimentaire	36

Deuxième partie: Matériel et méthodes

1	Lieu d'étude	40
2	Origine des souches	40
3	Revivification des souches	40
4	Observation microscopique	40
5	Conservation des souches	40
6	Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
6.1	Préparation de la suspension bactérienne	41
6.2	Formation de biofilm	41
6.3	Quantification des biofilms formés	42
7	Évaluation de la capacité de formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur le téflon ..	44
7.1	Préparation de la suspension bactérienne : Comme décrit précédemment.	44
7.1.1	Formation de biofilm	44
7.1.2	Dénombrement des bactéries adhérees :	44

Troisième partie : Résultats et Discussion

1	Observation microscopique des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
1.1	Aspect macroscopique :	47
1.2	Aspect microscopique :	47
2	Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> en fonction de différentes températures :	48
2.1	Effet des sucres sur la souche <i>P. aeruginosa lamaabe4-30</i> à 25°C d'incubation :	48
2.2	Effet des sucres sur la souche lamaabe4-30 à 30°C d'incubation	50
2.3	Effet des sucres sur la souche lamaabe4-30 à 40°C d'incubation	52
2.4	Effet des sucres sur la souche lamaabe4-02 à 25°C d'incubation	53
2.5	Effet des sucres sur la souche lamaabe4-02 à 30°C d'incubation	54
2.6	Effet des sucres sur la souche lamaabe4-02 à 40°C d'incubation	54
2.7	Effet des sucres sur la souche de référence (ATCC) à 25°C d'incubation	55

2.8	Effet des sucres sur la souche de référence (ATCC) à 30°C d'incubation	56
2.9	Effet des sucres sur la souche de référence (ATCC) à 40°C d'incubation	57
3	Evaluation de la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> sur les surfaces en PolyTétraFluoroÉthylène(PTFE) ou le téflon	59
4	Discussion.....	59
	Conclusion.....	64
	Références bibliographiques.....	66

Liste des abréviations

- **%** : pourcentage
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ADNe** : Acide désoxyribonucléique extracellulaire
- **ARDRA** : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **ATB** : Antibiotique
- **B. cereus** - *Bacillus cereus*
- **BHIB** : Brain Heart Infusion Broth
- **C°** : Degré Celsius
- **CIP** : Clean-in-Place, systèmes de nettoyage en place
- **Cm** : Centimètre
- **Cm²** : Centimètre au carrée.
- **d** : taux de dilution
- **DO** : Densité Optique
- **E. coli** - *Escherichia coli*
- **Klebsiella spp** - *Klebsiella* species (espèces de *Klebsiella*)
- **EDS** : Eau distillée Stérile
- **EPS** : Exopolysaccharide
- **ETA** : Exotoxine A
- **H** : Heure
- **IAA** : Industrie agroalimentaire.
- **ISTA** : Institut des Sciences et Techniques Appliquées, Université de Tlemcen
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **min** : Minute
- **mL** : Millilitre
- **mm/s** : millimètres par seconde
- **MPS** : Solutions de désinfection polyvalentes
- **n** : nombre de colonie compté sur la boîte retenue
- **nm** : nanomètre
- **ONPG** : O-nitrophényl-βD-galactopyranoside
- **PTFE** : Polytétrafluoroéthylène (Téflon)
- **Buna-N** : Nitrile butadiène caoutchouc (un type de caoutchouc synthétique)
- **Pseudomonas spp** - *Pseudomonas* species (espèces de *Pseudomonas*)
- **P. aeruginosa** - *Pseudomonas aeruginosa*
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **pv** : Pathovar
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **QS** : Quorum Sensing
- **EPS** : Exopolysaccharides
- **PAO1** : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
- **RAPD-PCR** : Random Amplified Polymorphic DNA
- **S** : surface de la lame délimitée à 5 cm².
- **S. epidermidis** - *Staphylococcus epidermidis*
- **S. thermophilus** - *Streptococcus thermophilus*
- **UFC** : Unité Formant Colonie
- **V** : volume total de la dilution qui a servi au dénombrement
- **µl** : microlitre

Liste des figures

Figure 1 : Visualisation du biofilm par microscopie électronique à balayage (La flèche blanche indique les connexions entre les bactéries dans le biofilm âgé de 3 jours) (Dawson et al., 2012).....	5
Figure 2 : Les étapes de formation des biofilms (Boudarel, 2018)	7
Figure 3 : Principales interactions bactéries/surfaces impliquées dans l'adhésion bactérienne (Tuson et Weibel, 2013).....	8
Figure 4 : Représentation schématique des différentes formes de détachement d'un biofilm mature (Guilhen, 2017).....	10
Figure 5 : Composition du biofilm (Bentiba, 2017).	12
Figure 6 : Principaux facteurs affectant la formation de biofilm (Speranza et Corbo, 2017).	13
Figure 7 : Image tridimensionnelle de <i>P. aeruginosa</i> générée par ordinateur (3D).....	28
Figure 8 : Aspect des colonies de <i>P. aeruginosa</i> sur différents milieux de culture : (A) : colonies « Large », (B) : colonies « Small », (C) : colonies « Muqueuse » (Solbi, 2013)	29
Figure 9 : Génome de <i>P. aeruginosa</i> (Stover et al., 2000).....	31
Figure 10 : Cycle de vie du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 cultivé dans un milieu à faible teneur en glucose(Rasamiravaka et al., 2015).....	36
Figure 11 : Formation de biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	41
Figure 12 : Les étapes de quantification de biofilm par la technique de microplaque de titration a 96 puits : (A) : rinçage, (B) : coloration par le cristal Violet, (C) : rinçage le surplus de cristal Violet (D): adhésion de l'acide acétique 33% et (E) : Lecture de résultats par ELISA	43
Figure 13 : Les étapes de quantification de biofilm sur téflon.	45
Figure 14 : Aspect morphologique de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lamaabe4-30 sur milieu BHIA	47
Figure 15 : Observation microscopique de <i>P. aeruginosa</i> (Grossissement x100) : (a) : <i>P. aeruginosa</i> lamaabe4-02 et (b) : <i>P. aeruginosa</i> lamaabe4-30	48
Figure 16 : Quantification de la formation de biofilm (DO596 nm) par la souche <i>P. aeruginosa</i> lamaabe4-30 à 25°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.....	50
Figure 17 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-30 à 30°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.	51
Figure 18 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-30 à 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.	53
Figure 19 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-02 à 25°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.	53

Figure 20 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-02 à 30°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.	54
Figure 21 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-02 à 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.	55
Figure 22 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche de référence (ATCC) à 25°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.....	56
Figure 23 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche de référence (ATCC) à 30°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.....	57
Figure 24 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche de référence (ATCC) à 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.....	57
Figure 25 : Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par les souches <i>P. aeruginosa</i> lamaabe4-02, <i>P. aeruginosa</i> lamaabe4-30 et la souche de référence <i>P. aeruginosa</i> (ATCC) à 25°C, 30°C et 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24h d'incubation.....	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie de <i>P.aeruginosa</i> (Balouki, 2017).....	27
Tableau 2 : Choix du produit nettoyant en fonction des souillures (Diaby, 2018).....	37

ملخص

يستكشف هذا البحث تأثير الظروف البيئية على تكوين الأغشية الحيوية بواسطة سلالات *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من خطوط إنتاج الحليب الخام المبستر. تُعتبر الأغشية الحيوية تراكيب ميكروبية معقدة تتشكل عندما تلتصق عدة كائنات دقيقة بسطح معين وتغطي نفسها بمصفوفة واقية. يمكن أن تواجه صناعة الأغذية مشكلات نتيجة لتكوين الأغشية الحيوية، والتي تسمح بتلوث المنتجات بواسطة العوامل الممرضة وتلفها. تركز هذه الدراسة على تأثير مصدر الكربون، نوع السطح، درجة الحرارة ووقت الاتصال على تكوين الأغشية الحيوية. كان الهدف هو تقييم قدرة ثلاث سلالات من *Pseudomonas aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية في وجود سكريات مختلفة (اللاكتوز، الجلوكوز والجالاكتوز)، أنواع مختلفة من السطح ودرجات حرارة مختلفة. شملت المنهجية حضان السلالات مع تركيزات مختلفة من السكريات (0.5%، 1%، 1.5%، 2% و 2.5%) وتقييم تكوين الأغشية الحيوية في فترات زمنية محددة. تُظهر النتائج أن للسكريات تأثيرات متغيرة على تكوين الأغشية الحيوية، اعتمادًا على السلالة ومدة الحضانة. عزز الجلوكوز تكوينًا أوليًا عاليًا للأغشية الحيوية (1.64 نانومتر). ومع ذلك، بعد 72 ساعة من الحضانة، تبين أن الجلوكوز هو المحفز الأكثر أهمية لتكوين الأغشية الحيوية لجميع السلالات. في الختام، تؤكد هذه الدراسة على أهمية أخذ مصادر الكربون ودرجة الحرارة في الاعتبار في صناعة الألبان، حيث تؤثر على تكوين الأغشية الحيوية. تعتبر هذه النتائج أساسية لتطوير استراتيجيات تحكم فعالة في صناعة الألبان، مما يقلل من مخاطر التلوث واستمرارية الأغشية الحيوية الممرضة.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas aeruginosa*، الأغشية الحيوية، الظروف البيئية، مصدر الكربون، صناعة الألبان.

Summary

This thesis explores the effect of environmental conditions on biofilm formation by strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from raw pasteurized milk production lines. Biofilms are complex microbial structures that form when multiple microorganisms adhere to a surface and cover themselves with a protective matrix. The food industry can face challenges due to biofilm formation, which allows for the contamination and spoilage of products by pathogens. This study focuses on the influence of carbon source, surface type, temperature, and contact time on biofilm formation. The objective was to evaluate the ability of three strains of *Pseudomonas aeruginosa* to form biofilms in the presence of different sugars (lactose, glucose, and galactose), different surface types, and different temperatures. The methodology included incubating the strains with different concentrations of sugars (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, and 2.5%) and evaluating biofilm formation at specific time intervals. The results show that sugars have varying effects on biofilm formation, depending on the strain and incubation duration. Glucose promoted high initial biofilm formation (1.64 nm). However, after 72 hours of incubation, glucose was found to be the most significant inducer of biofilms for all strains. In conclusion, this study highlights the importance of considering carbon sources and temperature in the dairy industry, as they influence biofilm formation. These results are essential for developing effective control strategies in the dairy industry, thus minimizing the risks of contamination and persistence of pathogenic biofilms.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, environmental conditions, carbon source, dairy industry.

Résumé

Ce mémoire explore l'effet des conditions environnementales sur la formation de biofilms par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des lignes de production de lait cru pasteurisé. Les biofilms sont des structures microbiennes complexes qui se forment lorsque plusieurs microorganismes s'accrochent à une surface et se recouvrent d'une matrice protectrice. L'industrie alimentaire peut être confrontée à des problèmes en raison de la formation de biofilms, qui permettent la contamination des produits par des agents pathogènes et leur altération. Cette étude se focalise sur l'influence de la source de carbone, le type de surface, la température et le temps de contact sur la formation de biofilms. L'objectif était d'évaluer la capacité de trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* à former des biofilms en présence de différents sucres (lactose, glucose et galactose), différents types de surface et différentes températures. La méthodologie comprenait l'incubation des souches avec différentes concentrations de sucres (0,5%, 1%, 1,5%, 2% et 2,5%) 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 glucose a favorisé une formation initiale élevée de biofilms (1,64 nm). Toutefois, après 72 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 et la température dans l'industrie laitière, car elles influencent la formation de biofilms. Ces résultats sont essentiels pour développer des stratégies de contrôle efficaces dans l'industrie laitière, minimisant ainsi les risques de contamination et de persistance des biofilms pathogènes.

Mot clés : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, conditions environnementales, source de carbone, l'industrie laitière.

Introduction

Les industries alimentaires en particulier l'industrie laitière font face à un défi lorsqu'il s'agit du phénomène de formation des biofilms bactériens. Ces biofilms microbiens peuvent se former sur différents types de surfaces, tels que le caoutchouc, le polypropylène, le polystyrène, le plastique, le téflon, le verre, l'acier inoxydable et d'autres matériaux de surface exposés aux aliments (**Liu et al., 2023 ; Olanbiwoninu et Popoola, 2023**).

Dans l'industrie laitière, la formation des biofilms est influencée par divers facteurs, dont la composition du lait, notamment le lactose, le glucose et le galactose, qui peuvent influencer l'adhésion bactérienne et donc favoriser d'avantage la formation de biofilms (**Alonso et al., 2022**), la compréhension des facteurs qui favorisent leur développement ou leur croissance est donc primordiale afin de pouvoir les éliminer. Il est bien connu que les produits laitiers sont très vulnérables à la contamination par les biofilms et qu'il est difficile d'éliminer ces microorganismes (**Carrascosa et al., 2021**).

La persistance de certains agents pathogènes d'origine alimentaire sur les surfaces en contact avec les aliments en mode biofilm a été largement étudiée, ce qui a un impact sur la qualité et la sécurité des produits alimentaires (**Satpathy et al., 2016**).

Depuis quelques décennies, *Pseudomonas aeruginosa* est reconnu comme un agent pathogène opportuniste, capable de coloniser divers environnements et de former des biofilms complexes. Ce bacille, qui constitue l'espèce type du genre *Pseudomonas*, est particulièrement préoccupant en raison de sa capacité à former des biofilms résistants aux traitements antimicrobiens, posant ainsi des défis significatifs dans divers contextes, y compris l'industrie laitière (**Chmielewski et al., 2013**). L'industrie laitière représente une niche favorable à son développement, où différents réservoirs ont été identifiés, tels que les équipements de traitement du lait et les surfaces de contact (**Giaouriset al., 2021 ; Sreyet et al., 2013**), une fois développés les biofilms de *Pseudomonas* peuvent entraîner des contaminations persistantes dans les environnements de production laitière, compromettant la qualité et la sécurité des produits laitiers (**Tijani, 2019**).

Ces conditions comprennent des facteurs physiques comme la température, le pH, et l'humidité, ainsi que des facteurs chimiques tels que la concentration en nutriments et la présence de désinfectants. Comprendre comment ces conditions influencent la formation de biofilm est essentiel pour développer des stratégies efficaces de prévention et de contrôle (**Bridier et al., 2011 ; Marchand et al., 2012**).

L'objectif principal du présent travail s'inscrit dans l'étude de l'effet des conditions environnementales sur la formation de biofilm par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées

des lignes de production de lait cru pasteurisé. Parmi ces conditions ; la source de carbone, le type de surface, la température et le temps de contact sont étudiés dans le présent travail.

Le manuscrit est divisé en trois parties :

1. La première partie concerne la synthèse bibliographique qui est composée de deux chapitres. Le premier parlera des généralités sur les biofilms alors que le second donnera des généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*.
2. La deuxième partie présentera la méthodologie envisagée pour atteindre notre objectif. Les résultats obtenus et leur discussion seront présentés dans la troisième partie.

Une conclusion clôtura le travail.

Première partie
Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur les biofilms

1 Définition

Le terme biofilm est dérivé des deux éléments essentiels qui composent cette structure : les microorganismes « bio » et la matrice « film ». Le biofilm offre aux microorganismes une atmosphère spécifique qui les préserve des dangers environnementaux (Guilhen, 2017).

Les biofilms sont des communautés microbiennes attachées à des surfaces et enfermées dans une matrice extracellulaire d'origine microbienne (Rumbaugh et Saur, 2020) Ils constituent la forme dominante de la vie microbienne (Yadav, 2017 ; Tremblay *et al.*, 2014).

Le biofilm est composé de cellules microbiennes adhérentes les unes aux autres et à une surface vivante ou inerte (Figure 1). Ce mode de vie assure la protection des bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles (Costerton *et al.*, 1999)

La présence de biofilms affecte de nombreuses activités humaines, que ce soit dans le domaine industriel, environnemental, agro-alimentaire ou de la santé. Les bactéries qui peuvent créer un biofilm ont des caractéristiques communes. La matrice polymérique qui les recouvre est fortement hydratée et constituée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Goetz *et al.*, 2016).

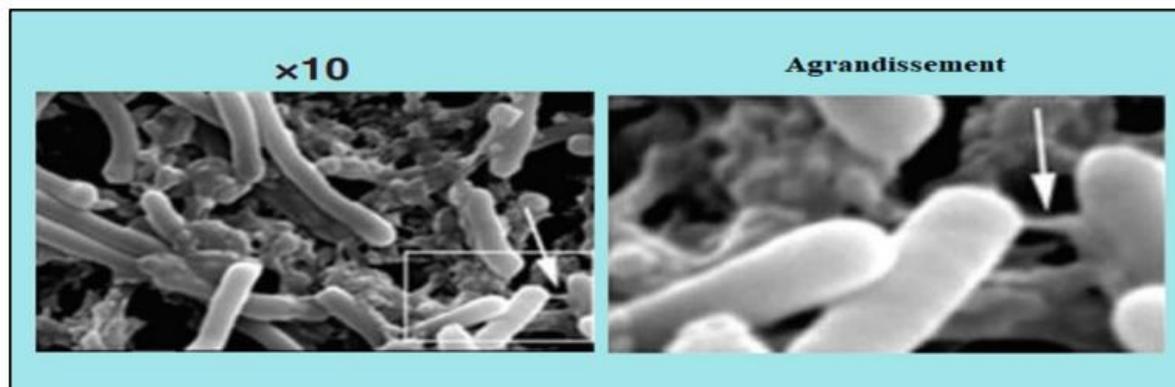


Figure 1 : Visualisation du biofilm par microscopie électronique à balayage (La flèche blanche indique les connexions entre les bactéries dans le biofilm âgé de 3 jours) (Dawson *et al.*, 2012)

2 Historique

La découverte des biofilms est attribuée à Antoni Van Leeuwenhoek, inventeur du microscope (Costerton, 2004). En fait rapport à la Royal Society de Londres, il a observé l'existence d'agrégats microbiens à partir d'un prélèvement buccal. Il a qualifié cette croissance d'animalcules (Chandki *et*

al., 2011). Il a remarqué par la suite que le nombre de ces animalcules dans la plaque dentaire d'un homme était si élevé plus que le nombre d'hommes dans le royaume (Mogha *et al.*, 2014). C'est la première annonce officielle de l'existence d'un biofilm (Sauer *et al.*, 2007).

En 1933, dans le cadre d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henrici remarqua, sur ces lames, des communautés bactériennes (Costerton, 2004). Il supposa alors que la majorité des bactéries vivant en milieu aqueux sont présentes sous forme de communautés sessiles fixées à une surface, et non sous forme planctonique (Høiby, 2017). Le concept de « biofilm » est apparu, mais le mot lui-même n'est pas encore admis (Costerton, 2004).

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

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

Cependant, seulement dans les années 1970, on a pu observer et décrire clairement la quantité de bactéries emprisonnées dans une matrice extracellulaire 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).

En 1980, les recherches de William Costerton montrent que la majorité de la biomasse microbienne est liée à des surfaces et forme des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines, présentes dans tous les milieux et liées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires, etc.). On les qualifie de biofilms (Roux et Ghigo, 2006).

Le biofilm s'est ensuite progressivement imposé comme le terme le plus adéquat pour décrire la croissance sessile *in vivo* (Costerton *et al.*, 1999).

En 1999, Costerton a publié une première étude qui expose le biofilm bactérien et les premiers processus qui ont contribué à la formation de cette structure complexe (Costerton *et al.*, 1999).

En 2006, Allwood et ses collègues ont publié dans le journal « Nature » que les stromatolithes, produits de l'activité biologique de cyanobactéries, constituent un biofilm comprenant des

microorganismes et ont été à l'origine de la formation de structures de pierre depuis des milliards d'années. Ces "roches vivantes" étaient, à l'époque, la seule source d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui était donc la source de vie sur notre planète (Alnasouri, 2010).

3 Les étapes de formation d'un biofilm

La formation de biofilms est un processus de développement initié par des organismes planctoniques qui créent des agrégats et/ou adoptent un mode de vie lié à une surface. Ce processus offre aux microorganismes une solidité architecturale, une protection contre les contraintes environnementales et une structure pour l'assemblage organisé des communautés microbiennes. Ce développement a été défini comme un processus séquentiel, très régulé, comprenant au moins cinq étapes phénotypiquement différentes (Figure 2), chaque étape du développement du biofilm correspondant à des modèles spécifiques de production de protéines et d'expression de gènes (Rumbaugh et Sauer, 2020 ; Trego et al., 2020).

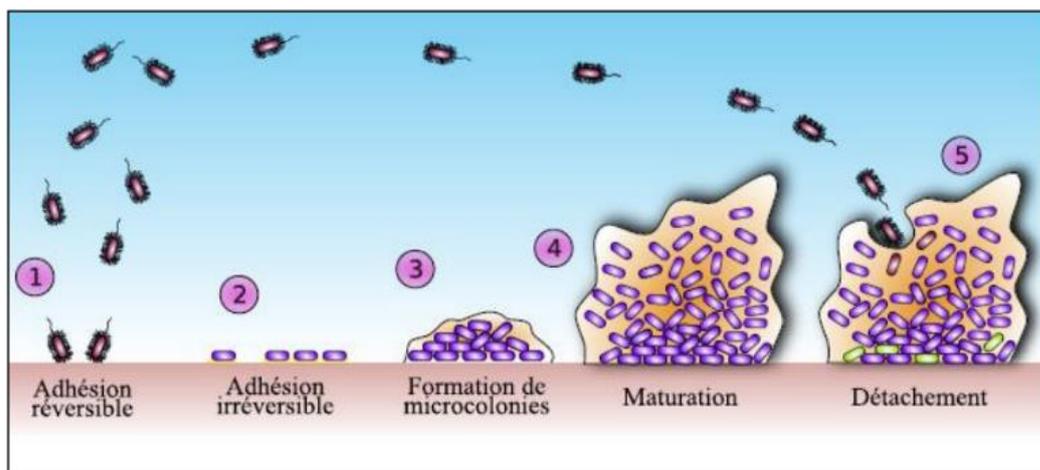


Figure 2 : Les étapes de formation des biofilms (Boudarel, 2018)

3.1 Conditionnement de la surface

La formation du film conditionnant est la première étape. Il est constitué de protéines ou de fragments protéiques, de glucides, de lipides et de matières minérales (telles que les sels) provenant du milieu environnant. Selon le type d'environnement auquel la surface du substrat est exposée, la nature du film de conditionnement peut varier considérablement. Ce film modifie les propriétés physicochimiques de la surface (tension de surface, polarité, caractère hydrophile/hydrophobe), ce qui peut favoriser ou inhiber l'adhésion bactérienne. En outre, l'adsorption et l'accumulation de molécules organiques sur le support donnent accès à des nutriments favorisant ainsi le

chimiotaxisme et l'installation des microorganismes sur la surface (Brauge, 2015 ; Lorite *et al.*, 2011; Branger, 2007).

3.2 Transport de la bactérie vers son support

Une fois que le film primaire est formé, la prochaine étape consiste à transporter les microorganismes près de la surface. Ces microorganismes peuvent être soit des bactéries provenant de l'environnement, soit d'un biofilm présent dans l'environnement et en phase de dispersion (Brauge, 2015 ; Branger, 2007).

3.3 Adhésion

Après la phase de transport, l'étape d'adhésion "réversible" se produit, suivie d'une phase d'adhésion "irréversible" (Brauge, 2015).

3.3.1 Adhésion réversible

Les cellules planctoniques microbiennes se déplacent initialement dans le milieu liquide par des forces physiques ou par des flagelles (Figure 3) (Roux and Ghigo, 2006). Quand les bactéries se trouvent près d'une surface, il y a des forces attractives ou répulsives qui fluctuent en fonction des niveaux de nutriments, du pH, de la force ionique et de la température, ce qui entraîne une interaction réversible avec la surface (Banerjee *et al.*, 2015 ; Garret *et al.*, 2008 ; Roux and Ghigo, 2006).

Un avantage concurrentiel des bactéries mobiles réside dans leur capacité à utiliser des flagelles pour surmonter les forces hydrodynamiques et répulsives (Garret *et al.*, 2008).

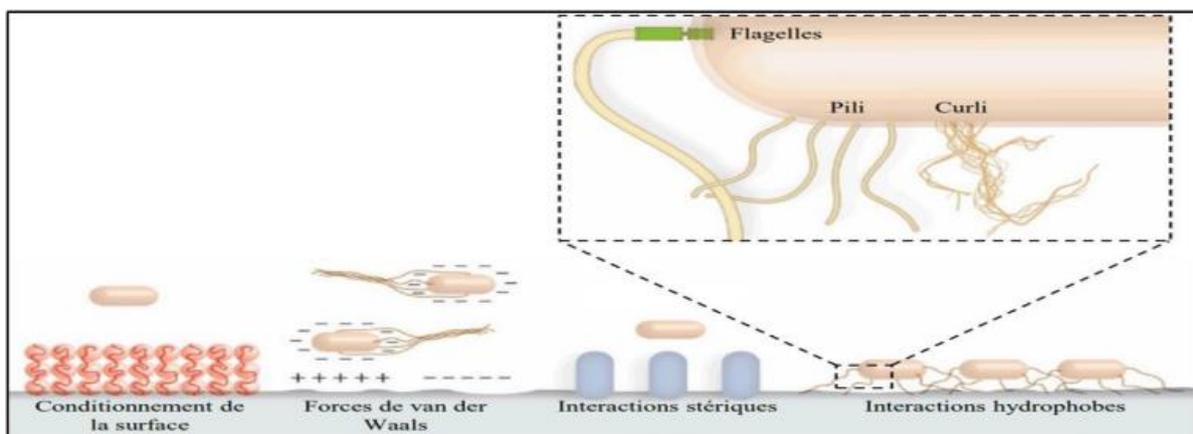


Figure 3 : Principales interactions bactéries/surfaces impliquées dans l'adhésion bactérienne (Tuson et Weibel, 2013)

3.3.2 Adhésion irréversible

En temps réel, plusieurs cellules adsorbées réversiblement restent immobilisées et deviennent adsorbées irréversiblement (**Brauge, 2015 ; Garret *et al.*, 2008**).

Il est essentiel d'utiliser des forces beaucoup plus élevées pour détacher les cellules (grattage, ultrasons). Au cours de cette étape, cette notion d'irréversibilité est associée aux différents points d'interaction qui entraînent une liaison énergétique. La vitesse et l'importance de l'adhésion microbienne sont influencées par l'hydrophobicité de surface, les appendices protéiques tels que les pilis, les flagelles ainsi que la composition et la proportion des exopolysaccharides (EPS) (**Brauge, 2015**).

Le passage entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible serait très rapide (de la seconde à la minute) (**Brauge, 2015 ; Garret *et al.*, 2008**).

3.4 Formation de micro-colonies et maturation de biofilm

Cette étape est essentielle pour la formation du biofilm. Les cellules microbiennes, une fois fixées irréversiblement sur la surface, commencent à se développer et à se multiplier pour former des micro-colonies. (**Tremblay *et al.*, 2014**).

Ces activités biologiques dépendent de l'absence ou de l'abondance des éléments essentiels tels que l'eau, la quantité d'oxygène et des paramètres physicochimiques tels que la température et le pH. L'augmentation du nombre de cellules microbiennes entraîne une diminution de la distance entre deux cellules. Cela entraîne la production de polymères exogènes qui favorisent une forte adhésion des cellules les unes aux autres d'une part et de l'ensemble à la surface d'autre part. Les microorganismes ont la possibilité de transmettre des métabolites à leurs voisins grâce à des interactions physiologiques (**Blenkinsopp *et al.*, 1991**).

En règle générale, une fois que le biofilm atteint une certaine épaisseur, les conditions du substrat deviennent anaérobies. Ceci suggère que le biofilm se rapproche d'un stade de maturité, avec une grande variété d'espèces (**Alnasouri, 2010 ; Hamilton *et al.*, 1985**).

3.5 Dispersion du biofilm

Ce mode de vie peut être avantageux pour les micro-organismes vivants sous forme de biofilm, mais il peut aussi être néfaste. Les bactéries sessiles sont confrontées à divers problèmes tels que l'absence de nutriments, l'accumulation de métabolites et les variations de température, de pH ou de concentration en oxygène dans l'environnement. Afin de survivre à ces conditions difficiles, les bactéries peuvent adopter une stratégie consistant à se détacher du biofilm, que ce soit

individuellement ou en micro-agrégats pour coloniser un nouvel environnement plus propice. Deux méthodes sont utilisées pour se détacher du biofilm : passive ou active (**figure 4**) (**Guilhen, 2017**).

Les différents mécanismes du détachement passif comprennent l'érosion, le broutage, l'envasement et l'abrasion (**Guilhen, 2017 ; Davies, 2011**).

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

Le processus de dispersion, également connu sous le nom de détachement actif, est un processus hautement contrôlé où les cellules s'échappent activement du biofilm, laissant derrière elles des biofilms érodés et des biofilms avec des vides centraux. La dispersion est supposée entraîner la migration des bactéries vers de nouveaux sites de colonisation (**Rumbaugh et Sauer, 2020**).

Dans le cycle de vie des biofilms, la phase de dispersion joue un rôle crucial en permettant aux bactéries de se propager, de survivre et d'envahir de nouveaux sites (**Guilhen, 2017**).

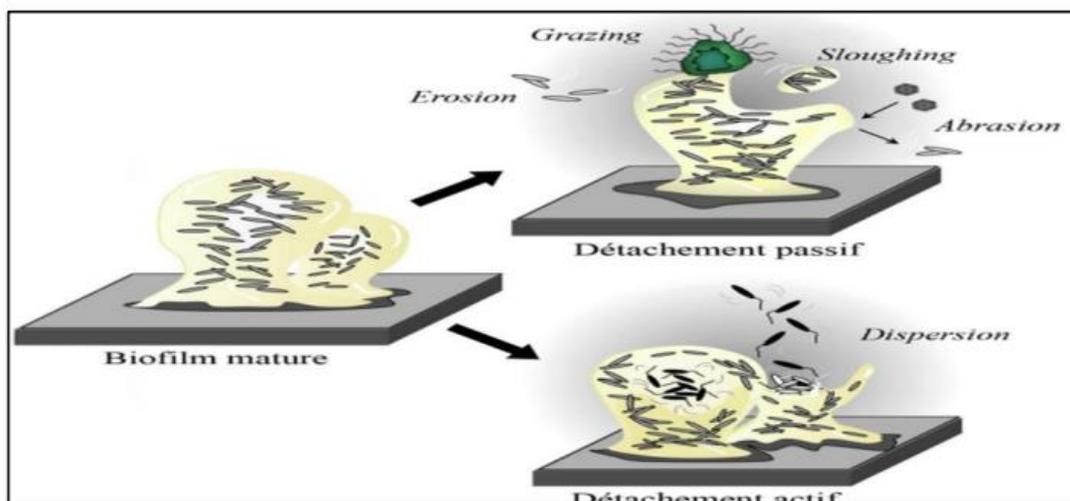


Figure 4 : Représentation schématique des différentes formes de détachement d'un biofilm mature (**Guilhen, 2017**)

4 Composition et organisation

Le terme "biofilm" décrit un ensemble de matériel vivant (bio) formant un mince revêtement (film) (**Donlan, 2002**). Le biofilm peut donc présenter des variations en fonction de la concentration et de la nature de ses composants (**Figure 5**) (**Paolozzi et Liébart, 2015**).

4.1. Composition : Le biofilm est formé par des microorganismes qui se trouvent dans une matrice. De manière générale, environ 5 à 35 % du volume du biofilm est composé de microorganismes, tandis que le volume restant est composé de la matrice extracellulaire (**Jamal *et al.*, 2018 ; Branger, 2007**).

4.1.1 Les microorganismes

Les biofilms sont principalement composés de multiples espèces dans l'environnement, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de différents types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes. En revanche, les biofilms qui sont implantés sur les dispositifs médicaux, par exemple, sont généralement composés d'une seule espèce bactérienne, enfermée dans une matrice d'EPS (**Portie, 2014 ; Branger, 2007**).

Pendant leur formation, une concurrence se crée entre les espèces, favorisant ou non la présence de certaines d'entre elles (**Portier, 2014 ; Branger, 2007**).

4.1.2 La matrice

Elle est généralement produite par les microorganismes eux-mêmes. C'est le matériau extracellulaire dans lequel les cellules du biofilm sont intégrées. L'ensemble de ces biopolymères, connus sous le nom de substances polymériques extracellulaires (EPS), constitue le support de l'architecture tridimensionnelle du biofilm et joue un rôle essentiel dans leur adhésion aux surfaces et leur cohésion (**Flemming et Wingender, 2010**). Elle joue diverses fonctions ; elle garantit la cohésion de chaque micro-colonie, les préserve, absorbe l'eau et capte les petites particules qui se déplacent, les nutriments dissous sont fournis et leurs déchets sont éliminés (**Brauge, 2015 ; Branger, 2007**).

Les microorganismes présents et l'environnement physico-chimique peuvent influencer la composition de la matrice exopolymérique (**Paolozzi et Liébart, 2015**) elle est constituée de :

- L'eau constitue la principale composante de la matrice extracellulaire, pouvant représenter jusqu'à 97 % du poids humide d'un biofilm.
- Des nutriments, de métabolites, de produits de lyse cellulaire et d'autres déchets issus de l'environnement.
- Les polymères, également connus sous le nom d'EPS, sont l'élément structural essentiel du biofilm, pouvant représenter jusqu'à 85% de sa masse totale. Ils jouent un rôle essentiel dans l'organisation et la fixation du biofilm à la surface et dans sa cohésion. La composition des

EPS peut être très différente en fonction des microorganismes et de l'environnement dans lequel le biofilm se forme.

- Les polysaccharides extracellulaires, qui jouent un rôle essentiel dans sa structure
- Des macromolécules telles que les protéines, l'ADN et l'ARN, de lipides, de phospholipides et d'autres éléments cellulaires. (Jamal *et al.*, 2018 ; Guilhen, 2017 ; Brauge, 2015; Lembreet *al.*, 2012).

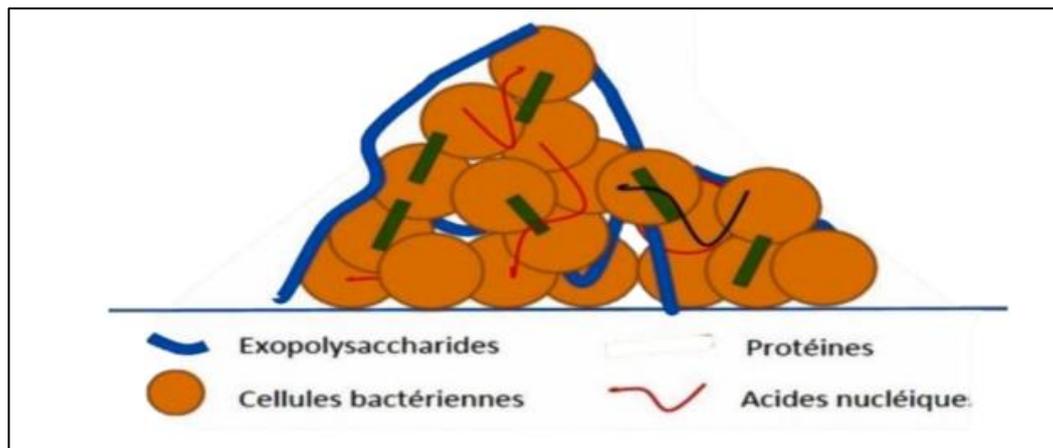


Figure 5 : Composition du biofilm (Bentiba, 2017).

5 Les facteurs influençant la formation des biofilms

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 6).

Lors de la production des aliments, y compris les produits laitiers, différentes conditions favorables dans les équipements de transformation pourraient entraîner la formation de biofilm, telles que la présence d'humidité, des températures propices à la croissance des bactéries et une augmentation de la teneur en nutriments (Fysunet *al.*, 2019).

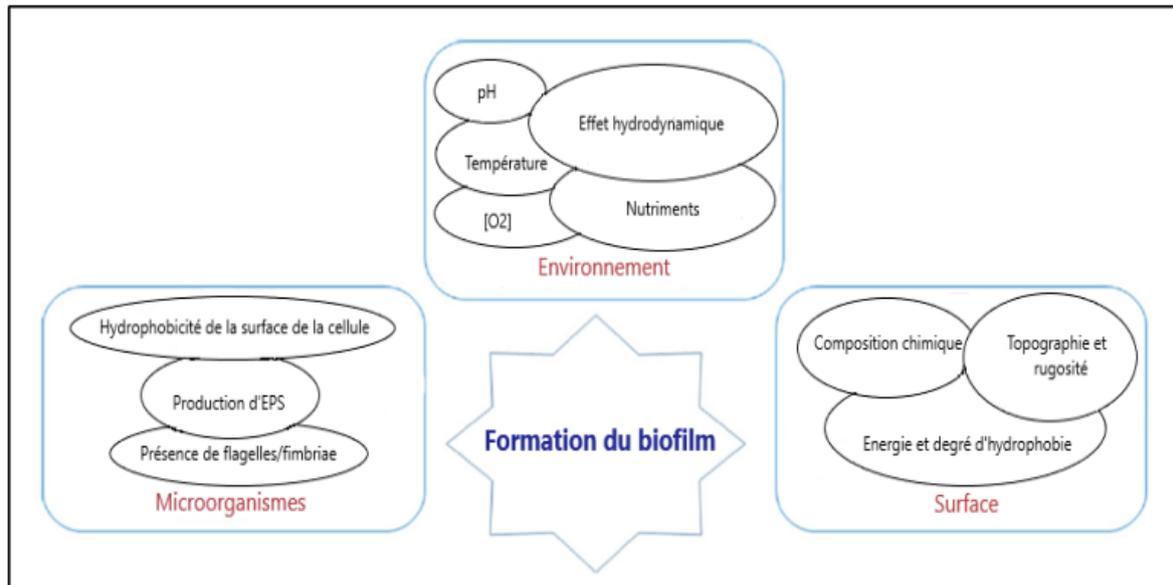


Figure 6 : Principaux facteurs affectant la formation de biofilm (Speranza et Corbo, 2017)

5.1 Les facteurs liés à l'environnement

Ces facteurs incluent le pH, la température, la présence de nutriments, la concentration en oxygène et les effets hydrodynamiques.

5.1.1 pH

Le pH de l'environnement varie et a un impact sur l'adhésion bactérienne et la formation 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). La formation de biofilms de *S. aureus* est affectée négativement par des conditions très acides ou alcalines, tandis qu'un pH neutre favorise cette formation (Zmantar *et al.*, 2010).

L'effet du pH sur la formation de biofilms a également été démontré dans des études spécifiques sur *Escherichia coli* et *Streptococcus agalactiae*. Dans le cas d'*E. coli*, les conditions neutres encouragent la formation de biofilms à 25°C, tandis que les conditions acides favorisent une formation plus efficace à 37°C. La présence d'un pH acide favorise également la formation de biofilms chez *S. agalactiae* (Mathlouthi *et al.*, 2018 ; D'Urzo *et al.*, 2014).

Selon les espèces, le pH idéal pour la production de polysaccharides diffère, mais la majorité 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

(**Boginoet al., 2013**). La capacité des cellules bactériennes dans le biofilm à résister aux variations de pH est supérieure à celle des cellules bactériennes libres dans l'environnement (**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**). Toutefois, en milieu alcalin, on constate un biofilm mal organisé et mince, dû à une perturbation de la maturation du biofilm, ce qui empêche également l'adhésion de certaines bactéries comme *S. aureus* et *S. epidermidis* (**Nostro et al., 2012**).

5.1.2 Température

C'est une condition importante pour l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms (**Abdallah et al., 2014**). L'augmentation de la biomasse et de la capacité d'attachement des bactéries a été observée avec une température de croissance élevée, probablement due à la production de protéines de stress thermique présentes à la surface des cellules. Par exemple, une recherche menée par Hořtacká et ses collègues a montré que la biomasse du biofilm de *P. aeruginosa* augmente lorsque la température d'incubation augmente (**Hořtacká 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**). Donc, une température idéale favorise la formation du biofilm. La composition des polymères de la surface bactérienne est également influencée par la température, ce qui entraîne une diminution à basse température et une diminution des propriétés adhésives des bactéries (**Herald et Zottola, 1988**).

5.1.3 Présence de nutriments

La disponibilité des nutriments joue un rôle crucial dans la formation du biofilm. En réalité, les éléments nutritifs ont un impact sur la charge de surface des bactéries. Dans le milieu de croissance, par exemple, le glucose et l'acide lactique réduisent l'électronégativité de la paroi cellulaire bactérienne en neutralisant la charge de surface (**Brocklehurst et al., 1987**). Ainsi, il est possible que les facteurs environnementaux aient un effet synergique et influent sur la formation du biofilm (**Khelissa, 2017**). Les structures des biofilms qui poussent sous des concentrations de nutriments faibles et élevées, respectivement, diffèrent (**Purevdorjet al., 2002**). On a observé que les biofilms qui se forment sous des concentrations élevées de nutriments présentent une densité cellulaire élevée et que la structure du biofilm (EPS) semble être épaisse et complexe. En revanche, des concentrations de nutriments plus faibles ont tendance à entraîner une structure plus compacte avec une densité cellulaire plus faible. Cette variation met en évidence que la structure du biofilm est influencée par la disponibilité des nutriments (**Molobela et Ilunga, 2012**).

5.1.4 Concentration en oxygène

Il est essentiel que l'oxygène soit présent dans l'environnement, car il peut exercer une influence importante sur la formation et le développement des biofilms (**Alotaibi et Bukhari, 2021**). La présence d'oxygène a un impact sur la production d'énergie des bactéries, ce qui peut éventuellement avoir un impact sur la formation du biofilm. Des micro-environnements se forment à l'intérieur des biofilms, avec des zones où la concentration en oxygène est diminuée, ce qui ralentit la prolifération bactérienne. Quand le niveau d'oxygène diminue dans les biofilms, cela entraîne une baisse de l'activité métabolique des bactéries et entraîne un arrêt de la croissance des bactéries (**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**).

Par ailleurs, la présence d'oxygène peut aussi avoir un impact sur l'hydrophobicité de la surface, ce qui influence les interactions hydrophobes. La présence d'oxygène à la surface entraîne généralement une diminution de l'hydrophobicité de celle-ci (**MorenoCastilla, 2004**).

5.1.5 Effets hydrodynamiques

Dans divers environnements, les biofilms sont soumis à diverses conditions hydrodynamiques qui peuvent influencer 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**). De plus, ces conditions ont la capacité d'affecter les caractéristiques physiques du biofilm, comme la densité et la résistance, ce qui pourrait avoir un impact sur la diffusion des nutriments et des signaux dans le biofilm (**Purevdorj et al., 2002**).

Les études montrent que la contrainte de cisaillement a des conséquences sur le taux de croissance, la composition du biofilm, la production d'EPS, le transfert de masse et le comportement métabolique/génétique du biofilm (**Alotaibi et Bukhari, 2021**). Par exemple, une étude des populations microbiennes qui ont évolué sous une force de cisaillement de paroi spécifique a révélé que la contrainte de cisaillement ralentit la maturation du biofilm de *P. putida* (**Rochex et al., 2008**). Les conditions hydrodynamiques ont également eu un impact sur la détection du quorum dans le biofilm de *P. aeruginosa* (**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**).

Il est bien connu que le débit élevé entraîne deux phénomènes opposés : il favorise le transport des nutriments vers la surface, ce qui favorise la croissance de la cellule dans la couche microbienne et la production d'exopolymères ; d'autre part, avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement, les taux de cisaillement augmentent également, ce qui entraîne 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**). Les cellules cultivées dans des conditions de cisaillement élevé ont montré une adhérence accrue et des taux de détachement plus faibles (**Karimi et al., 2015**).

5.2 Les facteurs liés aux surfaces

Ces facteurs incluent la composition chimique de la surface solide, la topographie et rugosité de la surface et l'énergie de surface et degré d'hydrophobie.

5.2.1 La composition chimique de la surface solide

La chimie de la surface solide influence l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms, les surfaces peuvent présenter divers groupes fonctionnels qui ont un impact sur l'attachement bactérien, qui varie également en fonction de l'hydrophobie et de la charge du matériau (**Katsikogianni et Missirlis, 2004**).

L'adhérence des bactéries aux surfaces chargées positivement est un exemple fréquent, puisque les bactéries présentent habituellement une charge négative nette sur leur paroi cellulaire en raison de groupes carboxyle, amino et phosphate, on observe souvent une adhérence accrue sur les surfaces à charge positive (**Zheng et al., 2021**).

5.2.2 La topographie et rugosité de la surface

On considère que la rugosité de l'acier inoxydable joue un rôle essentiel 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**). Effectivement, les surfaces rugueuses présentent une surface plus étendue et offrent aux bactéries un refuge contre les agents de nettoyage et des zones plus propices à la colonisation (**Khelissa, 2017**).

L'adhésion de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* et *Ralstoniapickettii* sur des surfaces rugueuses avec des surfaces plus grandes était significativement plus élevée que sur des surfaces lisses (**James *et al.*, 2019**).

De plus, la porosité des matériaux a un impact important sur l'adhérence des bactéries. On a observé une différence entre les taux d'infection du site implantaire entre les matériaux poreux et les matériaux denses, les matériaux poreux étant beaucoup plus élevés. Ceci démontre que les bactéries s'attachent et se fixent principalement sur la surface des pores. Effectivement, les bactéries se fixent plus facilement sur des surfaces poreuses et rainurées que sur des surfaces denses et plates en raison de leur surface de contact plus étendue (**Fratamico *et al.*, 2009**).

5.2.3 L'énergie de surface et degré d'hydrophobie :

Les caractéristiques physico-chimiques des surfaces abiotiques dans l'industrie alimentaire ont un impact important sur la formation de biofilms, notamment par l'attachement initial des bactéries. En réalité, l'adhérence des bactéries repose sur la tension 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**).

Selon des études, l'adhésion de *Staphylococcus xylosus* est influencée par les caractéristiques physicochimiques de la surface et 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**). On a considéré que l'hydrophobie de surface joue un rôle essentiel dans l'adhésion des cellules microbiennes (**Alsteens et al., 2007**).

De plus, y'a une 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 *Alcaligene sdenitrificans* attachées a été évaluée et les résultats ont montré que les taux d'adhésion augmentaient avec l'hydrophobie de la surface (**Van Loosdrecht et al., 1987**). L'adhésion bactérienne est plus faible sur les surfaces métalliques présentant une hydrophobie réduite (**Sheng et al., 2008**).

5.2.4 Présence de film protéique sur la surface

Le polymère présent sur un matériau modifie les caractéristiques physico-chimiques de sa surface, ce qui a un impact direct sur l'attachement des bactéries à ce matériau.

Dans le secteur laitier, la formation de biofilms sur les surfaces des équipements de traitement peut poser des défis significatifs pour la sécurité et la qualité des produits laitiers. Les films protéiques présents dans le lait et les produits laitiers créent des conditions propices à l'attachement bactérien et à la formation de biofilms (**Simões et al., 2010**).

Les protéines du lait, telles que la caséine et le lactosérum, peuvent se déposer sur les surfaces des équipements de transformation laitière. Ces dépôts protéiques forment une couche sur les surfaces qui favorise l'adhésion des bactéries comme *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* (**Habimana et al., 1996**).

La formation de biofilms sur les équipements laitiers peut entraîner une contamination persistante, affectant la durée de vie et la sécurité des produits laitiers. Par exemple, les biofilms de *Pseudomonas fluorescens* peuvent causer des altérations organoleptiques dans le lait en raison de la production d'enzymes extracellulaires (**Marchand et al., 2012**).

Les films protéiques peuvent protéger les bactéries des agents de nettoyage et de désinfection, rendant le contrôle des biofilms plus difficile. Les résidus de lait non éliminés lors du nettoyage peuvent servir de substrat pour la formation de biofilms (**Bremer et al., 2006**).

Les séparateurs à crème sont particulièrement susceptibles à la formation de biofilms en raison de l'accumulation de protéines et de matières grasses. Les biofilms de bactéries lactiques et de pathogènes peuvent contaminer le produit final (**Flint et al., 1997**). Ainsi, les conduites de lait en acier inoxydable et en plastique sont souvent sujettes à la formation de biofilms, ce qui peut entraîner

des contaminations croisées et des problèmes de qualité du lait cru et pasteurisé (**Chmielewski et al., 2003**).

5.3 Les facteurs liés aux microorganismes

Ces facteurs incluent la production d'exopolysaccharides (EPS), La présence de flagelles et de fimbriae et l'hydrophobicité de la surface de la cellule.

5.3.1 La production d'exopolysaccharides (EPS)

EPS est l'un des composants essentiels du biofilm, ce sont des macromolécules appartenant au groupe des carbohydrates. De plus, des polymères hydrosolubles composés de motifs répétitifs de sucre jouent un rôle essentiel pour les espèces bactériennes qui les produisent. Parmi ces fonctions, on retrouve la constitution d'une matrice de biofilm, la rétention des nutriments, la protection contre les menaces environnementales et même la pathogénicité (**Bagnolet et al., 2022 ; Barcelos et al., 2020 ; Petruzzi et Inzana, 2016**).

Streptococcus thermophilus est l'une des bactéries homofermentaires thermophiles les plus commercialisables et largement utilisée dans l'industrie laitière. Certaines souches de *S. thermophilus* ont la capacité de produire des EPS, ce qui a été très intéressant pendant longtemps, car les EPS peuvent améliorer la viscosité, la texture et la sensation en bouche des produits laitiers. Dans l'industrie alimentaire, les EPS sont également employées en tant qu'épaississants, stabilisateurs et agents de conservation, ainsi que comme émulsifiants et gélifiants (**Patel et al., 2013**).

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**).

5.3.2 La présence de flagelles et de fimbriae

5.3.2.1 Flagelles

Le flagelle, une hélice hélicoïdale filamenteuse reliée par un crochet à un moteur rotatif, est le mécanisme non réciproque de la motilité bactérienne le plus scrupuleusement étudié. Les flagelles permettent aux bactéries de nager à une vitesse moyenne 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**).

5.3.2.2 Fimbriae (pili)

Ce sont des polymères protéiques multisubunitaires à la surface des cellules (**Mandlik et al., 2008**). Les bactéries Gram-négatives forment généralement leur tige du pilus par homopolymérisation non covalente des protéines de la sous-unité majeure du pilus (pilines). Par contre, les pili récents trouvés chez les bactéries Gram-positives sont constitués par polymérisation covalente des sous-unités de piline, ce qui requiert l'utilisation d'une enzyme sortase spécifique (**Proft et Baker, 2008**).

Le développement du biofilm varie en termes d'adhésion et de moment entre les souches piliées et non piliées (**Nagar et al., 2017**). Pour certaines espèces bactériennes, l'absence de pili constitue un défaut majeur dans la formation du biofilm, tandis que pour d'autres espèces non piliées, il y a une formation du biofilm (**Mandlik et al., 2008**).

La bactérie *B. cereus*, qui se trouve fréquemment dans les produits laitiers, peut provoquer des intoxications alimentaires en produisant des toxines. Chez *B. cereus*, les flagelles peuvent contribuer à la mobilité de la bactérie, lui permettant ainsi 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. Malgré leur capacité à adhérer aux surfaces des équipements de transformation laitière, des conduites et des surfaces de contact, les fimbriae peuvent entraîner la formation de biofilms bactériens, ce qui représente un risque dans l'industrie laitière. En effet, 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**).

5.3.3 L'hydrophobicité de la surface de la cellule

L'hydrophobie de la surface des cellules joue un rôle important dans l'attachement cellulaire et la formation de biofilms. L'affinité entre les hydrophobies relatives de la cellule et de la surface solide est définie comme la compatibilité entre les cellules et les surfaces solides. Ainsi, la fixation des cellules est positivement influencée par la compatibilité hydrophobe entre les cellules et les surfaces solides (**Oda et Tanikawa, 2022**).

L'aspect hydrophobique de la surface des microorganismes revêt une importance capitale dans le secteur laitier. Son rôle est essentiel dans différents processus tels que la formation de biofilms, l'adhérence aux surfaces et la résistance aux techniques de nettoyage et de désinfection. Dans cet environnement, les microorganismes peuvent être avantageux, tels que les bactéries lactiques utilisées pour la fermentation des produits laitiers, ou néfastes, tels que certaines bactéries provoquant des maladies (**Lianou et Koutsoumanis, 2017**).

Listeria monocytogenes, une bactérie infectieuse fréquemment liée aux produits laitiers empoisonnés. L'importance de l'hydrophobicité de surface dans la persistance des microorganismes dans l'environnement laitier est mise en évidence par les souches de *L. monocytogenes* les plus hydrophobes, ce qui met en évidence leur résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection (**Lianou et Koutsoumanis, 2017**).

6 Le quorum sensing

Il existe des mécanismes qui régulent la formation d'un biofilm, comme le Quorum-Sensing (QS). On appelle ces mécanismes de contrôle cellulaire des mécanismes de perception de densité cellulaire, qui se manifestent par des signaux entre les cellules, par le biais de médiateurs chimiques, et qui dépendent de la quantité de cellules présentes. Ces dispositifs reposent sur le concept de masse critique. Après avoir atteint une valeur seuil des concentrations en molécules signaux, des régulateurs transcriptionnels sont activés et contrôlent des gènes particuliers (**Irie et Parsek, 2008 ; Tomlin et al., 2005 ; Costerton 1999, Costerton et al., 1999**).

La physiologie du biofilm est régulée par le QS, qui joue un rôle dans la taille de la population du biofilm et dans la prise en compte des conditions environnementales. Il déclenche la dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm (**Irie et Parsek, 2008**).

Le QS pourrait également jouer un rôle dans l'épaisseur du biofilm en réprimant ou en stimulant l'expression de certains caractères, tels que la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, tels que des protéases (**Irie et Parsek, 2008 ; Clutterbuck et al., 2007 ; Tomlin et al., 2005**).

Les molécules du QS ont également un impact sur la résistance à l'attaque d'autres organismes vivants, tels que des protozoaires comme *Serratia marcescens* (**Queck et al., 2006**).

7 Les biofilms dans l'industrie laitière

Le biofilm est défini dans l'industrie laitière de la même manière que dans les milieux industriels et cliniques. Toutefois, dans le domaine laitier, la composition du lait peut influencer l'adhésion des bactéries (**Alonso et al., 2022**).

Des biofilms dans les lignes de production laitières ont déjà été liés à de nombreuses bactéries d'altération et/ou pathogènes, telles qu'*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* (**Cherif-Antar et al., 2016**).

Ces biofilms peuvent être formés dans différentes parties des équipements de transformation des produits laitiers. Les pièces à haut risque pour la formation de biofilm sont 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 (**Fysun et al., 2019**).

Les surfaces fréquemment utilisées dans l'industrie laitière ont été observées avec des biofilms, comme l'acier inoxydable, l'aluminium, le verre, le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le caoutchouc nitrile (Buna-N) et les joints en téflon (**Cappitelli et al., 2014**).

Une étude a été publiée concernant la persistance de certains agents pathogènes d'origine alimentaire sur les surfaces en contact avec les aliments en forme de biofilms, ce qui a des conséquences sur la qualité et la sécurité des produits alimentaires (**Satpathy et al., 2016**).

Les biofilms présents dans les équipements de transformation des produits laitiers entraînent de multiples problèmes, tels que la corrosion accrue des surfaces métalliques, la diminution de l'efficacité du transfert de chaleur, la réduction du débit des canalisations et l'augmentation de la résistance au frottement des fluides, ce qui entraîne une diminution de la qualité microbiologique des produits finaux et des pertes économiques. La suppression des micro-organismes présents dans le biofilm demeure un défi majeur dans le secteur laitier (**Cherif-Anntar et al., 2016**).

Les biofilms offrent aux bactéries la capacité de coloniser des environnements compétitifs et stressants, favorisant leur survie en cas de carence nutritionnelle, de variations de pH, et face à l'attaque des bactériophages. Cette résilience est attribuable à la matrice polymérique, qui agit à la fois comme une enveloppe protectrice et un support structurel pour les bactéries intégrées au biofilm (**Rumbaugh et Sauer, 2020**).

La formation de biofilms au sein de l'industrie laitière, notamment dans les effluents, les bassins refroidissants et les équipements de traitement du lait, a été documentée (**Alonso et Kabuki, 2019**).

La présence de biofilms dans ce contexte industriel entraîne des pertes économiques significatives. En effet, la formation de biofilms sur les surfaces des équipements laitiers provoque l'érosion du matériel, des obstructions dans les tuyaux, des dépôts sur les équipements, une résistance accrue des bactéries aux procédures de nettoyage, et une augmentation des coûts énergétiques (**Alonso et Kabuki, 2019**).

La complexité des équipements industriels modernes complique le processus de nettoyage des surfaces, pouvant potentiellement conduire à une contamination post-pasteurisation par des bactéries responsables de la détérioration des aliments, notamment celles des genres *Pseudomonas* et *Enterococcus* (**Yuan et al., 2019**).

De plus, il existe le risque d'apparition de maladies chez les consommateurs et divers pathogènes alimentaires, tels qu'*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Salmonella enterica*, peuvent former des biofilms dans les environnements alimentaires (Yuan *et al.*, 2020).

Chapitre 2

Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

1 Introduction

On dénombre 350 espèces, sous-espèces ou pathovars (pv) de bactéries phytopathogènes, réparties en 21 genres (**Paulin et al., 2001**).

Pseudomonas est un genre proposé par Migula en 1894 et modifié à plusieurs reprises (**Kersterson et al., 1996 ; Gagnard et Luisetti., 1993**). Ce genre bactérien est ubiquiste, il peut coloniser le sol, la rhizosphère, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition, ainsi que l'eau douce et l'eau de mer (**Peix et al., 2009**).

Les *Pseudomonas* font partie du genre des Eubactéries non photosynthétiques et chimiotrophes, de l'ordre des Eubacteriales et de la famille des *Pseudomonadaceae*. (**Buchanan., 1917, Winslow et al., 1917**).

2 Définition

L'espèce la plus commune, la plus connue et la plus pathogène du genre *Pseudomonas* est *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit d'un petit bacille à Gram négatif qui est asporulé, acapsulé et très mobile. À l'état saprophyte, cette bactérie se trouve dans l'eau et les sols humides, ainsi qu'en commensale dans le tube digestif des êtres humains et de différents animaux. Il s'agit généralement d'une contamination progressive de l'environnement de traite (machine, lavette, eau) qui entraîne une infection secondaire des vaches. *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (**Mavrodi et al., 2001**).

3 Historique

Pseudomonas aeruginosa, un pathogène bactérien opportuniste, a été appelé de nombreux noms tout au long de son histoire en fonction de la coloration bleu-vert caractéristique produite en culture ; *Bacillus pyocyaneus*, *Pseudomonas polycolor*, *Bakterium aeruginosa* et *Pseudomonas pyocyaneus* (**Botzenhart et Döring, 1993**).

En 1850, Sédillot a été le premier à observer que la décoloration des pansements chirurgicaux était liée à un agent transférable. En 1860, Fordosen a extrait le pigment bleu responsable de la coloration, et en 1862, Lucke a été le premier à l'associer à des organismes en forme de bâtonnet (**Pitt, 1998**).

L'isolement de *P. aeruginosa* en culture pure n'a été réussie qu'en 1882, lorsque Carle Gessard a rapporté dans une publication intitulée « Sur la coloration bleue et verte des bandages » la croissance de l'organisme à partir des blessures cutanées de deux patients souffrant de pus vert bleuâtre

(Gessard, 1984). Plusieurs autres études datant de 1889 à 1894 ont décrit *P. aeruginosa* comme étant responsable de la purulence bleu-vert dans les plaies des patients (Villavicencio, 1998).

4 Habitat

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire. Son habitat naturel et permanent est constitué de sols humides, de végétaux et surtout d'eaux douces, marines ou usées (Ruiz et al., 2004).

Tous les réservoirs d'eau peuvent être contaminés en milieu hospitalier : les siphons d'éviers, les chasses d'eau, les piscines et bains bouillonnants, les humidificateurs, les nébulisateurs et les respirateurs artificiels sont des sources potentielles de contamination (Mérens et al., 2013). Cette bactérie est également présente dans le matériel médical ou chirurgical, ainsi que dans des solutions antimicrobiennes (Delarras, 2007).

Dans le contexte des industries laitières, *P. aeruginosa* peut coloniser différents matériaux et équipements utilisés dans la production et le traitement des litières, tels que les réservoirs, les tuyaux, les pompes et les surfaces de contact (Fysun et al., 2019). La présence de cette bactérie dans les industries laitières peut poser des défis en termes de contrôle de la contamination microbiologique. En effet, cette bactérie peut former des biofilms résistants sur les surfaces, ce qui rend leur élimination difficile et favorise leur persistance dans l'environnement industriel. De plus, *P. aeruginosa* est capable de développer des résistances aux agents antimicrobiens, ce qui complique davantage la gestion de sa présence dans les installations laitières (Moradali et al., 2017 ; Cherif-Anntar et al., 2016).

5 Etymologie et Taxonomie

Pseudomonas aeruginosa, anciennement connue sous le nom de bacille pyocyanique, est une espèce bactérienne qui est formée des mots grecs **Pseudo** (imitation), **monas** (unité) et latin **aeruginosus** (couvert de rouille) (Mérens et al., 2013).

Le terme *aeruginosa*, en latin vert de gris, désigne le pigment sécrété par la bactérie et qui confère à la colonie sa couleur distinctive. L'espèce de *Pseudomonas* typique est *P. aeruginosa* (Yeterian, 2010).

Comme toutes les bactéries, la classification de *P. aeruginosa* a été initialement basée sur l'analyse de leurs caractéristiques phénotypiques (morphologiques, biochimiques), puis sur leurs caractéristiques génotypiques (l'analyse du génome) (Solbi, 2013). Sa taxonomie est présentée dans le tableau 01:

Tableau 1 : Taxonomie de *P.aeruginosa* (Balouki, 2017) :

Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonales</i>
Famille	<i>Pseudomonaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

6 Bactériologie de *Pseudomonas aeruginosa*

La bactériologie de *Pseudomonas aeruginosa* présente différents aspects, en mettant l'accent sur ses caractéristiques phénotypiques, incluant les traits morphologiques, culturels et biochimiques, ainsi que ses caractéristiques génotypiques, afin de fournir une compréhension approfondie de cette bactérie complexe et adaptable.

7 Caractères phénotypiques

Les caractères phénotypiques de *P. aeruginosa* jouent un rôle important dans l'identification et la compréhension de cette bactérie. Ces caractéristiques comprennent des aspects morphologiques, culturels et biochimiques, qui permettent non seulement de différencier *P. aeruginosa* des autres bactéries, mais aussi d'apprécier ses capacités d'adaptation et de survie dans divers environnements.

7.1 Caractères morphologiques

P. aeruginosa est un bâtonnet de 1 à 5 μm de longueur et 0,5 à 1 μm de large. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, non sporulée, strictement aérobie, généralement non capsulée, mais parfois entourée d'une pseudo-capsule appelée slime, qui peut jouer un rôle crucial dans la pathogénicité de cette bactérie. Elle est très mobile grâce à la présence d'une flagelle polaire unique (monotriche) (Solbi, 2013 ; Chaker, 2012).



Figure 7: Image tridimensionnelle de *P. aeruginosa* générée par ordinateur (3D)

7.2 Caractères cultureux

P. aeruginosa présente des caractères cultureux distinctifs qui facilitent son isolement et son identification. Capable de se développer sur une variété de milieux de culture, cette bactérie affiche une remarquable adaptabilité à différentes conditions environnementales, incluant une large plage de températures et de pH. Les caractéristiques culturelles, telles que l'aspect des colonies, la croissance en aérobiose et l'odeur typique, sont essentielles pour les microbiologistes dans la détection et l'étude de *P. aeruginosa*.

7.2.1 Milieux

La bactérie *P. aeruginosa* se reproduit facilement dans tous les milieux favorables aux bacilles à Gram négatif. On peut l'isoler dans des milieux sélectifs tels que Drigalski, Mac conkey, Hektoen, Salmonella Shigella et trypticase soja. Les scientifiques proposent des milieux sélectifs à base de Cétrimide, qui peuvent être ajoutés (ATB) acide nalidixique, pour étudier les produits très contaminés ou les eaux (hydrologie), ainsi que des milieux ordinaires non sélectifs tels que la gélose nutritive (Ariane, 2017 ; Eyquem *et al.*, 2005 ; Montil *et al.*, 1992).

7.2.2 Température

Le bacille pyocyanique est une bactérie à besoins très limités. Elle pousse entre 30 et 37 °C en 24 heures. Elle est mésophile et capable de se développer à des températures allant de +4°C à +45°C (Barir et Ghilani, 2011).

7.2.3 Atmosphère

Il est possible de cultiver *P. aeruginosa* dans tous les milieux en aérobiose, mais il peut également utiliser des nitrates en conditions anaérobies (Souley et Moustafa, 2002).

7.2.4 Odeur

Il dégage une odeur aromatique typique du seringa, dû à la synthèse d'ortho-amino-acétophénone, un élément intermédiaire du métabolisme du tryptophane et non associé à la production de pigments (Eyquem *et al.*, 2005 ; Montil *et al.*, 1992).

7.2.5 PH

Les espèces de ce genre sont sensibles à des variations de pH faibles (6,5 à 7,5) avec un pH optimal de 7,2. Elles ne peuvent se développer à un pH inférieur à 4,5 (Palleroni, 1984).

7.2.6 Aspect des colonies

Trois catégories de colonies peuvent être observées simultanément ou de manière isolée :

- **Colonies « Large »** : isolées, grandes, avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier. Elles sont caractérisées par une autolyse qui donne un aspect métallique, irisé lors de la culture en nappe de la bactérie. Ce phénomène est lié à l'action des enzymes protéolytiques bactériennes (Solbi, 2013).
- **Colonies S « Small »** : petites, mates, légèrement bombées avec un bord circulaire régulier (Solbi, 2013).
- **Colonies M « Muqueuses »** : bombées, opaques, visqueuses, parfois coulantes. Ces colonies sont retrouvées presque spécifiquement dans des infections chroniques, urinaires ou surtout pulmonaires. La bactérie produit alors un polysaccharide extracellulaire (l'acide alginique) qui est différent du « slime » (Solbi, 2013).

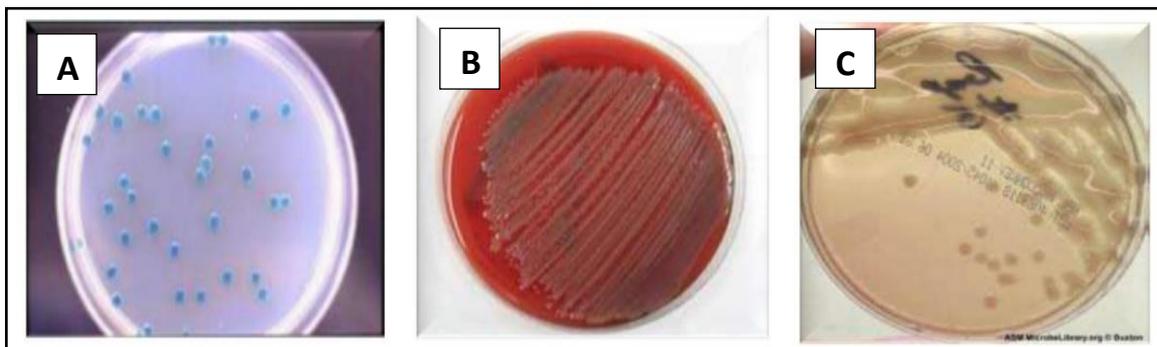


Figure 8: Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur différents milieux de culture : (A) : colonies « Large » , (B) : colonies « Small » , (C) : colonies « Muqueuse » (Solbi, 2013)

7.3 Caractères biochimiques

Le métabolisme de *P. aeruginosa* est oxydatif. Il est capable de décomposer des composés complexes tels que les protéines et les polysaccharides complexes tels que l'amidon et la cellulose (Boudouda, 2015 ; Mezaache, 2012).

En général, il transforme les nitrates en nitrites (réduction des nitrates en nitrites pouvant atteindre le stade d'azote gazeux), et il contient une arginine-dihydrolase, une lécithine (qui ne peut être découverte qu'en milieu liquide), et il génère de l'ammoniac à partir de la dégradation de l'acétamide (Memdouh et Reddaf, 2018).

Les tests sont positifs pour la catalase, l'arginine d'hydrolase (ADH), le citrate de Simmons, la gélatinasse, tandis que les tests sont négatifs : Quelques souches hydrolysent l'O-nitrophényl-βD-galactopyranoside (ONPG) à l'aide d'une enzyme différente de la bêta-galactosidase, utilisant une enzyme différente de la bêta-galactosidase (Boussouf et Yahia, 2020).

P. aeruginosa produit deux types de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans les milieux King B et King A : (Delarras, 2007).

- La pyoverdine : pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme.
- La pyocyanine (phénazinique) : pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme.

Cette espèce est la seule à les produire (Delarras, 2007)

8 Caractères génotypiques

Le génome de la souche PA01 de *P. aeruginosa* a été complètement séquencé en 2000. C'est l'un des génomes bactériens les plus étendus, comprenant 6,3 millions de paires de bases qui codent pour 5570 gènes avec un pourcentage molaire C+G important (66%) (Stover *et al.*, 2000) Seuls 6,7 % de ces gènes ont une fonction bien connue. Le pourcentage des séquences régulatrices est plus important dans le génome entier de *P. aeruginosa* (8,4%) (Stover *et al.*, 2000) Environ 200 à 300 gènes, ce qui représente 5% du génome, codent pour des facteurs de virulence (Köhler et Delden, 2009).

P. aeruginosa possède une grande variété de gènes impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques. Cette variété lui permet d'utiliser de nombreux composés organiques et

de se développer dans de nombreuses zones écologiques, même celles qui sont pauvres en nutriments. De plus, elle présente une résistance intrinsèque aux ATB (**Boussouf et Yahia, 2020**).

Cette bactérie présente de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction, et la majorité des souches sont multilysogènes. Cela explique les nombreuses variations génétiques observées dans l'espèce, notamment la fréquence des souches multirésistantes aux ATB (**Figure 9**) (**Veron, 1983**).

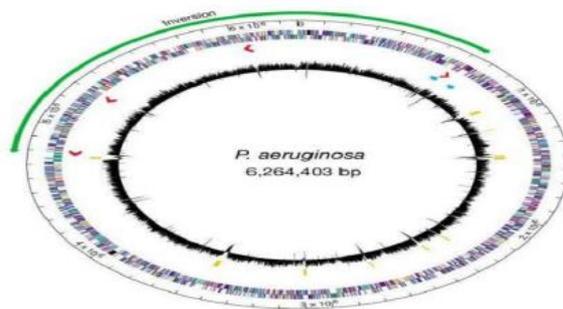


Figure 9 : Génome de *P. aeruginosa* (**Stover et al., 2000**)

9 Facteurs de pathogénicité et pouvoir pathogène

9.1 Facteurs de pathogénicité

On attribue la pathogénie de *P. aeruginosa* à la capacité de produire un large éventail de facteurs de virulence membranaires ou extracellulaires qui agissent à divers niveaux pendant l'infection, lui permettant de survivre chez des hôtes et dans l'environnement. Les différents types de processus d'infection sont influencés par ces facteurs, ce qui permet à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte (**Ben Hadj Khalifa et al., 2011**).

Les facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë sont différents de ceux liés à l'infection chronique :

Cette bactérie possède plusieurs facteurs de virulence permettant sa survie dans différents hôtes :

9.2 Les facteurs de virulence membranaires (structuraux)

- **Le flagelle bactérien** qui est impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires. Il joue aussi un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien in vitro (**Ben Hadj Khalifa et al., 2011**);

- Le **pilus de type IV** est la principale adhésine de *P. aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Memdough et Reddaf, 2018 ; Ben Hadj Khalifa *et al.*, 2011) ;
- Les **pili de type fimbriae et systèmes Cup**, ce sont des facteurs d'attachement essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm (Gougeon, 2017) ;
- Le Lipopolysaccharide (LPS) qui protège contre l'action bactéricide du sérum et pour son activité endotoxique. Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et les interactions avec les tissus hôtes (Memdough et Reddaf, 2018 ; Ben Hadj Khalifa *et al.*, 2011) ;
- Les **alginates** permettent la formation d'un biofilm qui favorise l'adhésion aux cellules épithéliales et protège la bactérie de la phagocytose, des anticorps, de l'action des antibiotiques et des désinfectants (Ben Hadj Khalifa *et al.*, 2011).

9.3 Les facteurs de virulence extracellulaires (sécrétés)

9.3.1 Hémolysines ; deux hémolysines sont produites :

- ✓ Les **phospholipases C** sont des enzymes thermolabiles extracellulaires qui renferment des ions zinc indispensables à leur activité enzymatique.
- ✓ Les **rhamnolipides** qui possède un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes (Memdough et Reddaf, 2018 ; Solbi, 2013) ;

9.3.2 Toxines qui perturbent la production de protéines dans les cellules eucaryotes :

- ✓ La **cytotoxine** : Elle entraîne la destruction de la membrane des leucocytes en provoquant la création de pores et la libération de granules et d'enzymes lysosamiques.
- ✓ L'**exotoxine A** : (ETA) est le composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa* chez la souris. Sa structure et son action sont similaires à celles de la toxine diphtérique. Elle a un impact sur la production de protéines, interrompt le processus d'élongation des chaînes peptidiques des eucaryotes, ce qui entraîne la lyse cellulaire avec des lésions tissulaires et l'invasion bactérienne.
- ✓ L'**exotoxine S** : Cette enzyme est responsable de la dépolarisation des filaments d'actine et de vimentine du cytosquelette des macrophages. Elle agit aussi sur l'invasion des tissus et la propagation des bactéries (Solbi, 2013 ; Meradji, 2017 ; Ariane, 2017).

9.3.3 **Système de sécrétion de type III et ses toxines** qui permet à la bactérie d'injecter directement ses toxines dans le cytoplasme des cellules cibles. Elles incluent :

- ✓ **L'exoenzyme S** : c'est la cytotoxine la mieux décrite actuellement. Son rôle pathogène lié à l'activité de l'ADP ribosyltransférase qui entraîne une perturbation de l'organisation normale du cytosquelette. Il s'agit d'une enzyme bifonctionnelle (activité GTPase et ADP ribosyltransférase). Elle inhibe ainsi la phagocytose, en empêchant l'internalisation du bacille par les cellules épithéliales et les macrophages.
- ✓ **L'exoenzyme T** : elle est également bifonctionnelle et partage des homologies avec l'exoenzyme S. Cependant, son activité ADP ribosyltransférase est bien moindre (par rapport à celle de l'ExoS), elle est donc considérée comme une cytotoxine mineure.
- ✓ **L'exoenzyme U** : elle est plus cytotoxique que l'exoenzyme S. Elle clive les acides gras membranaires et est associée à la destruction du tissu pulmonaire, avec des pneumopathies sévères. L'expression de l'ExoU accroît ainsi la virulence du bacille pyocyanique dans un modèle de pneumopathie aiguës chez la souris.
- ✓ **L'exoenzyme Y** : c'est une adénylate cyclase qui induit une accumulation d'AMPc au niveau intracellulaire, avec pour conséquence un changement de morphologie des cellules qui s'arrondissent. Cela entraîne la formation de trous intercellulaires et détériore l'endothélium pulmonaire (**Gougeon, 2017 ; Ariane, 2017**).

9.3.4 **Protéases** qui provoquent des lésions tissulaires qui facilitent l'implantation et inhibent des protéines de défense de l'hôte. Elles incluent :

- ✓ L'élastase, une métalloprotéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante ;
- ✓ La protéase alcaline, protéase qui dégrade la fibrine et son rôle pathogène est documenté dans les infections cornéennes comme toutes les protéases produites chez *P. aeruginosa*. Il y a aussi les deux pigments qui ont un pouvoir pathogène (**Solbi, 2013 ; Ben Hadj Khalifa et al., 2011**).

9.3.5 **Lectine** qui pourrait être impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion bactérie-hôte, bactérie-bactérie ou encore bactérie-biofilm (**Gougeon, 2017**) ;

2. Pouvoir pathogène : Les infections à *P. aeruginosa* sont remarquables, elles sont polymorphes dans leurs expressions cliniques et dans leurs localisations (**Darghout et Metheni, 2016**).

Il s'agit d'une bactérie saprophyte, pathogène opportuniste, qui peut provoquer des infections multiples. Il s'agit alors d'infestations massives (chez les nageurs de piscines contaminés) ou

d'inoculations traumatiques directes dans un tissu ou une cavité (méningites ou ostéomyélites d'inoculation) (**Patrick et al., 1989 ; Thierry, 1997**).

Ses faibles exigences métaboliques en font un contaminant des solutions aqueuses de toutes natures, il est facilement amené en milieu hospitalier : médicaments, eaux d'évier, solutions aqueuses diverses, toutes surfaces humides (**Traore, 2019 ; Mehdi et al., 2014**).

10 Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'industrie alimentaire

Les biofilms présents dans une usine alimentaire en particulier les installations de production alimentaire mettent en péril la santé humaine. Le degré de danger varie en fonction des espèces bactériennes qui composent cette structure vivante tridimensionnelle. Les principaux lieux de formation de biofilms varient en fonction du type d'usine, mais peuvent inclure de l'eau, du lait et d'autres conduites de liquide, des plaques de pasteurisateur, des membranes d'osmose inverse, des tables, des gants d'employés, des surfaces de contact, des silos de stockage pour les matières premières et les additifs, des tubes distributeurs, des matériaux d'emballage... etc. (**Camargo et al., 2017**).

On sait depuis longtemps que les surfaces des équipements et des ustensiles peuvent favoriser l'adhésion, le développement et la détérioration des micro-organismes. Parmi ces organismes, on retrouve *Pseudomonas aeruginosa*, qui fait partie des bactéries d'altération qui participent aux processus d'adhésion et de formation de biofilms. On retrouve cette espèce d'altération dans les milieux de transformation des aliments, tels que le lait, les drains et les planchers, ainsi que sur les fruits, les légumes et la viande des surfaces.

Dans le contexte d'industrie laitière, le lait est conservé à une température basse pendant 2 à 5 jours avant d'être soumis à un traitement thermique (**De Jongheet al., 2011; Baur et al., 2015**). Pendant le stockage, ce qui peut réduire la qualité du lait cru à cause des micro-organismes psychrotrophes (**Lafarge et al., 2004; Xin et al., 2017**).

L'identification des *Pseudomonas* comme bactéries psychrotrophiques en fait l'un des groupes bactériens les plus importants de l'industrie laitière (**Wiedmann et al., 2000; Marchand et al., 2009b**). Les espèces de *Pseudomonas* les plus fréquemment détectées dans le lait et les produits laitiers sont *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi* et *P. lundensis* (**Mallet et al., 2012**). *Pseudomonas* spp peut croître sur une plage de températures de 4 à 42 °C, avec une température de croissance optimale supérieure à 20 °C (**Chakravarty et Gregory, 2015**). Ils sont présents dans des environnements différents et sont fréquemment liés à la détérioration des aliments, en particulier celle du lait cru (**Quigley et al., 2013 ; Chakravarty et Gregory, 2015**). Les *Pseudomonas* peuvent

dépasser d'autres bactéries à basses températures, représentant au moins 50% de toutes les bactéries dans le lait (Munsch-Alatossava et Alatossava, 2006; Frickeret *et al.*, 2011; von Neubecket *et al.*, 2015). Le développement des *Pseudomonas* est souvent lié à la sécrétion d'enzymes extracellulaires (peptidases, lipases). Les peptidases produites par *Pseudomonas* lors de la conservation à froid sont des peptidases extracellulaires thermostables qui peuvent conserver leur activité après pasteurisation ou traitement à ultra-haute température (UHT) (Marchand *et al.*, 2009a; Glück *et al.*, 2016).

Selon les souches de *P. aeruginosa* et/ou les conditions nutritionnelles, différents phénotypes de biofilm peuvent être développés (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Elles perdent leur motilité, s'attachent aux surfaces et forment des agrégations cellulaires ou micro-colonies incorporées dans les substances extracellulaires (EPS), pour protéger les bactéries de l'environnement (Moradali, 2017). Les composantes clés des EPS dans le biofilm de *P. aeruginosa* sont les exo polysaccharides y compris l'alginate, l'ADN extracellulaire (ADNe), les lipides et les protéines. Les pili extracellulaires du type IV (T4P) et les flagelles agissent également comme éléments structuraux dans les biofilms matures (Van Schaiket *et al.*, 2005; Barkenet *et al.*, 2008). Les fimbriae jouent un rôle important dans les interactions de cellule à cellule au stade précoce de la formation du biofilm (Wei et Ma, 2013). La composition et les fonctions des EPS dans le biofilm de *P. aeruginosa* ont été mises en évidence dans plusieurs revues (Flemming et Wingender, 2010; Moradali *et al.*, 2017).

Par exemple, dans les milieux à faible teneur en glucose, le cycle de vie du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 peut être subdivisé en cinq grandes étapes phénotypiques (Figure 10). Le processus commence par l'adhésion réversible de bactéries planctoniques sur une surface propice à la croissance (Figure 10, stade I), suivie d'une fixation irréversible des bactéries, qui forment ensuite des microcolonies dans la matrice EPS (Figure 10, stade II). Progressivement, les microcolonies bactériennes s'étendent et leurs confluences conduisent à un phénotype plus structuré avec un espace non colonisé (Figure 10, stade III). Ensuite, les espaces non colonisés sont remplis de bactéries, qui recouvrent finalement toute la surface (Figure 10, stade IV). Pendant ce temps, la croissance des communautés tridimensionnelles est observée (Figure 10, stade III et IV). Enfin, les bactéries se dispersent à partir de la structure sessile et rentrent à l'état planctonique pour se propager et coloniser d'autres surfaces (Rasamiravaka *et al.*, 2015) (Figure 10, stade V).

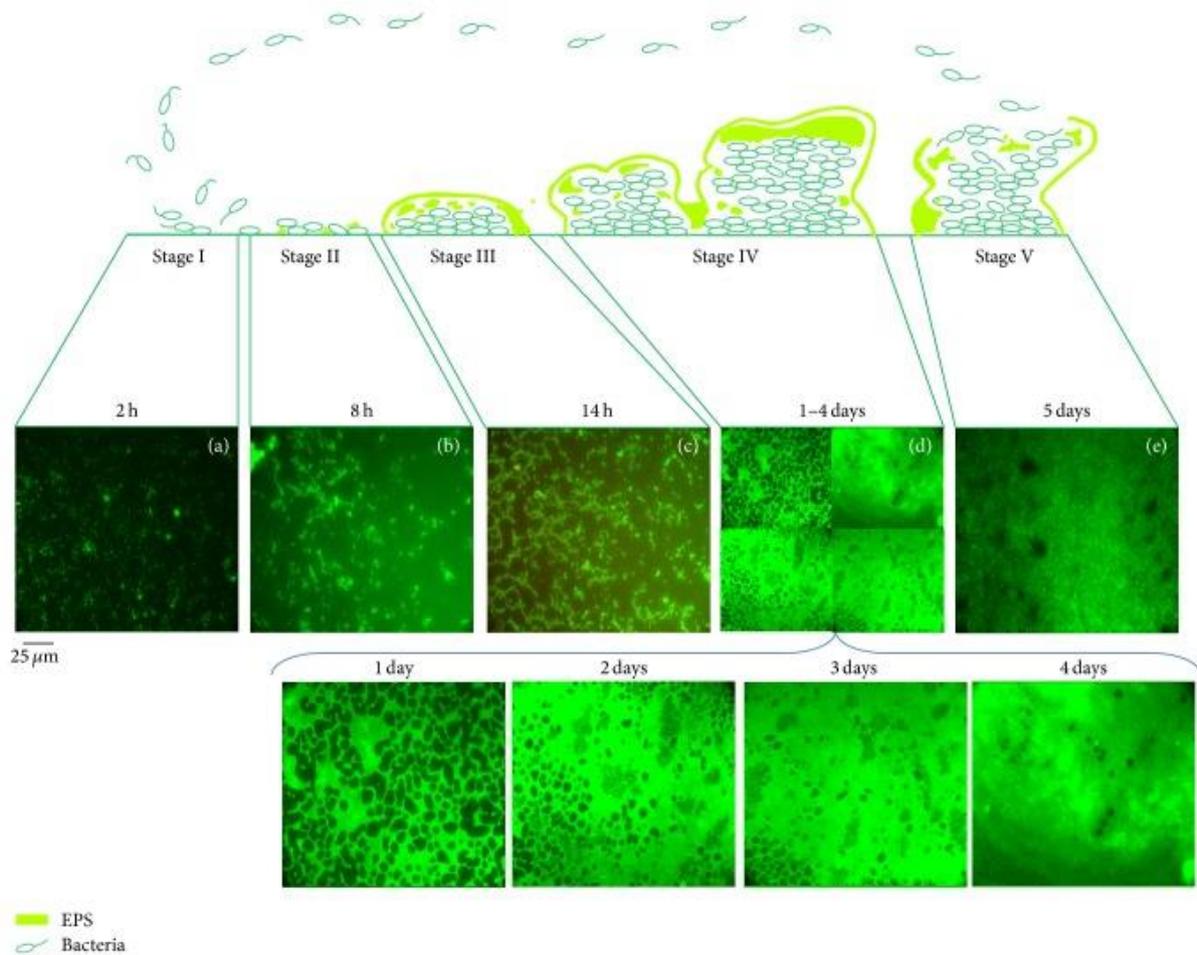


Figure 10 : Cycle de vie du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 cultivé dans un milieu à faible teneur en glucose (Rasamiravaka *et al.*, 2015)

11 Élimination du biofilm en industrie alimentaire

La formation de biofilms à la surface des tuyaux de transport du lait, des conteneurs de traite et des accessoires dans les industries laitières est souvent la principale cause de contamination des produits laitiers (Srey *et al.*, 2013). Les biofilms se forment principalement lorsque les bactéries peuvent facilement s'adhérer aux parois des tuyaux, comme lorsque le lait est placé dans des tuyaux de transport sans écoulement (Stoodley *et al.*, 2002). En outre, les bactéries présentes dans le biofilm ont aussi la capacité d'accroître la corrosion des conduits métalliques, de diminuer le transfert de chaleur et d'améliorer la résistance à la friction des fluides (Kumar et Anand, 1998; Gupta et Anand, 2018). Pour cette raison, il est essentiel de connaître le type de souillure à éliminer ainsi que le type de support (matériel) à nettoyer afin de sélectionner le produit nettoyant approprié. Le nettoyage sera efficace en fonction de plusieurs éléments tels que l'action mécanique, l'action

chimique (sélection du produit de nettoyage), la température et le temps de contact (**Wirtanen et Salo, 2003**) (Tableau 02).

Tableau 2: Choix du produit nettoyant en fonction des souillures (Diaby, 2018) :

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

La plupart des détergents utilisés dans l'industrie alimentaire sont des produits alcalins et acides, tels que ceux qui ont réussi à éliminer les biofilms de *Pseudomonas putida* de l'acier inoxydable (**Simões et al., 2010 ; Antoniou et Frank, 2005**).

La meilleure façon de lutter contre les biofilms en IAA consiste à avoir une compréhension de son secteur d'activité et des méthodes de production. Le respect des instructions d'utilisation joue également un rôle crucial dans la lutte contre les biofilms. Il peut être inefficace d'effectuer une opération de nettoyage et de désinfection qui ne respecte pas les paramètres fournis par le fournisseur (concentration, temps de contact, plage de pH, température, etc.). Par exemple, un produit désinfectant peut avoir une action bactéricide et sporicide à une concentration donnée, mais une

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

Les industries utilisent fréquemment le système de nettoyage en place (CIP) afin de contrôler les biofilms dans les chaînes de transformation du lait. La désinfection consiste à nettoyer régulièrement les tuyaux et les équipements en utilisant des solutions acides et alcalines appliquées à des températures élevées (**Bremer et al., 2006**). Son utilisation principale consiste à garantir la désinfection des surfaces propres et à éliminer les résidus organiques grâce à l'utilisation de désinfectants dans les lieux difficiles d'accès. (**Shi et Zhu, 2009**). Toutefois, les problèmes récurrents liés à la contamination et à la détérioration des produits causés par les biofilms persistent (**Ostrov et al., 2016**).

La lutte contre la formation de biofilms peut être réalisée aussi en empêchant l'adhésion bactérienne aux surfaces à l'avance. (**Palmer et al., 2007**). Selon cette stratégie, il est possible de diminuer la rugosité de la surface en utilisant des revêtements antimicrobiens ou des composés antiadhésifs qui repoussent les cellules bactériennes grâce à des mécanismes physiques efficaces (**Verran et Whitehead, 2005; Lejars et al., 2012**). En raison de la nécessité de matériaux non toxiques anti-biofilm, le revêtement des surfaces avec des agents antiadhésifs est plus intéressant car il ne contient pas de composés toxiques et ne peut pas entraîner la formation d'une résistance dans la flore bactérienne (**Nir et Reches, 2016**).

Une des méthodes intéressantes pour modifier les surfaces est l'emploi de peptides antimicrobiens. Ces peptides sont un groupe hétérogène de petites molécules produites par une grande variété de cellules qui présentent une puissante activité antibactérienne (**Batoni et al., 2011**). Certains peptides se caractérisent par leur capacité à inhiber la formation du biofilm (**Sakala et Reches, 2018**), ainsi, plusieurs essais ont été entrepris pour les exploiter sous leur forme naturelle ou synthétique dans les secteurs de la médecine et de l'alimentation (**Geng et al., 2018**). Ces peptides ont un impact sur les mécanismes cellulaires des bactéries, ce qui peut entraîner leur résistance, comme c'est le cas avec les antibiotiques (**Chung et Khanum, 2017; Hamley, 2017**).

Deuxième partie
Matériel et méthodes

1 Lieu d'étude

Ce travail a été mené au Laboratoire de Microbiologie de l'Institut des Sciences Et Techniques Appliquées (ISTA-Université de Tlemcen) et au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Université de Tlemcen durant la période allant du mois de **février** au mois de **mai 2024** pendant l'année universitaire 2023/2024.

2 Origine des souches

Un total de 03 souches (lamaabe4-30 et lamaabe4-02) et une souche de référence (ATCC-27853) appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a été utilisée dans le cadre de cette étude. Les deux souches lamaabe4-30 et lamaabe4-02 ont été isolées des lignes post-pasteurisation de production de lait cru après l'application du programme de nettoyage en place, identifiées sur le plan moléculaire par les deux techniques RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) et le séquençage de l'ADNr 16s et caractérisées par une capacité significative à former du biofilm *in vitro* sur les microplaques en polychlorure de vinyle lors d'une étude menée par Cherif-Antar *et al.*, en 2016.

3 Revivification des souches :

Dans le but de revivifier les souches conservées sur glycérol -80°C, une fraction est transférée dans 5ml du bouillon au cœur cervelle (BHIB) et incubée à 37°C pendant 24h. Après incubation et homogénéisation, un ensemencement est effectué sur la gélose Mac Conkey suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h.

4 Observation microscopique

Une observation microscopique est réalisée pour chaque souche dans le but de vérifier sa pureté. Pour cela, une coloration simple au bleu de méthylène est réalisée suivie d'une observation au microscope optique des frottis colorés au grossissement 100.

5 Conservation des souches

Une conservation à court terme est effectuée pour les souches sélectionnées pour cette étude après la vérification de leur pureté.

Pour cela, des tubes de gélose inclinée sont préparés comme suit : un volume de 7 mL de gélose nutritive en surfusion est transféré dans des tubes stériles puis ces tubes sont mis en position inclinée pour permettre à la gélose de solidifier. Après solidification, une colonie de chaque culture pure des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est ensemencée par stries sur la surface inclinée. Les tubes sont

incubés à 37°C/24h puis conservés à 4°C pour une période de 20 jours.

6 Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*

6.1 Préparation de la suspension bactérienne

Pour pouvoir étudier l'effet de la source de carbone sur la formation de biofilm, une suspension bactérienne pour chaque souche est préparée. Une colonie de chaque souche à étudier issue de la culture bactérienne revivifiée est transférée dans 10 mL de BHIB puis 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.

6.2 Formation de biofilm

Un total de 03 sources de carbone sont choisis à savoir le glucose (Specilab, Algérie), le galactose (Biochemchemopharma, France) et le lactose (Biochemchemopharma, France). Ce sont les sucres les plus rencontrés en industries laitières. Un total de 05 concentrations des trois sucres sont étudiés à savoir, 0.5, 1, 1.5, 2 et 2.5%. La technique utilisée est celle des microplaques de titration à 96 puits. Pour chaque souche, 03 puits de la microplaque sont remplis indépendamment par un volume de 200 μ l du bouillon BHI additionnée d'un type de sucre à une concentration précise. Un volume de 10 μ l de la suspension bactérienne est transféré dans chaque puits. L'incubation est faite par la suite en aérobiose à 25, 30 et 40°C pendant 24, 48 et 72h. Les puits du contrôle négatif sont remplis par le bouillon seulement.

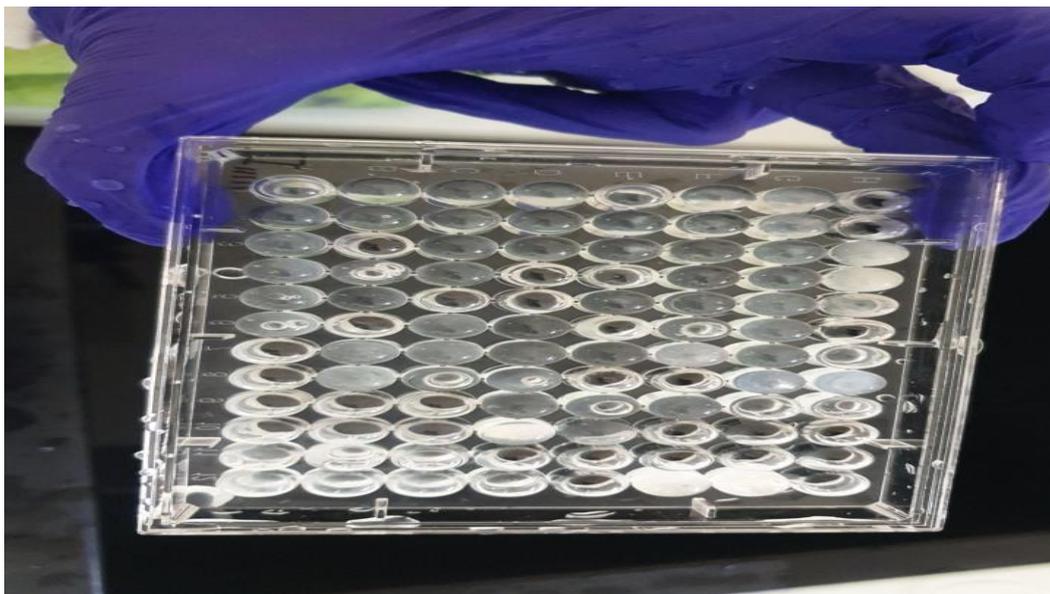


Figure 11 : Formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

6.3 Quantification des biofilms formés

La quantification des biofilms formés est réalisée par la technique de révélation au cristal violet. Cette technique consiste à éliminer le contenu des puits et les rincer par la suite avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute cellule non adhérente. Sécher les microplaques à l'air libre pendant 15min. remplir par la suite les puits avec 200 µl de la solution de cristal violet (**Loba Chemie Pvt. Ltd, Inde**) à 0,1% et laisser agir pendant 15 minutes à température ambiante. Éliminer l'excès du cristal violet puis rincer les microplaques et les laisser sécher comme précédemment. Une solubilisation du cristal violet est réalisée par l'ajout de 150 µl d'une solution d'acide acétique à 33%. L'adhésion bactérienne est révélée par la mesure de l'absorbance à 596nm à l'aide du lecteur automatique de microplaque (**Bio Tek, Etats- Unis**).

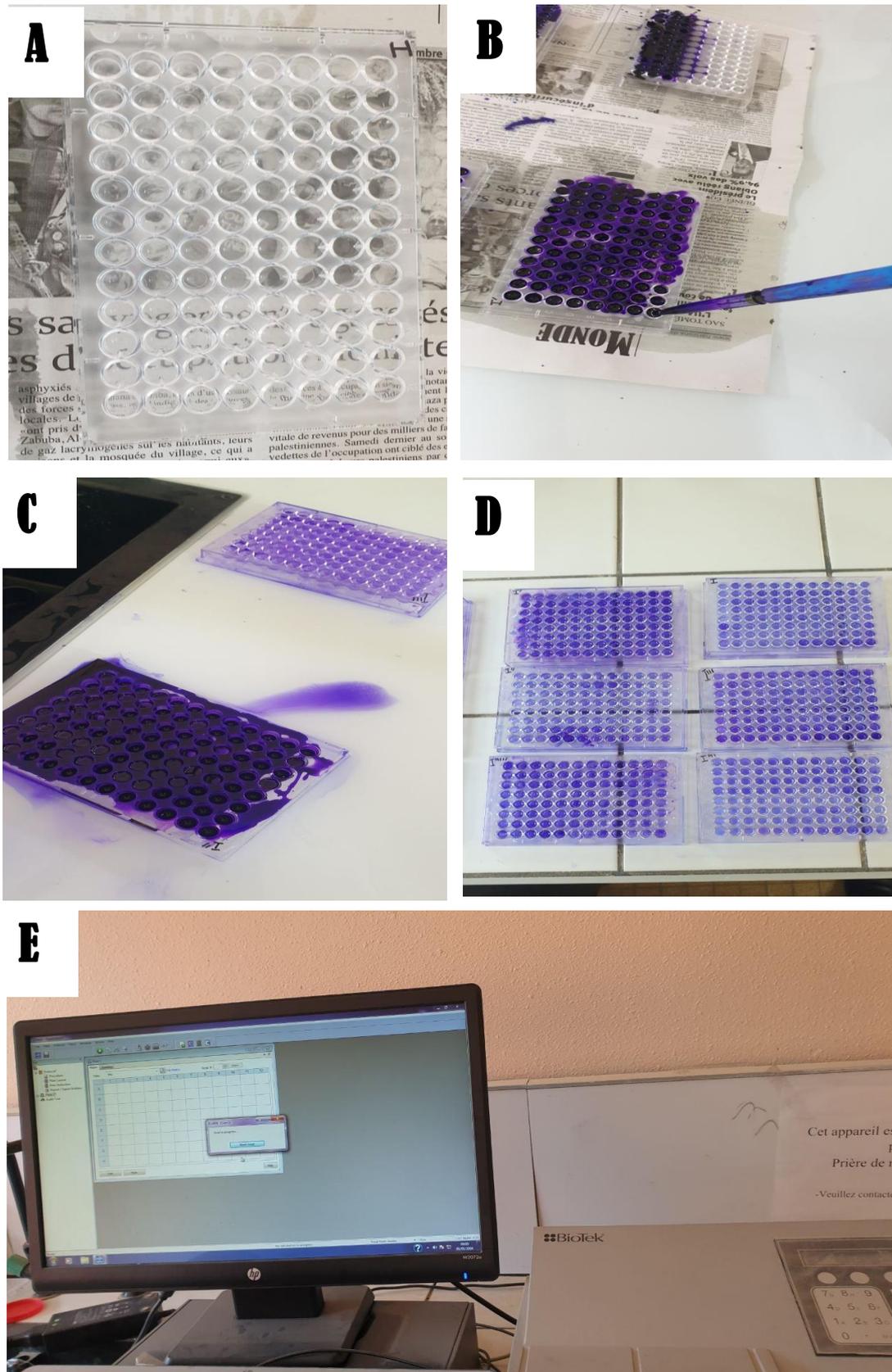


Figure 12 : Les étapes de quantification de biofilm par la technique de microplaque de titration a 96 puits : (A) : rinçage, (B) : coloration par le cristal Violet, (C) : rinçage le surplus de cristal Violet (D) : adhésion de l'acide acétique 33% et (E) : Lecture de résultats par ELISA

7 Evaluation de la capacité de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* sur le téflon

Des surfaces en PolyTétraFluoroEthylène (PTFE) ou le téflon PTFE de taille 2.5x1 cm sont utilisées pour tester, *in vitro*, la capacité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à former des biofilms sur ce type de surface. Ces surfaces ont été stérilisées par autoclave à 121°C pendant 20min.

7.1 Préparation de la suspension bactérienne : Comme décrit précédemment.

7.1.1 Formation de biofilm

Chaque surface de téflon préalablement stérilisée est placée dans un tube contenant 3ml du bouillon BHI et 1ml de la suspension bactérienne des souches à tester. Les tubes sont incubés par la suite à 25, 30 et 40°C pendant 24h.

7.1.2 Dénombrement des bactéries adhérees

Après l'incubation, chaque surface est récupérée aseptiquement puis rincée avec l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules non adhérees. Les surfaces de téflon sont par la suite transférées dans des tubes contenant 9mL d'eau physiologique stérile et soumis à un traitement au vortex pendant 30sec, cette étape est réalisée à trois reprises puis une série de dilution décimale allant jusqu'à 10⁻⁶ est effectuée. 100 µl de chaque dilution est inoculée dans des boîtes de Pétri contenant de la Gélose Plate Count Agar PCA (Fluka), et incubée à 37°C pendant 24 h. Les résultats sont exprimés en ufc/cm² selon la formule suivante :

$$N \text{ (ufc/cm}^2\text{)} = [n \ v/d]/S$$

n: nombre de colonie compté sur la boîte retenue ;

d: taux de dilution ;

V : volume total de la dilution qui a servi au dénombrement

S : surface de la lame délimitée à 5 cm².

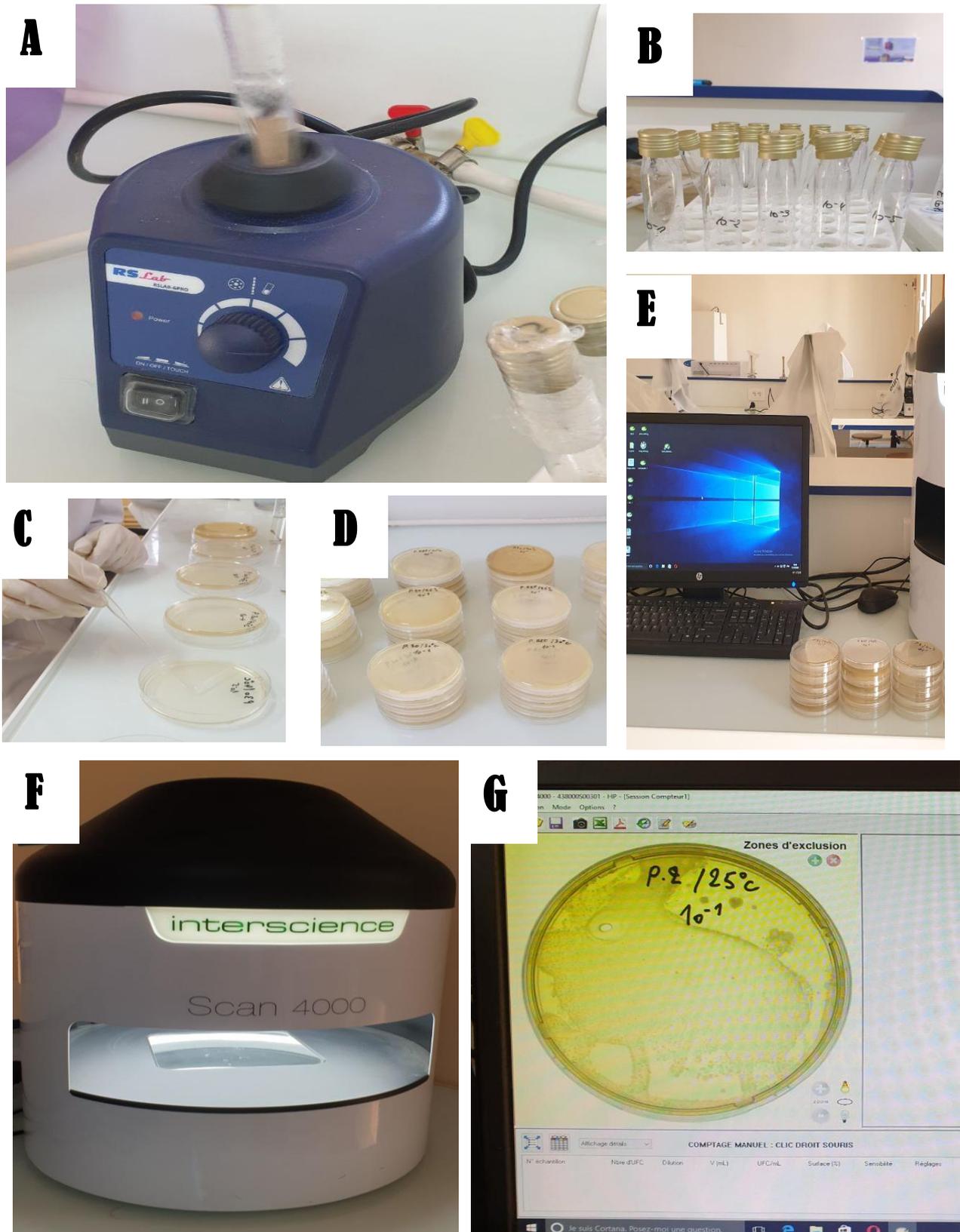


Figure 13 : Les étapes de quantification de biofilm sur téflon : (A) : Vortex, (B) : Dilution de suspension, (C) : Ensemencement sur gélose, (D) : Incubation et (E),(F),(G) : Lecture

Troisième partie Résultats et Discussion

L'effet de différentes sources de carbone couplé à différentes périodes d'incubation à des températures différentes sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* isolée des lignes de production du lait a fait l'objet de la présente étude.

1 Observation microscopique des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

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

1.1 Aspect macroscopique

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les souches de *P. aeruginosa* forment des colonies larges arrondies de grande taille et circulaire et pyoverdine avec un pigment jaune-vert et une partie centrale bombée et un contour irrégulier, les colonies ont un aspect lisse et humide avec une odeur aromatique typique du seringa sur gélose BHIA (**figure 14**).

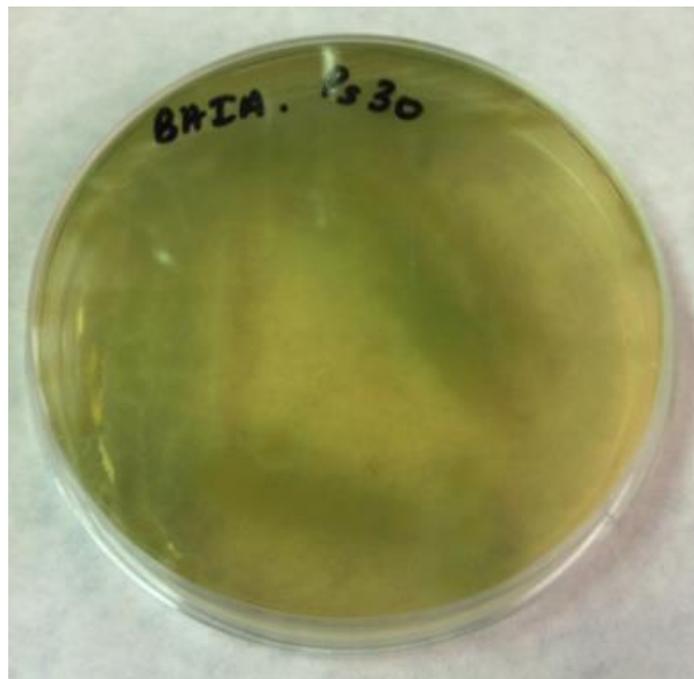


Figure 14:Aspect morphologique de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* lamaabe4-30 sur milieu BHIA

1.2 Aspect microscopique

Une coloration simple avec du bleu de méthylène est réalisée, pour l'observation microscopique. Toutes les cellules sont des bacilles (**figure 15**).

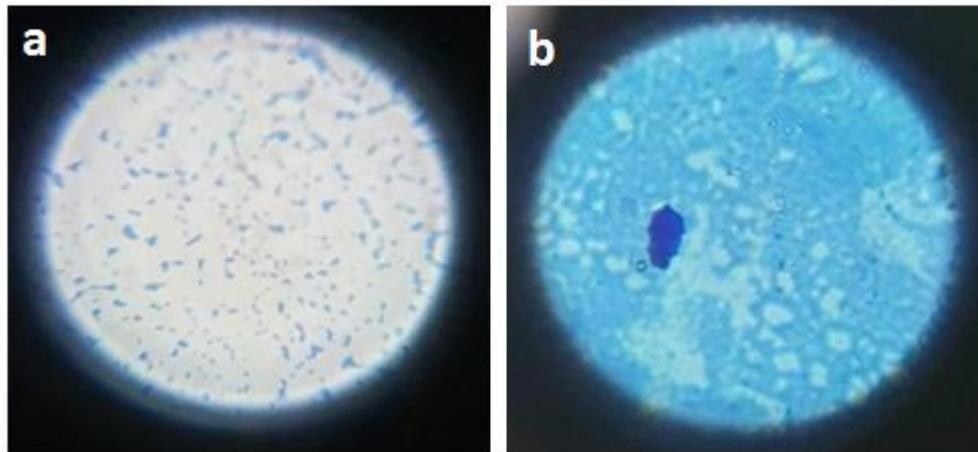


Figure 15 : Observation microscopique de *P. aeruginosa* (Grossissement x100) : (a) : *P. aeruginosa* lamaabe4-02 et (b) : *P. aeruginosa* lamaabe4-30

2 Effet de la source de carbone sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* en fonction de différentes températures

Cette étude visait à évaluer l'effet de différentes sources de carbone, couramment rencontrées dans l'industrie laitière, sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa*. Pour cela, trois types de sucres à savoir : le lactose, le glucose et le galactose sont sélectionnés et trois différentes températures 25°C, 30°C et 40°C.

Afin d'atteindre notre objectif, un total de 05 concentrations est choisi : 0,5%, 1%, 1,5%, 2% et 2,5% couplés à différente durée d'incubation 24, 48 et 72h.

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 *P. aeruginosa* lamaabe4-30 à 25°C d'incubation

Pour cette souche, les résultats obtenus après 24 heures d'incubation à 25°C variaient de 0,36 à 0,42 nm pour les différentes sources de carbone testées, tandis que la valeur du contrôle négatif sans l'ajout de sucre était de 0,42 nm. Pour le glucose à une concentration de 1,5%, la valeur la plus élevée obtenue était de 0,42 nm, alors que celle du galactose était de 0,40 nm à la même concentration, et celle du lactose était de 0,38 nm (**figure 16**).

Il est important de noter que la concentration de 1,5% pour le glucose, 0,5% pour le galactose et 2% pour le lactose a donné les valeurs de DO les plus élevées.

Ces résultats indiquent également que, le galactose et le glucose ont le plus grand effet sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* après 24 heures d'incubation à 25°C.

Les résultats obtenus pour la même souche après 48 heures d'incubation variaient de 0,40 à 0,60 nm, tandis que la valeur du témoin est de 0,58 nm. La valeur la plus élevée observée pour le glucose était de 0,60 nm à une concentration de 0,5%, alors que pour le galactose, la valeur la plus élevée observée était de 0,58 nm à une concentration de 0,5%. La valeur la plus élevée observée pour le lactose était de 0,59 nm à une concentration de 2,5%. Le glucose a donné la plus grande valeur à 0,5% (0,60 nm) suivi par le lactose a une valeur de 0,59 nm a une concentration 2,5% **(figure 16)**

Il est intéressant de noter que, pour cette durée d'incubation, la concentration de 0,5% a montré les valeurs les plus élevées pour le galactose (0,58 nm) et le lactose (0,59 nm) pour la concentration 2,5%, tandis que pour le glucose (0,60 nm), la concentration de 0,5 % a donné la valeur la plus élevée. Cela indique que les différentes sources de carbone peuvent avoir des effets différents en fonction de la concentration utilisée.

Après 72 heures d'incubation, nous avons obtenus des valeurs de DO qui variaient de 0,58 à 1,03 nm, tandis que la valeur du témoin est de 0,44 nm. En comparant ces résultats, le glucose à 0,5% a montré la valeur la plus élevée de formation de biofilms (1,03 nm), suivi par le galactose à 0,5% (0,48 nm) et le lactose à 1% (0,76 nm). Cela suggère que le glucose est le sucre le plus efficace pour la formation du biofilm pour la souche *P. aeruginosa lamaab4-30* après 72 heures d'incubation à 25°C **(figure 16)**

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 testée.

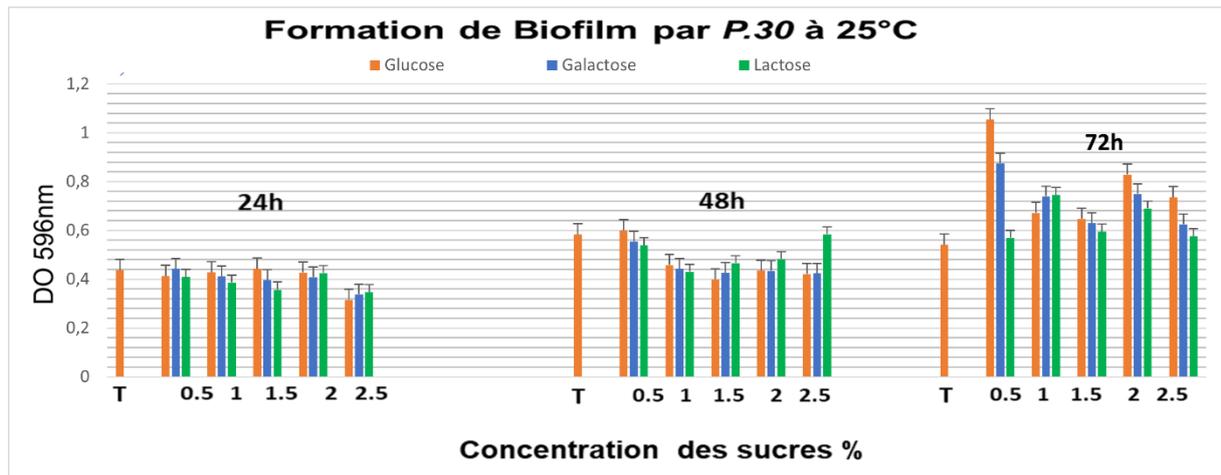


Figure 16:Quantification de la formation de biofilm (DO596 nm) par la souche *P. aeruginosa* lamaabe4-30 à 25°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d’incubation.

2.2 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-30 à 30°C d’incubation :

Pour cette souche lamaabe4-30, les résultats obtenus après 24 heures d’incubation à 30°C variaient de 0,32 à 0,74 nm pour les différentes sources de carbone testées, tandis que la valeur du contrôle négatif sans l’ajout de sucre était de 0,42 nm. Pour le glucose a une concentration de 0,5%, la valeur la plus élevée obtenue était de 0,38 nm, alors que celle du galactose était de 0,52 nm à la même concentration, et celle du lactose était de 0,74 nm (**figure 17**).

Il est important de noter que la concentration de 0,5% pour le glucose, 2,5% pour le galactose le lactose a donné les valeurs de DO les plus élevées.

Ces résultats indiquent également que, le galactose et le lactose ont le plus grand effet sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* après 24 heures d’incubation à 30°C.

Les résultats obtenus pour la même souche après 48 heures d’incubation variaient de 0,26 à 0,41 nm, tandis que la valeur du témoin est de 0,43 nm. La valeur la plus élevée observée pour le glucose était de 0,41 nm à une concentration de 0,5%, alors que pour le galactose, la valeur la plus élevée observée était de 0,39 nm à une concentration de 0,5%. La valeur la plus élevée observée pour le lactose était de 0,35 nm à une concentration de 2,5%. Le glucose a donné la plus grande valeur à 0,5% (0,41 nm) suivi par le galactose a une valeur de 0,39 nm a une concentration 0,5% (**figure 17**).

Il est intéressant de noter que, pour cette durée d’incubation, la concentration de 0,5% a montré les valeurs les plus élevées pour le glucose (0,41 nm) et le galactose (0,39 nm) pour la concentration

0,5%, tandis que pour le lactose (0,35 nm), la concentration de 2,5 % 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.

Après 72 heures d'incubation, nous avons obtenus des valeurs de DO qui variaient de 0,26 à 0,83 nm, tandis que la valeur du témoin est de 0,22 nm. En comparant ces résultats, le galactose à 0,5% a montré la valeur la plus élevée de formation de biofilms (0,83 nm), suivi par le glucose à 0,5% (0,79 nm) et le lactose à 0,5% (0,58 nm) à différentes concentrations. Cela suggère que le galactose est l'inducteur le plus efficace de formation de biofilms pour la souche lamaab4-30 après 72 heures d'incubation à 30°C (**figure 17**).

Les résultats obtenus après 72 heures d'incubation variaient de 0,26 à 0,83 nm. La concentration de 0,5% a montré les valeurs les plus élevées pour le galactose, indiquant une dépendance de la formation de biofilms à la concentration de la source de carbone utilisée (**figure 17**).

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.

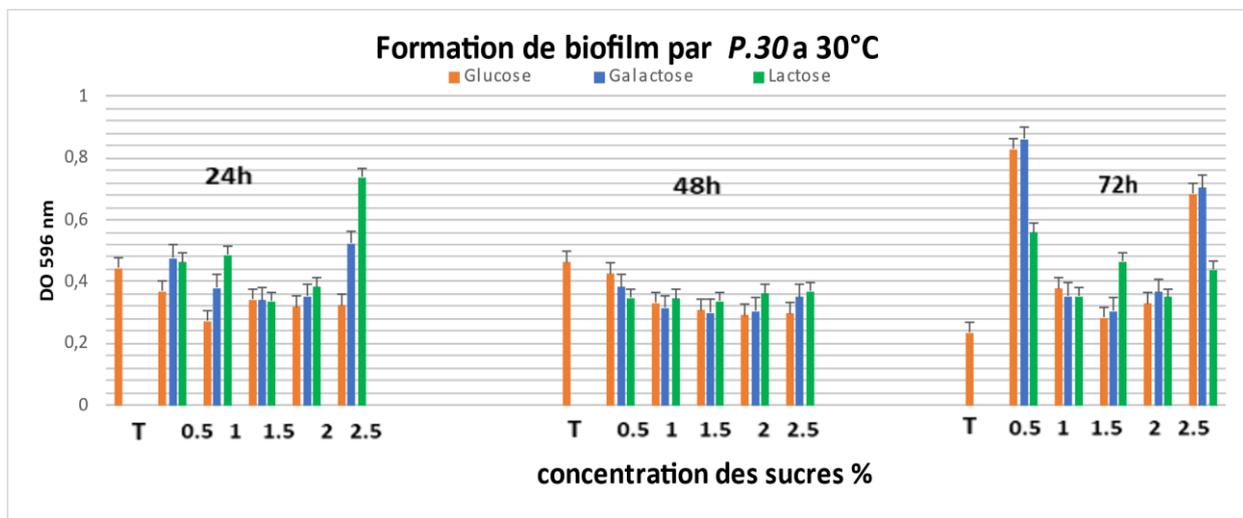


Figure 17: Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-30 à 30°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.

2.3 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-30 à 40°C d'incubation :

Pour cette souche lamaabe4-30, les résultats obtenus après 24 heures d'incubation à 40°C variaient de 0,25 à 0,43 nm pour les différentes sources de carbone testées, tandis que la valeur du contrôle négatif sans l'ajout de sucre était de 0,42 nm. Pour le glucose a une concentration de 1%, la valeur la plus élevée obtenue était de 0,43 nm, alors que celle du galactose était de 0,39 nm à la même concentration, et celle du lactose était de 0,39 nm (**figure 18**).

Il est important de noter que la concentration de 1% pour le glucose, 0,5% pour le galactose et 1% pour le lactose a donné les valeurs de DO les plus élevées.

Ces résultats indiquent également que, le glucose et le lactose ont le plus grand effet sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa* après 24 heures d'incubation à 40°C.

Les résultats obtenus pour la même souche après 48 heures d'incubation variaient de 0,38 à 0,92 nm, tandis que la valeur du témoin est de 0,42 nm. La valeur la plus élevée observée pour le glucose était de 0,92 nm à une concentration de 0,5%, alors que pour le galactose, la valeur la plus élevée observée était de 0,61 nm à une concentration de 1%. La valeur la plus élevée observée pour le lactose était de 0,53 nm à une concentration de 0,5%. Le glucose a donné la plus grande valeur à 0,5% (0,92 nm) suivi par le galactose a une valeur de 0,61 nm a une concentration 1% (**figure 18**).

Il est intéressant de noter que, pour cette durée d'incubation, la concentration de 0,5% a montré les valeurs les plus élevées pour le glucose (0,92 nm) et le galactose (0,61 nm) pour la concentration 1%, tandis que pour le lactose (0,53 nm), la concentration de 0,5 % 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.

Après 72 heures d'incubation, nous avons obtenus des valeurs de DO qui variaient de 0,43 à 1 nm, tandis que la valeur du témoin est de 0,38 nm. En comparant ces résultats, le galactose à 1,5% a montré la valeur la plus élevée de formation de biofilms (1 nm), suivi par le lactose à 2% (0,62 nm) et le glucose à 1% (0,60 nm) à différentes concentrations. Cela suggère que le galactose est l'inducteur le plus efficace de formation de biofilms pour la souche lamaab4-30 après 72 heures d'incubation à 40°C (**figure 18**).

Les résultats obtenus après 72 heures d'incubation variaient de 0,43 à 1 nm. La concentration de 1,5% a montré les valeurs les plus élevées pour le galactose, indiquant une dépendance de la formation de biofilms à la concentration de la source de carbone utilisée (**figure 18**).

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.

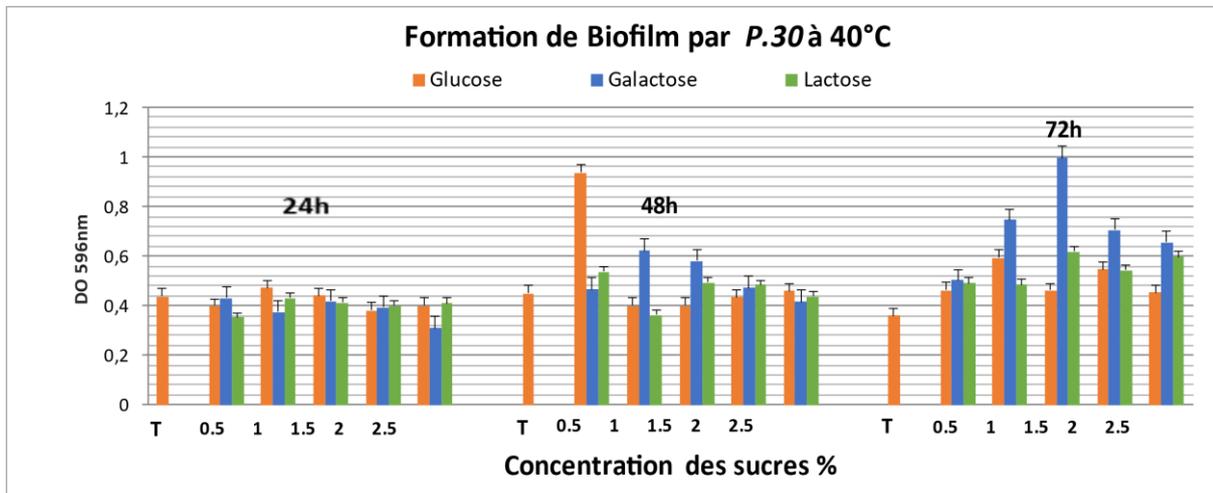


Figure 18:Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-30 à 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.

2.4 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-02 à 25°C d'incubation:

En ce qui concerne la seconde souche lamaabe4-02, les résultats obtenus après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 25°C indiquaient que le glucose à 0,5% a donné la plus grande valeur après 24h (0,44 nm) d'incubation. Après 48h (0,52 nm), le lactose à 2,5% a montré une grande valeur de DO et après 72h (1 nm), le glucose à 0,5% a montré une grande valeur de DO(**Figure 19**)

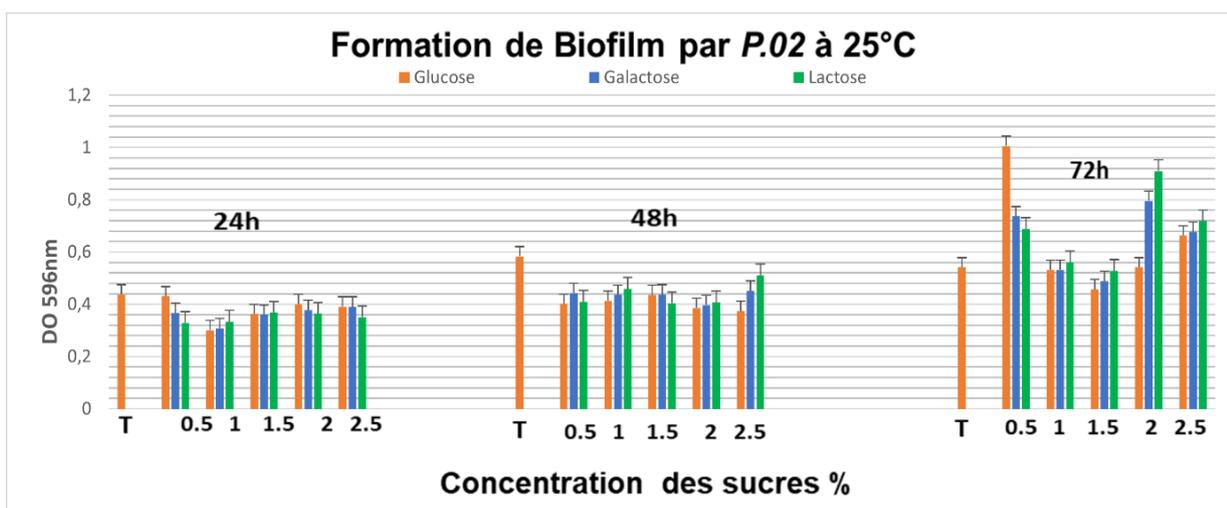


Figure 19:Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-02 à 25°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.

2.5 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-02 à 30°C d'incubation

En ce qui concerne la seconde souche lamaabe4-02, les résultats obtenus après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 30°C indiquaient que le glucose à 2,5% a donné la plus grande valeur après 24h (0,44 nm). Après 48h (1,64 nm), le glucose à 1% a montré une grande valeur de DO, puis après 72h (1,52 nm), le glucose à 0,5% a montré une grande valeur de DO (**Figure 20**).

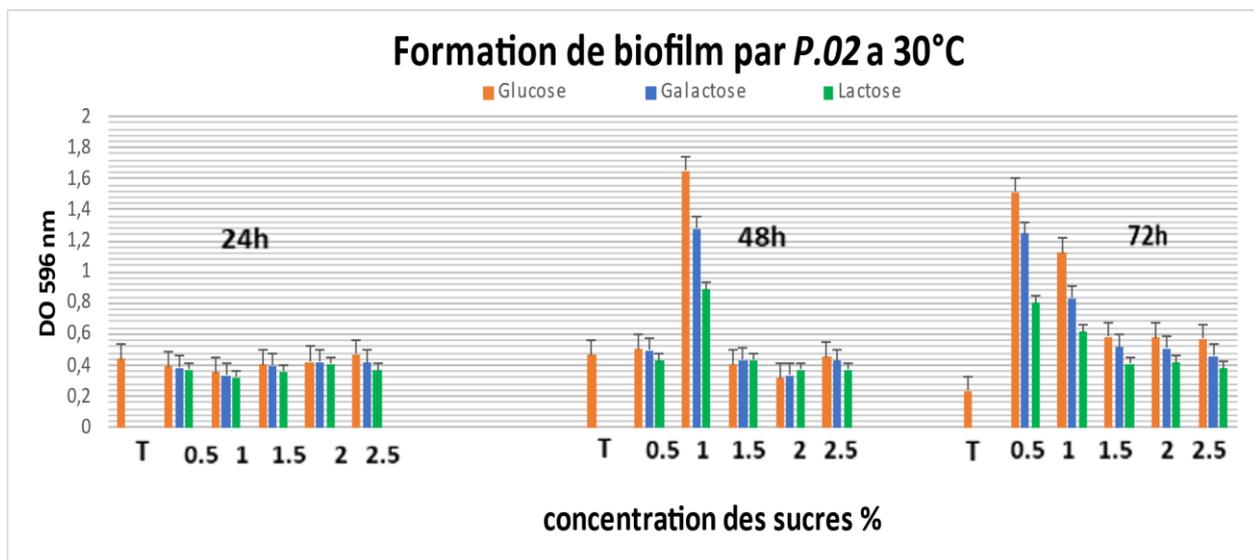


Figure 20:Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-02 à 30°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.

2.6 Effet des sucres sur la souche lamaabe4-02 à 40°C d'incubation :

En ce qui concerne la seconde souche lamaabe4-02, les résultats obtenus après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 40°C indiquaient que le glucose à 2,5% a donné la plus grande valeur après 24h (0,48 nm). Après 48h (0,64 nm), le glucose à 0,5% a montré une grande valeur de DO, puis après 72h (0,74 nm), le glucose à 1,5% a montré une grande valeur de DO (**figure 21**).

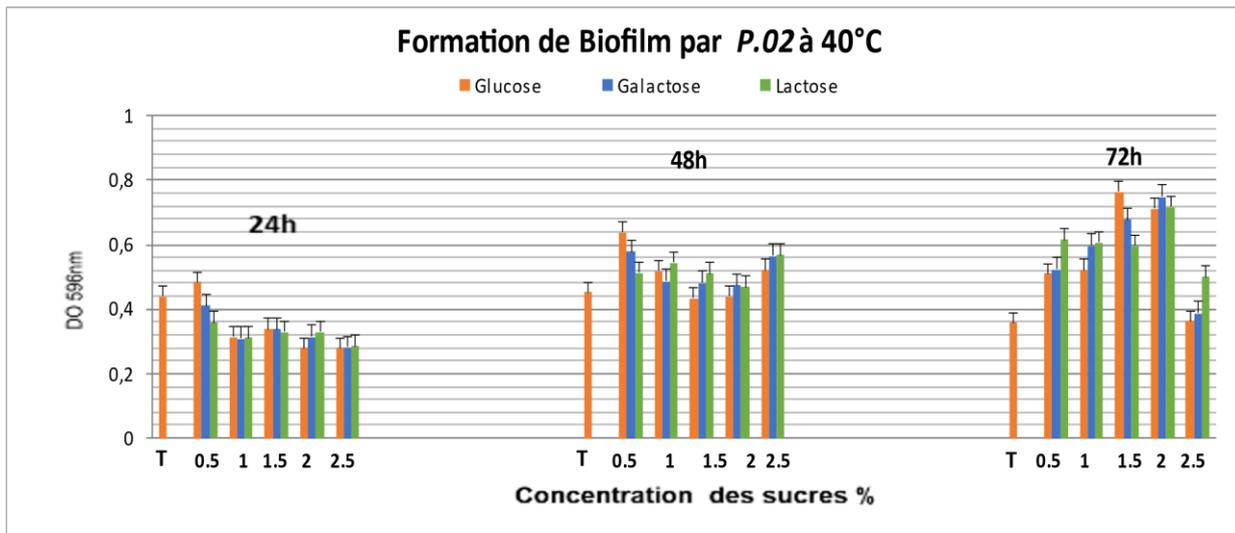


Figure 21: Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche lamaabe4-02 à 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.

2.7 Effet des sucres sur la souche de référence (ATCC) à 25°C d'incubation

Pour la dernière souche de référence (ATCC) appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus après 24, 48 et 48 heures d'incubation à 25°C indiquaient que le galactose à 1% a donné la plus grande valeur après 24h (0,64 nm). Après 48h (1,04 nm), le glucose à 1,5% a montré une grande valeur de DO et après 72h (0,56 nm), le lactose à 1,5% a montré une grande valeur de DO (**Figure 22**).

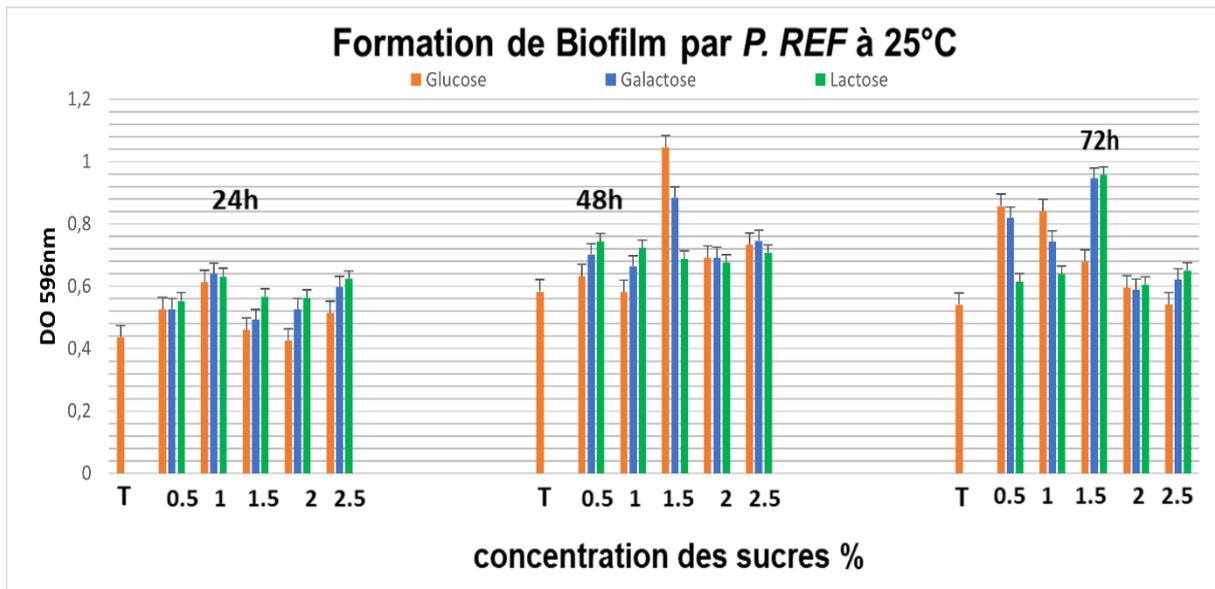


Figure 22: Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche de référence(ATCC)à 25°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d'incubation.

2.8 Effet des sucres sur la souche de référence (ATCC) à 30°C d'incubation :

Pour la dernière souche de référence (ATCC) appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus après 24, 48 et 48 heures d'incubation à 30°C indiquaient que le glucose à 2,5% a donné la plus grande valeur après 24h (0,48 nm). Après 48h (1,64 nm), le glucose à 1% a montré une grande valeur de DO et après 72h (1,52 nm), le glucose à 0,5% a montré une grande valeur de DO (**Figure 23**).

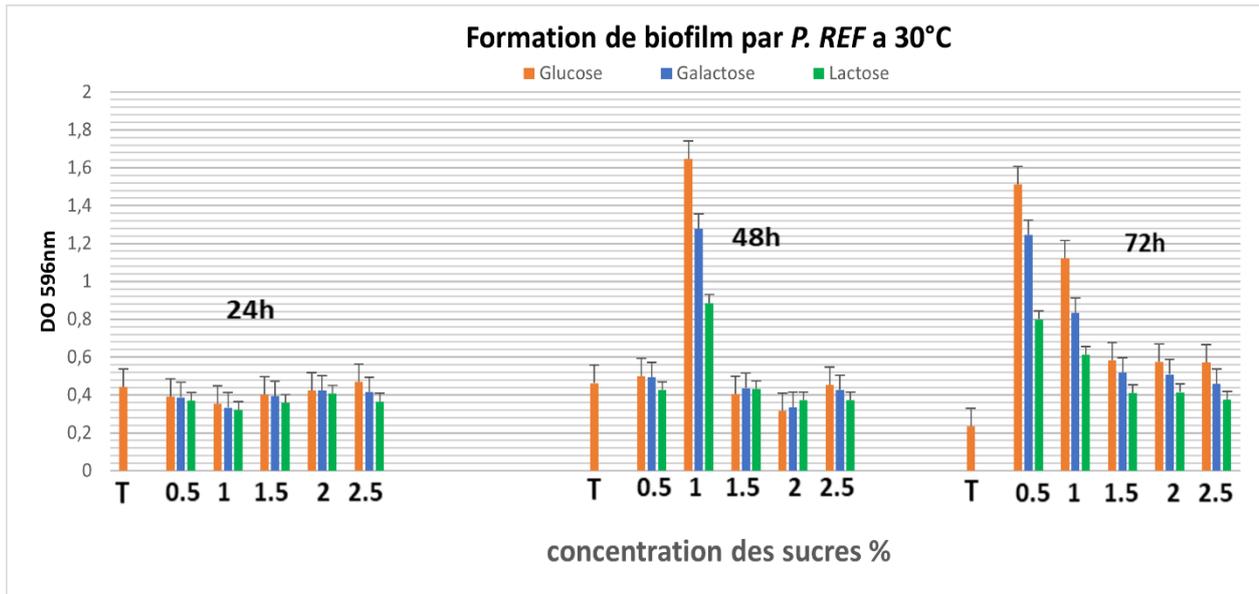


Figure 23:Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche de référence(ATCC)à 30°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d’incubation.

2.9 Effet des sucres sur la souche de référence (ATCC) à 40°C d’incubation :

Pour la dernière souche de référence (ATCC) appartenant à l’espèce *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus après 24, 48 et 48 heures d’incubation à 40°C indiquaient que le glucose à 1,5% a donné la plus grande valeur après 24h (0,74 nm). Après 48h (0,72 nm), le lactose à 2% a montré une grande valeur de DO et après 72h (0,92 nm), le glucose à 1,5% a montré une grande valeur de DO (**figure 24**).

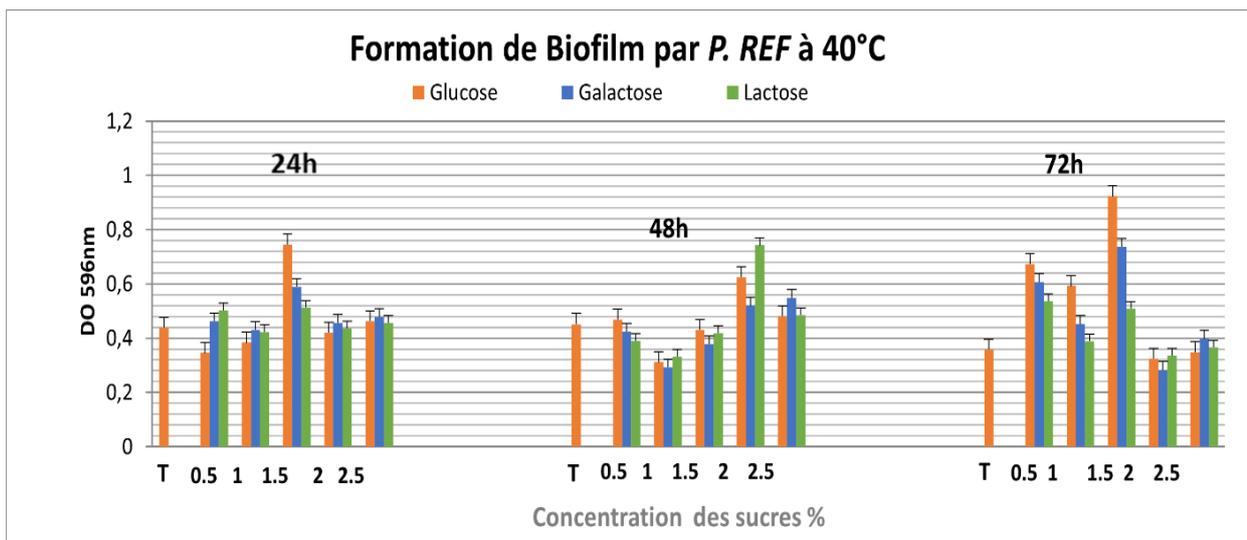


Figure 24:Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par la souche de référence (ATCC) à 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24, 48 et 72h d’incubation.

En analysant ces valeurs, on a observé une tendance générale d'augmentation de la formation de biofilms au fil du temps pour les trois sources de carbone et les différentes températures. Les valeurs les plus élevées sont généralement obtenues après 72 heures d'incubation.

Il est important de mentionner que pour chaque souche et chaque période d'incubation dans les différentes températures, les différentes sources de carbone, à des concentrations spécifiques, ont conduit à des valeurs plus élevées par rapport au témoin, à part la souche lamaabe4-30 à 30°C après 48h et lamaabe4-02 à 25°C après 48h.

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.

Lors de l'incubation pendant 24 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 48 heures d'incubation, des différences plus significatives sont observées. La souche lamaabe4-30 a montré les valeurs les plus élevées pour la formation de biofilms avec du glucose, tandis que la souche lamaabe4-02 a montré les valeurs les plus élevées avec du glucose toujours. La souche de référence(ATCC) a montré les valeurs les plus élevées avec du lactose. Cela suggère que les différentes souches peuvent avoir des préférences métaboliques différentes en fonction du type de sucre utilisé.

Après 72 heures d'incubation, des différences plus significatives sont observées. La souche lamaabe4-30 a montré les valeurs les plus élevées pour la formation de biofilms avec du galactose, tandis que la souche lamaabe4-02 a montré les valeurs les plus élevées avec du glucose. La souche de référence (ATCC) a montré les valeurs les plus élevées avec du glucose également. Cela suggère que les différentes souches peuvent avoir des préférences métaboliques différentes en fonction du type de sucre utilisé.

3 Evaluation de la formation de biofilm par *P. aeruginosa* sur les surfaces en PolyTétraFluoroEthylène (PTFE) ou le téflon

Cette étude vise à évaluer également la capacité de formation de biofilm sur des surfaces en PolyTétraFluoroEthylène (PTFE) ou téflon.

Les résultats obtenus indiquaient que les deux souches *P. aeruginosa* lamaabe4-02 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 ont montré une bonne capacité à former le biofilm à 25°C et non à 30°C ou 40°C alors que la souche *P. aeruginosa* lamaabe4-30 est plus capable de former le biofilm à 30°C mais elle a une faible capacité à le produire à 25°C ou 40°C, tandis que les témoins ont montré des résultats similaires avec les différentes températures (**Figure 25**).

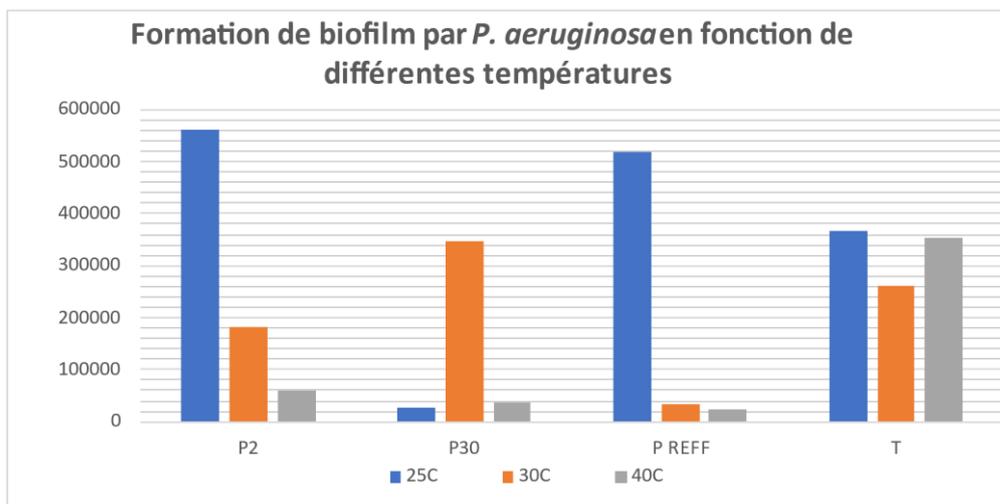


Figure 25: Quantification de la formation de biofilm (DO596nm) par les souches *P. aeruginosa* lamaabe4-02, *P. aeruginosa* lamaabe4-30 et la souche de référence *P. aeruginosa* (ATCC) à 25°C, 30°C et 40°C sous différentes concentrations en sucres après 24h d'incubation

4. Discussion

La formation de biofilms est un phénomène microbiologique majeur qui pose des défis significatifs dans l'industrie agroalimentaire et laitière. Un biofilm est une communauté structurée de micro-organismes adhérant à une surface, enveloppée dans une matrice polymérique auto-produite. Ces structures complexes offrent aux micro-organismes une protection accrue contre les agents antimicrobiens et les conditions environnementales hostiles, rendant leur éradication difficile (**Wirtanen et Salo, 2019**).

Dans l'industrie agroalimentaire et laitière, la formation de biofilms peut avoir des conséquences graves, notamment en termes de sécurité alimentaire, de qualité des produits, et de pertes économiques. Les biofilms peuvent se former sur diverses surfaces en contact avec les aliments, telles que les équipements de transformation, les cuves de stockage, les pipelines, et les surfaces des usines de production. Ces bactéries peuvent persister dans les environnements de production et contaminer les produits finis, entraînant des maladies d'origine alimentaire et des rappels de produits coûteux (**Bridier et al., 2015**).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste bien connue pour sa capacité à former des biofilms, particulièrement dans les environnements laitiers. Les biofilms posent des défis considérables en raison de leur résistance accrue aux agents de nettoyage et de désinfection. Les sucres tels que le glucose, le galactose et le lactose influencent la formation et la maturation des biofilms, et les conditions environnementales telles que la température et la durée d'incubation jouent également un rôle crucial. De ce fait, l'objectif principal de notre étude était d'étudier la capacité des souches de *P. aeruginosa* isolées des lignes de production de lait à former des biofilms en présence de glucose, galactose et lactose à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 2,5%). La formation de biofilm était réalisée pendant 24, 48 et 72 à 25, 30 et 40°C.

Le glucose est un monosaccharide facilement métabolisable par *P. aeruginosa*, stimulant la production de la matrice extracellulaire du biofilm. Nos résultats ont indiqué que les valeurs les plus élevées étaient obtenues avec l'addition du glucose suivi par le galactose quel que soit la température. Plusieurs études ont montré que la disponibilité du glucose dans l'environnement laitier favorise la formation de biofilms plus denses et structurés.

Nos résultats sont en accord avec avec les travaux de Kragh *et al.*, (2019), qui ont souligné que les méthodes d'inoculation et les conditions environnementales peuvent impacter les résultats des études sur les biofilms. Kumar *et al.*, (2020) ont montré que 30°C optimise les conditions métaboliques pour *P. aeruginosa*, augmentant ainsi la production de biofilm après 48h, surtout en présence de glucose. Alors que la formation de biofilm peut être réduite à 40°C qui est considéré comme un stress thermique, bien que certaines souches puissent s'adapter et former des biofilms épais après 72 heures. Cette capacité d'adaptation à des températures élevées a été mise en évidence par Lee et ses collaborateurs en 2023.

Le galactose, bien que métabolisable par *P. aeruginosa*, est moins efficace que le glucose pour la formation de biofilm. Sa métabolisation moins efficace peut influencer la densité et la structure des biofilms formés. À 25°C, La formation de biofilm est plus faible comparée au glucose,

avec une augmentation visible après 48 à 72 heures. Cela est en accord avec les travaux de Sahebghouei et son équipe (2021), qui ont montré que les conditions nutritionnelles influencent significativement la formation de biofilms dans les environnements de traitement laitier.

La formation de biofilm est meilleure à 30°C qu'à 25°C mais reste inférieure à celle observée avec le glucose, indiquant une meilleure adaptation métabolique de la bactérie à cette température. La formation de biofilm est souvent limitée à 40°C en présence de galactose en raison des contraintes métaboliques et thermiques. La capacité réduite de *P. aeruginosa* à utiliser le galactose sous stress thermique est également confirmée par Lee *et al.*, (2023).

Le lactose, un disaccharide composé de glucose et de galactose, nécessite la β -galactosidase pour être métabolisé par *P. aeruginosa*. Cette étape supplémentaire peut influencer la formation de biofilm.

La formation de biofilm est initialement lente à 25°C, avec une augmentation après 48 heures. Cette lenteur initiale est due au temps nécessaire pour l'induction et l'expression de la β -galactosidase, comme discuté par Zhu *et al.*, (2022). La formation de biofilm atteint des niveaux modérés à élevés après 48 à 72 heures à une température de 30°C, indiquant une adaptation métabolique efficace à cette température. Cela corrobore les résultats de Kumar *et al.*, (2020) sur l'efficacité métabolique à 30°C. Alors que la formation de biofilm est moins prononcée quand la température d'incubation était de 40°C, mais certaines souches peuvent montrer une adaptation après 72 heures. La capacité d'adaptation des souches de *P. aeruginosa* à des températures élevées, bien que variable, est confirmée par Lee *et al.* (2023).

Pseudomonas aeruginosa est également connue pour sa capacité à former des biofilms sur diverses surfaces, telle que l'acier inoxydable et le téflon, couramment utilisés dans l'industrie laitière pour ses propriétés antiadhésives. La formation de biofilms sur le téflon pose des défis pour l'hygiène et la sécurité des aliments en raison de la résistance accrue des biofilms aux agents de nettoyage et de désinfection. Le second objectif de notre étude était d'évaluer la capacité des souches de *P. aeruginosa* à former des biofilms sur le téflon à des températures de 25, 30 et 40°C.

À 25°C, *Pseudomonas aeruginosa* montre une capacité importante à former des biofilms sur le téflon. Malgré que cette température est souvent considérée comme suboptimale pour le métabolisme bactérien rapide mais permet néanmoins une croissance suffisante pour l'initiation de biofilms.

Nos résultats sont en désaccord avec ceux soulevés par Sahebghouei *et al.*, (2021) qui ont montré que la formation de biofilm à cette température sur le téflon est relativement lente, avec une densité de biofilm augmentant progressivement sur une période de 48 à 72 heures. La matrice extracellulaire formée à 25°C tend à être moins dense que celle formée à des températures plus élevées, ce qui pourrait être dû à une activité métabolique réduite.

La formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa* dans l'industrie laitière est fortement influencée par le type de sucre présent ainsi que par les conditions environnementales. Le glucose tend à favoriser une formation de biofilm plus robuste comparé au galactose et au lactose, particulièrement à des températures modérées (30°C). À des températures plus élevées (40°C), la formation de biofilm est généralement réduite, bien que certaines souches puissent s'adapter et maintenir une capacité de former du biofilm.

La capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à former des biofilms sur le téflon est modérée à 30°C. Cette température est proche de l'optimum pour le métabolisme de *P. aeruginosa*, favorisant une croissance modérée et une production modérée de matrice extracellulaire. Kumar *et al.*, (2020) ont observé que, à 30°C, la formation de biofilm sur le téflon atteint des niveaux significatifs dès 24 heures, avec une densité et une adhérence maximale à 48 heures. L'étude a démontré que les conditions métaboliques optimales à 30°C favorisent la production de polysaccharides et de protéines, éléments clés de la matrice du biofilm.

À 40°C, la formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa* sur le téflon est généralement réduite en raison du stress thermique. Cependant, certaines souches peuvent s'adapter et maintenir la formation de biofilms malgré la température élevée.

Lee et son équipe en 2023 ont rapporté que, bien que la formation initiale de biofilm soit inhibée à 40°C, certaines souches de *P. aeruginosa* peuvent développer des mécanismes d'adaptation permettant la formation de biofilms après 72 heures d'incubation. Ces biofilms tendent à être plus résistants et possèdent une matrice extracellulaire plus compacte, potentiellement en réponse au stress thermique.

La capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à former des biofilms sur le téflon varie significativement avec la température. À 25°C, la formation de biofilm est maximale et, tandis qu'à 30°C, elle est modérée et progressive en raison des conditions métaboliques optimales. À 40°C, bien que la formation initiale de biofilm soit réduite, certaines souches peuvent s'adapter et former des biofilms robustes après une période prolongée d'incubation. Ces observations soulignent

l'importance de contrôler la température dans les environnements de traitement laitier pour minimiser la formation de biofilms résistants sur des surfaces critiques comme le téflon.

Ces résultats sont essentiels pour développer des stratégies de contrôle efficaces dans l'industrie laitière, minimisant ainsi les risques de contamination et de persistance des biofilms pathogènes.

Conclusion

La présence de biofilms est très courante dans l'industrie laitière, notamment sur les surfaces en contact avec le lait, telles que les lignes de production, les sols, les murs, les tuyaux, les bidons de lait et les cuves de refroidissement. Il est souvent compliqué d'atteindre ces zones lors du nettoyage et de désinfection, ce qui crée des conditions idéales pour la formation et le développement de biofilms indésirables.

Pseudomonas aeruginosa sont l'une des espèces les plus importantes à l'origine des altérations des produits laitiers pasteurisés, agissant en produisant des enzymes lipolytiques et protéolytiques sécrétées dans le lait cru pendant le prétraitement et le stockage, même dans des environnements psychrotrophes. Beaucoup de ces enzymes peuvent survivre à la pasteurisation et même aux traitements à très hautes températures et peuvent ainsi réduire la qualité sensorielle et la durée de conservation des produits laitiers liquides transformés. *Pseudomonas aeruginosa* est capable à se fixer aux surfaces et à se développer en biofilm.

Notre étude a mis en lumière l'influence des conditions environnementales telles que la température et la source de carbone sur la formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons observé que des températures modérées et des concentrations variables de glucose, lactose et galactose favorisent la croissance des biofilms. De plus, notre recherche a démontré la capacité des souches étudiées à former des biofilms sur des surfaces en téflon. Ces résultats suggèrent la nécessité d'études approfondies incluant d'autres facteurs comme le film de conditionnement, l'effet des fluides et la présence d'autres espèces pour reproduire le microenvironnement réel des biofilms dans les lignes de production laitière.

Pour contrôler leur développement, il est crucial de mettre en place des stratégies de nettoyage et de désinfection appropriées utilisant des agents antimicrobiens. La gestion efficace des biofilms exige une approche intégrée qui combine des mesures préventives et des technologies de surveillance en temps réel afin de garantir la sécurité sanitaire et la qualité des produits laitiers.

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 environment. *Archives of microbiology*, vol. 196(7), pp. 453–472.
- **Alnnasouri, M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- **Alonso V.P.P. & Kabuki D.Y. (2019).** Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *International Journal of Dairy Technology*, 72(3), 472–478.
- **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.
- **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.
- **Antoniou A., Frank J. F. 2005.** Removal of *Pseudomonas putida* and associated extracellular polymeric substances from stainless steel by alkali cleaning. *J. Food Prot.* 68: 277–281.
- **Ariane B. (2017).** Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* et leurs traitements en 2017. Thèse pour obtenir un diplôme d'état de docteur : Pharmacie. Bretagne : Université de Rennes 1. p14, 34, 57.

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.
- **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.
- **Barir O. et Ghilani M. (2011).** Le Profil de résistance aux B-lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine Hospitalière. Mémoire de master : Biochimie et biologie moléculaire, Biskra: Université Mohamed khider-Biskra.
- **Barken K. B., Pamp S. J., Yang L., Gjermansen M., Bertrand J. J., Klausen M., Michael . G., Cynthia B.W, Joanne N E, and Tim T N. 2008.** Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10, 2331–2343. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x.
- **Batoni G., Maisetta G., Brancatisano F. L., Esin S., and Campa M. 2011 .** Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr. Med. Chem.* 18, 256–279. doi: 10.2174/092986711794088399.
- **Baur C., Krewinkel M., Kranz B., von Neubeck M., Wenning M., Scherer S., Stoeckel M., Hinrichs J., Stressler T. and Fischer L. 2015.** Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 49, 23–29. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.04.005.
- **Ben Hadj Khalifa A. et al (2011).** Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. 69(4).

- **Bentiba K., Bentiba L. (2017).** Evaluation de la capacité des souches de *Staphylococcus* spp à former des biofilms dans l'industrie laitière. Mémoire de master en analyses biochimique. Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, 72pp.
- **Blenkinsopp SA ., Costerton, JW.(1991) .** Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnology*; 9(1): 138-143.
- **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.
- **Boudouda R. (2015).** Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de master : Génétique Moléculaire. Constantine: Université des Frères Mentouri Constantine. p3-4-14-15.
- **Boussouf O., Yahia CH.(2020).** Epidémiologie et profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC). Mémoire de master : biologie moléculaire des microorganismes. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine. p5-6-7.
- **Bower CK, McGuire J, and Daeschel MA . 1996.** The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends Food Sci Technol* 7:152-157.
- **Branger A. (2007).** *Microbiochimie et alimentation* .France : Educagri Editions, 2007 .343 p.
- **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- **Brauge T. (2015).** Étude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de *Listeria monocytogenes*. 415p .Thèse de doctorat, école doctorale des Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement, Université Lille 1, 201

- **Bremer P. J., Fillery S., and McQuillan A. J. 2006.** Laboratoryscale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of differentcaustic and acidwashsteps on the removal of dairy biofilms. *Int.J.FoodMicrobiol.* 106,254–262 .doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.
- **Bremer, P. J., Fillery, S., &McQuillan, A. J. (2006).** Laboratoryscale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of differentcaustic and acidicdetergents on biofilm removalfromstainlesssteel surfaces. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 926-932.
- **Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: areview. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- **Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R.(2015).** Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167-178.
- **Brocklehurst, T. F., Zaman-Wong, C. M., & Lund, B. M. (1987).** A note on the microbiology of retail packs of preparedsaladvegetables. *Journal of AppliedMicrobiology*, vol. 63(5), pp. 409-415.

C

- **Camargo C. A, Joshua J. W , Douglas R. C, and Luís A. N. 2017.** FoodbornePathogens and Disease ,VOL. 14, NO. 11. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2274>.
- **Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F. (2014).** Biofilm formation in foodprocessingenvironmentsisstillpoorlyunderstood and controlled. *Food Engineering Reviews*, vol. 6, pp. 29-42.
- **Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F. (2014).** Biofilm formation in foodprocessingenvironmentsisstillpoorlyunderstood 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 ComprehensiveReview. *International journal of environmentalresearch and public health*, vol. 18(4), pp. 2014.

- **Chaker H. (2012)** . Regulation de l'adaptation de la bacterie *Pseudomonas aeruginosa* a son hote : implication des metabolites du tryptophane
- **Chakravarty S., and Gregory, G. 2015.** “The genus *Pseudomonas*,” in *Practical Handbook of Microbiology*, eds E. Goldman and L. H. Green (New York, NY: CRC Press), 321–344.
- **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.
- **Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
- **Chmielewski, R. A., & Frank, J. F. (2003).** Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
- **Christensen GD., Simpson WA., Younger JJ., Baddour LM., Barrett FF., Melton DM., Beachey EH. (1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 22(6), 996-1006.
- **Chung P. Y., and Khanum, R. 2017.** Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multi drug resistant bacteria. *J. Microbio. Immunol. Infecti.* 50, 405– 410. doi: 10.1016/j.jmii.2016.12.005.
- **Clutterbuck ,AL., Woods , E., Knottenbelt , D., Clegg , PD., Cochrane , CA., Percival , SL.(2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*;121(1-2): 1-17.
- **Colliot JP. (2022).** Chapitre 8, Lentilles de contact. Réfractions Du Diagnostic Aux Traitements Optiques et Chirurgicaux, 371-424.

- **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. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15, 137-140
- **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., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, vol. 284(5418), pp. 1318-1322.
- **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.

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.
- **Darghout S., Metheni A. (2016).** Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la région de Constantine. Mémoire

du master : Genetiquemoleculaire. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine. p15-18-19-22.

- **David C., and BaltyI., 2014.** INRS. La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie.
- **De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos.P, and Heyndriksx.M .2011.** Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigeratedrawmilk. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 460– 470. doi: 10.1128/AEM.00521-10
- **Delarras C. (2007).**Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc Lavoisier. p 476.
- **Dewangan A K, Patel A D, and Bhadania A G. 2015 .** Stainless steel for dairy and foodindustry: areview. *J. Mater. Sci. Eng;*4(5):1–4.
- **Diaby K. 2018 .** Les biofilms en industrie agroalimentaire : optimisation de leur élimination. Université de Lille 2. Faculté Ingénierie et Management de la Santé (ILIS).
- **Dogan B, and Boor KJ .2003.**Geneticdiversity and spoilagepotentialamong *Pseudomonas* spp. isolatedfromfluidmilkproducts and dairyprocessing plants. *Applied and EnvironmentalMicrobiology* 69: 130-138.
- **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 stronglyenhances in vitro biofilm formation by a subset ofhypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae*strains. *Applied and environmentalmicrobiology*, vol. 80(7), pp. 2176–2185.

E

- **Eyquem A., Alouf J., Montagnier L.(2005).** Traité de microbiologie. Clinique :quatrième mise à jour et compléments. p238.

F

- **Flemming ,H.,Wingender, J.(2001).**Relevance of microbialextracellularpolymeric substances (EPSs) part 2 : technicalaspects.*Watersci technol;*43:9-16.

- **Flemming H.C., and Wingender, J. 2010.** The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- **Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature reviewsmicrobiology*, vol. 8(9), pp. 623-633.
- **Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wingender, J. (2016).** The PerfectSlime: Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS). *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1–25.
- **Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997).** Biofilms in dairy manufacturing plant—description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1), 81-97.
- **Fratamico, P. M., Annous, B. A., & Guenther, N. W. (Eds.). (2009).** Biofilms in the food and beverage industries. Elsevier.
- **Fricker, M., Skanseng, B., Rudi, K., Stessl, B., and Ehling-Schulz, M. 2011.** Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach independent from geographical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 145(Suppl. 1), S24– S30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025.
- **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 bioprocess processing*, vol. 113, pp. 39-48.

G

- **Geng H. J., Yuan Y., Adayi A., Zhang X., Song X., Gong L., Zhang X, and Gao P. 2018.** Engineered chimeric peptides with antimicrobial and titanium-binding functions to inhibit biofilm formation on Ti implants. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 82, 141–154. doi: 10.1016/j.msec.2017.08.062.
- **Giaouris E.E., & Simões M. v. (2018).** Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. *Foodborne Diseases*, 309–377.

- **Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., & Nychas, G.-J. E. (2021).** Intra- and Inter-Species Interactions within Biofilms of Important Foodborne Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–25.
- **Goetz C., Dufour S., Aechambault M., Mloun F., Jacques M. (2016).** Importance et contrôle de biofilms formés par les Staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière. *Médecine vétérinaire*, 167, 7-8, 215-229.
- **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.
- **Gougeon A. (2017).** Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* : analyse de 181 épisodes bactériémiques documentés dans deux établissements hospitaliers du Nord de la France. Mémoire pour le diplôme d'étude spécialisé de biologie médicale. France : Université de Lille 2. p23-25-26-28-29-30-31-32.
- **Gougeon A. (2017).** Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* : analyse de 181 épisodes bactériémiques documentés dans deux établissements hospitaliers du Nord de la France. Mémoire pour le diplôme d'étude spécialisé de biologie médicale. France : Université de Lille 2. p23-25-26-28-29-30-31-32.
- **Green S K., Schroth M N., Cho J., Kominos S K., Vitanza-jack V B. (1974).** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28, 987-991.
- **Guilhen, C. (2017).** Caractérisations transcriptionnelle et phénotypique de bactéries dispersées de biofilm à *Klebsiella pneumoniae* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne [2017-2020])
- **Gupta S and Anand S. 2018.** Midwest Dairy Foods Research Center, Dairy and Food Science Department, South Dakota State University, Brookings, SD 57007, USA.

H

- **Habimana, O., Møretrø, T., Langsrud, S., Vestby, L. K., Nesse, L. L., & Heir, E. (2010).** Micro ecosystems from feed to meat: a stage for many actors. In *Methods in Biotechnology*, 74, 357-384.
- **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.
- **Hamilton, W. A. (1985).** Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* ; 39:195.
- **Hamley, I. W. 2017.** Small bioactive peptides for biomaterials design and therapeutics. *Chem. Rev.* 117, 14015–14041. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00522.
- **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.
- **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.
- **Hošťacká, A., Čižnár, I., & Štefkovičová, M. (2010).** Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia microbiologica*, vol. 55, pp. 75-78.

I

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

J

- **Jamal, M ., Ahmad ,W .,Andleeb, S .,Jalil, F .,Imran, M ., Nawaz, MA ., Hussain ,T .,Ali ,M .,Rafiq, M ., Kamil ,MA.(2018).** Bacterial biofilm and associatedinfections.*journal of the chinesemedical association* ;81(1) :7-11.
- **James, G. A., Boegli, L., Hancock, J., Bowersock, L., Parker, A., &Kinney, B. M. (2019).** Bacterialadhesion and biofilm formation on texturedbreast implant shellmaterials. *Aesthetic plastic surgery*, vol. 43, pp. 490-497.

K

- **Karimi, A., Karig, D., Kumar, A., &Ardekani, A. M. (2015).** Interplay of physicalmechanisms and biofilm processes: review of microfluidicmethods. *Lab on a Chip*, vol. 15(1), pp. 23-42
- **Katsikogianni, M., &Missirlis, Y. F. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterialadhesion to biomaterials and of techniques used in estimatingbacteria-material interactions. *EurCell Mater*, vol. 8(3), pp. 37-57.
- **Khelissa, S. O. (2017).** Characterization of physiologicalpropertiesassociatedwith biofilm-detachedcells and study of interactions betweenbacteria and materials: case of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Doctoral dissertation, Université des
- **Kragh, K. N., et al. (2019).** "The inoculation method could impact the outcome of microbiological biofilm studies." *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3), e02680-18.

- **Kumar CG and Anand SK.1998.** Significance of microbial biofilms in foodindustry: areview. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.
- **Kumar, S., et al. (2020).** "Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from milk and dairy products: Involvement of quorum sensing and antibiotic resistance." *International Journal of Dairy Technology*, 73(2), 265-273.

L

- **Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., and Delacroix-Buchet A. .2004.** Raw cowmilkbacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5644–5650. doi: 10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004
- **Lee, W. H., et al. (2023).** "Temperature-dependent biofilm formation and matrix production by *Pseudomonas aeruginosa* in dairy processing environments." *Journal of Dairy Science*, 106(2), 965-978.
- **Lejars, M., Margailan, A., and Bressy, C. 2012 .** Fouling release coatings:anontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chem. Rev.* 112, 4347–4390. doi: 10.1021/cr200350v.
- **Lembre, P., Lorentz, C., & Di Martino, P. (2012).** Exopolysaccharides of the biofilm matrix: acomplexbiophysical world. *The complex world of polysaccharides*, pp. 371-392.
- **Lianou, A., Koutsoumanis, K.P. (2017).** Assessment of cell surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* undervariousenvironmental conditions by usingmicrobialadhesion to hydrocarbonsmethod. *Journal of Food Protection*, vol. 80(9), pp. 1509-1514.
- **Liu, X., Yao, H., Zhao, X., & Ge, C. (2023).** Biofilm Formation and Control of FoodbornePathogenicBacteria. *Molecules*, vol. 28(6), pp. 2432.
- **Liu, Y., & Tay, J. H. (2001).** Metabolicresponse of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *Journal of appliedmicrobiology*, vol. 90(3), pp. 337–342.

M

- **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.
- **Mallet A., Guéguen M., Kauffmann F., Chesneau C., Sesboué A., and Desmasures N. 2012.** Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. Int. Dairy J. 27, 13–21. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.07.009.
- **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., Heylen K., Messens W., Coudijzer K., De Vos P., Dewettinck, K., Herman L., De Block J., and Heyndrickx M. 2009a .** Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of Pseudomonas lundensis and Pseudomonas fragpredominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. Environ. Microbiol. 11, 467–482. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.
- **Marchand S., Vandriesche G., Coorevits A., Coudijzer K., De Jonghe V., Dewettinck K., De Vos P., Devreese B., Heyndrickx M., and De Block J. 2009b .** Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk Pseudomonas species. Int. J. Food Microbiol. 133, 68–77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.027.
- **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.
- **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.

- **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
- **Mavrodi, O.V., McSpaddenGardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., 2001.** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.
- **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.
- **Mehdi Ch., et al. (2014).** Epidemiology and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a Moroccan pediatric hospital: therapeutic guidelines. (11), p283-290.
- **Memdouh S., Reddaj N. (2018).** Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* au CHU de Constantine.. Mémoire de master: biologie appliquée . Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine. p4-7-9-10-27-28.
- **Meradji S.(2017).** *P. aeruginosa* : facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Badjimbokhtar:annaba. p35.
- **Mérens A., Jault P., Bargues L., Cavallo JD., (2013).** Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. EMC - Maladies infectieuses .10, 1-18.
- **Mérens, A., Jault P., Bargues L., Cavallo J.-D. (2013).** Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Résumé. Elsevier Masson SAS.
- **Mezaache S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.
- **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.
- **Montil H.Avril., Daberna L.H. , Denis T F.(1992).** Bactériologie clinique 2ème édition.

- **Moradali M.F., Ghods S., and Rehm B.H.A.2017.** *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
- **Moreno-Castilla, C. (2004).** Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon*, vol. 42(1), pp. 83-94.
- **Munsch-Alatossava, P and Alatossava, T. 2006.** Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.* 161, 334–346. doi: 10.1016/j.micres.2005.12.004.
- **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.

N

- **Nir, S., and Reches, M. 2016.** Bio-inspired antifouling approaches: the quest towards non-toxic and non-biocidal materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 39, 48–55. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.012.
- **Nostro, A., Cellini, L., Di Giulio, M., D'Arrigo, M., Marino, A., Blanco, A. R., Favalaro, 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.

- **Ostrov, I., Harel, A., Bernstein, S., Steinberg, D., and Shemesh, M. 2016** .Development of a method to determine the effectiveness of cleaning agents in removal of biofilm derived spores in milking system. *Front. Microbiol.* 7:1498. doi: 10.3389/fmicb.2016.01498.

P

- **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).
- **Palleroni N. (1984)**. *Manual of Systematic Bacteriology*. USA. P141–171.
- **Palmer J., Flint S., and Brooks J. 2007**. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 577–588. doi: 10.1007/s10295-007-0234-4.
- **Paolozzi, L., & Liébart, J. C. (2015)**. *Microbiologie*. Dunod, France.
- **Patel, A., Prajapati, J. B., & Holst, O. (2013)**. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: identification, production and bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 10-24.
- **Patrick, Jean-Louis G., Michel S. (1989)**. *Bactériologie : les bactéries des infections humaines*. France : Médecine – sciences Flammarion.-(collection de la biologie à la clinique). p230
- **Perrin.(2015)** Structure et croissance bactérienne Relations hôtes - bactéries. Slide player.; <http://slideplayer.fr/slide/3194550/>
- **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.
- **Portier, E. (2014)**. Rôle du fer sur *Legionella pneumophila* et sur sa persistance dans les biofilms naturels. 253 p. Thèse de doctorat : Aspects moléculaire et cellulaires de la biologie : Pottiers : Université de Pottiers.
- **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).
- **Queck, S Y., Weitere , M., Moreno , AM., Rice, Sa., Kjelleberg, S .(2006) .**The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol* ;8(6) :1017- 1025.

R

- **Rasamiravaka T, Labtani Q., Duez. P., & El Jaziri M. (2015).** The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compound interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015.
- **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.
- **Rochex, A., Godon, J. J., Bernet, N., & Escudie, R. (2008).** Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water research*, vol. 42(20), pp. 4915–4922.
- **Roux A., Ghigo JM. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bull. Acad. Vét. France*, 159(3), 261-268.
- **Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020).** Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 571-586.

-

S

- **Sahebghouei, M., et al. (2021).** "Impact of nutrient conditions and surface properties on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in dairy processing environments." *Food Microbiology*, 93, 103607.
- **Sakala G. P and Reches M. 2018.** Peptide-based approaches to fight biofouling. *Adv. Mater. Interfaces* 5:1800073. doi: 10.1002/admi.201800073.
- **Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016).** Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *BiocatalAgricBiotechnol*, vol. 7, pp. 56–66.
- **Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016).** Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *BiocatalAgricBiotechnol*, vol. 7, pp. 56–66.
- **Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.d., Costerton J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*. 184: 1140-1154
- **Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003).** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*. 50: 15-27.
- **Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zeff L.A.H., Davies D.G., Gilbert P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*. 186: 7312-7326.
- **Sauer, K., Rickard, A.H., Davies, D.G. (2007).** *Biofilms and biocomplexity*, vol. 2, pp. 347–353.
- **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.
- **Shi X and Zhu X. 2009.** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 407–413. doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.054.
- **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.

- **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., Simões L.C and Vieira M.J. 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43:573–583.
- **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.
- **Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- **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.
- **Solbi S. (2013).** Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux ATB. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie: pharmacie. Rabat : Université Mohammed 5 –souissi- . p6-11-12-13.
- **Souley L., Moustafa F.S. (2002).** Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux ATB à l'hôpital du point G. Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. Université de Bamako. p95
- **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., and Ha S. 2013.** Bio film formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572–585. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001.
- **Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013).** Biofilm Formation in Food Industries: A Food Safety Concern. *Food Control*, 31(2), 572–585.
- **Stoodley P., Sauer K., Davies D. G and Costerton J. W. 2002.** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56:187–209.

- **Stover C K., Pham X Q., Erwin A L., Mizoguchi S D., Warrenner,P., Hickey,M J. et al. (2000)** Complete genomesequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunisticpathogen. *Nature* 406, 959-964.

T

- **Te Giffel, M. C., &Beumer, R. R. (1998).** Isolation, identification and characterization of *Bacillus cereus* in the dairyindustry. *Tijdschriftvoordiergeneeskunde*, vol. 123(21), pp. 628-632.
- **Thierry (1997).** Les infections microbiennes : Agents infectieux. France: Nathan. p26.
- **Tijani N.(2019).**Infections à *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie.Thèse de Doctorat .Université de Mohammed V –Rabat.
- **Tilahun, A., Haddis, S., Teshale, A., &Hadush, T. (2016).** Review on biofilm and microbialadhesion. *Int J MicrobiolRes*, vol. 7(3), pp. 63-73.
- **Tomlin, KL., Malott ,R., Ramage ,G., Storey, Dg., Sokol, Pa., Ceri ,H .(2005).** Quorum sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderiacenocepacia* biofilms. *Appl environ microbial*;71(9):5208-5218.
- **Traore A. (2019).** Sensibilité aux ATB des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de 2004 à 2009 au CHU de Point G.Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie .Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako. P9
- **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.
- **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.N., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofims bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian journal of VeterinaryRechearch*, 78 : 100- 116.

- **Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S. & Jacques, M. (2014)**. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J VetRes* 78, 110-116.
- **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 veterinaryresearch : Revue canadienne de recherche veterinaire*, vol. 78(2), pp. 110–116.
- **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 veterinaryresearch : 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 Schaik E. J., Giltner C. L., Audette G. F., Keizer D. W., Bautista D. L., Slupsky, C. M., Sykes B D and Irvin R T. 2005**. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J. Bacteriol.* 187, 1455–1464. doi: 10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005.
- **Veron M, (1983)**. Biologie de *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et maladies infectieuses*. 13(6), 352-356.
- **Verran, J and Whitehead, K. 2005**. Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. *Int. J. Artif. Organs* 28, 1138–1145. doi: 10.1177/039139880502801111.
- **Von Neubeck M., Baur C., Krewinkel M., Stoeckel M., Kranz B., Stressler T., Fisher L., Hinrichs J., Sherer S and Wenning M. 2015**. Biodiversity of

refrigeratedrawmilkmicrobiota and theirenzymaticspoilagepotential. *Int. J. Food Microbiol.* 211, 57–65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001.

W

- **Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R and Boor, K. J. 2000.** Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2085–2095. doi: 10.1128/AEM.66.5.2085-2095.2000.
- **Wirtanen G and Salo S. 2003.** Disinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. *Reviews In Environmental Science And Bio-Technology* 2, 293–306.
- **Wirtanen, G., & Salo, S. (2019).** Biofilm formation in the food industry: detection and prevention. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1590-1600.

X

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

Y

- **Yadav, M. K. (2017).** Role of biofilms in environment pollution and control. *Microbial Biotechnology : Applications in Agriculture and Environment*, vol. 1, pp. 377-398.
- **Yuan L., Hansen M.F., Røder H.L., Wang N., Burmølle M., He G. (2020).** Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2277–2293.
- **Yuan L., Hansen M.F., Røder H.L., Wang N., Burmølle M., He G. (2020).** Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2277–2293.

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., et al. (2022).** "Effects of different sugars on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* in a dairy environment." *Food Control*, 133, 108572.
- **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.

Annexes

1. BHI

Constituants

Infusion de cervelle de porc	7,5 g/l
Infusion de coeur de porc	10 g/l
Peptone	10 g/l
Glucose	2 g/l
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g/l
Phosphate disodique	2,5 g/l
pH	7,4 ±

Préparation :

Mettre en suspension 08grammes dans 1 litre d'eau purifiéeet Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

2. CRISTAL VIOLET

Le cristal violet est un colorant de la famille des triphénylméthanes de formule brute $C_{25}H_{30}ClN_3$

3. GELOSE PCA

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau purifiée

Peptone de caséine 5,00

Extrait de levure 2,50

Glucose 1,00

Agar 15,00

Préparation :

Mettre en suspension 23 grammes dans 1 litre d'eau purifiéeet Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

4. Milieux macCONKEY

Composition :

Pour 1000 mL de milieu:

- **peptone pancréatique de gélatine : 17 g**
- **peptone pancréatique de caséine : 1,5 g**
- **peptone peptique de viande : 1,5 g**
- **lactose : 10 g**
- **chlorure de sodium : 5 g**
- **sels biliaires : 1,5 g**
- **rouge neutre : 30 mg**
- **violet de gentiane : 1 mg**
- **agar : 13,5 g.**

Préparation :

Il suffit de les dissoudre à chaud dans le volume correspondant d'eau distillée et de stériliser à l'autoclave (15 min à 121°C). Le mélange est ensuite réparti dans des contenants stériles

يستكشف هذا البحث تأثير الظروف البيئية على تكوين الأغشية الحيوية بواسطة سلالات *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من خطوط إنتاج الحليب الخام المبستر. تُعتبر الأغشية الحيوية تراكيب ميكروبية معقدة تتشكل عندما تلتصق عدة كائنات دقيقة بسطح معين وتغطي نفسها بمصفوفة واقية. يمكن أن تواجه صناعة الأغذية مشكلات نتيجة لتكوين الأغشية الحيوية، والتي تسمح بتلوث المنتجات بواسطة العوامل الممرضة وتلفها. تركز هذه الدراسة على تأثير مصدر الكربون، نوع السطح، درجة الحرارة ووقت الاتصال على تكوين الأغشية الحيوية. كان الهدف هو تقييم قدرة ثلاث سلالات من *Pseudomonas aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية في وجود سكريات مختلفة (اللاكتوز، الجلوكوز والجالاكتوز)، أنواع مختلفة من السطح ودرجات حرارة مختلفة. شملت المنهجية حضن السلالات مع تركيزات مختلفة من السكريات (0.5%، 1%، 1.5%، 2% و 2.5%) وتقييم تكوين الأغشية الحيوية في فترات زمنية محددة. تُظهر النتائج أن للسكريات تأثيرات متغيرة على تكوين الأغشية الحيوية، اعتمادًا على السلالة ومدة الحضنة. عزز الجلوكوز تكوينًا أوليًا عاليًا للأغشية الحيوية (1.64 نانومتر). ومع ذلك، بعد 72 ساعة من الحضنة، تبين أن الجلوكوز هو المحفز الأكثر أهمية لتكوين الأغشية الحيوية لجميع السلالات. في الختام، تؤكد هذه الدراسة على أهمية أخذ مصادر الكربون ودرجة الحرارة في الاعتبار في صناعة الألبان، حيث تؤثر على تكوين الأغشية الحيوية. تعتبر هذه النتائج أساسية لتطوير استراتيجيات تحكم فعالة في صناعة الألبان، مما يقلل من مخاطر التلوث واستمرارية الأغشية الحيوية الممرضة.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas aeruginosa*، الأغشية الحيوية، الظروف البيئية، مصدر الكربون، صناعة الألبان.

Summary

This thesis explores the effect of environmental conditions on biofilm formation by strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from raw pasteurized milk production lines. Biofilms are complex microbial structures that form when multiple microorganisms adhere to a surface and cover themselves with a protective matrix. The food industry can face challenges due to biofilm formation, which allows for the contamination and spoilage of products by pathogens. This study focuses on the influence of carbon source, surface type, temperature, and contact time on biofilm formation. The objective was to evaluate the ability of three strains of *Pseudomonas aeruginosa* to form biofilms in the presence of different sugars (lactose, glucose, and galactose), different surface types, and different temperatures. The methodology included incubating the strains with different concentrations of sugars (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, and 2.5%) and evaluating biofilm formation at specific time intervals. The results show that sugars have varying effects on biofilm formation, depending on the strain and incubation duration. Glucose promoted high initial biofilm formation (1.64 nm). However, after 72 hours of incubation, glucose was found to be the most significant inducer of biofilms for all strains. In conclusion, this study highlights the importance of considering carbon sources and temperature in the dairy industry, as they influence biofilm formation. These results are essential for developing effective control strategies in the dairy industry, thus minimizing the risks of contamination and persistence of pathogenic biofilms.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, environmental conditions, carbon source, dairy industry.

Résumé

Ce mémoire explore l'effet des conditions environnementales sur la formation de biofilms par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des lignes de production de lait cru pasteurisé. Les biofilms sont des structures microbiennes complexes qui se forment lorsque plusieurs microorganismes s'accrochent à une surface et se recouvrent d'une matrice protectrice. L'industrie alimentaire peut être confrontée à des problèmes en raison de la formation de biofilms, qui permettent la contamination des produits par des agents pathogènes et leur altération. Cette étude se focalise sur l'influence de la source de carbone, le type de surface, la température et le temps de contact sur la formation de biofilms. L'objectif était d'évaluer la capacité de trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* à former des biofilms en présence de différents sucres (lactose, glucose et galactose), différents types de surface et différentes températures. La méthodologie comprenait l'incubation des souches avec différentes concentrations de sucres (0,5%, 1%, 1,5%, 2% et 2,5%) 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 glucose a favorisé une formation initiale élevée de biofilms (1,64 nm). Toutefois, après 72 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 et la température dans l'industrie laitière, car elles influencent la formation de biofilms. Ces résultats sont essentiels pour développer des stratégies de contrôle efficaces dans l'industrie laitière, minimisant ainsi les risques de contamination et de persistance des biofilms pathogènes.

Mot clés : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, conditions environnementales, source de carbone, l'industrie laitière.