

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et Sciences de la Terre et de l'Univers
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au
Biomédical et l'Environnement « LAMAABE »



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du
Diplôme de MASTER en Microbiologie fondamentale**

Filière : Sciences Biologiques

Présenté par :

AMGHAR Amira

RAMDANE Feriel

Thème

***Evaluation de la capacité de formation de biofilm par des
souches bactériennes isolées de la poudre de lait infantile***

Soutenu le 30/06/2025 devant le jury composé de :

Présidente :	Mme Bellifa Samia	MCA	Université de Tlemcen
Promotrice :	Mme Cherif-Anntar Asmâa	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice :	Mme Bendimerad Nahida	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2024-2025

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions Dieu ALLAH, le tout puissant, qui nous a protégé, aidé et qui nous a donné la force, la patience et le courage pour accomplir ce modeste travail.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude envers notre promotrice, Mme Cherif Anntar Asma, Maitre de Conférences classe A à l'Université de Tlemcen, pour avoir généreusement accepté de nous guider et de nous soutenir tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Sans oublier Mr Benamar Ibrahim, Maitre de Conférences classe B à l'Université de Laghouat,, pour son soutien, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Aux membres du jury,

Présidente du jury Mme Bendimerad Nahida, Maitre de Conférences classe B à l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider ce jury ; et Mme Bellifa Samia, Maitre de Conférences classe A à l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail. Puisse ce travail témoigner de notre reconnaissance et de l'estime que nous portons à votre personne exemplaire.

Dédicace

Je tiens à dédier ce travail,

*A mes chers parents **ma mère et mon père**. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir. 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. Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur, Vous êtes ma source de vie, d'amour et d'affection.*

*A mes chers petits frères **Ahmed et Youcef** pour leur présence, leurs encouragements que dieu leur donne beaucoup de bonheur, santé et réussite dans la vie.*

*À ma chère cousine **Fadia**, dont la présence a toujours été un réconfort et une source de joie dans ma vie. Ta bienveillance est inestimable.*

*A mes chères amies, **Fadia, Khawla et Asma** pour leur amitié sincère, leurs conseils et leurs encouragements. Merci pour les moments de détente et de partage qui m'ont aidé à garder le cap. Votre amitié m'est précieuse et je vous en suis profondément reconnaissante.*

*Sans oublier mon binôme **Feriel** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

Et enfin, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cet ouvrage, je vous adresse ma plus profonde gratitude. MERCI

AmgharAmira

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère **Rahma**, le symbole de tendresse.*

*A mon père **Mustapha** Tu as toujours su guider mes pas, ce que je suis aujourd'hui est le fruit de ton éducation, je ne te remercierais jamais assez pour tous tes sacrifices, tes conseils et tes encouragements*

Aucune dédicace ne saurait exprimer ma grande admiration, ma considération et ma sincère affection pour vous mes chers parents.

*A mon frère **Yacine** et sa fiancée **Nawel** pour leur m'avoir toujours encouragé.*

*A mes sœur **Chahinez** et **Nourhane** qui ont toujours été présents dans les moments les plus difficiles*

*A mes chères **oncles** et **tantes**, qui ont toujours là pour moi.*

*A mes chère **cousins** et **cousines***

*A mes chères amies **Ikram** et **Bouchra**. Votre présence, votre soutien et vos encouragements ont été une source de force pour moi. Merci d'être toujours là, votre amitié est un vrai trésor.*

*Et bien sûr à mon binôme de travail **Amira**, une personne exceptionnelle avec qui j'ai partagé chaque étape de ce projet. Travailler à tes côtés a été un réel plaisir, et je suis fière de ce que nous avons accompli ensemble.*

Ramdane Ferial

Liste des abréviations

CAC : Codex Alimentarius Commission.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

UNICEF: United Nations International Children's Emergency Fund.

PLI : Poudre de Lait Infantile.

PLIs : Poudres de lait infantiles.

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

CNIEL : Centre national interprofessionnel de l'économie laitière.

Les laits AR : Les laits Anti-Régurgitations.

AGE : Acides gras essentiels.

UE : Union européenne.

CRI : Credit Rating Information.

EPS : Substances polymériques extracellulaires.

QS: Quorum sensing.

AHL: Homosérine lactone acylée.

AIP : Autoinducteur peptidique.

AL-2 : Autoinducteur-2.

MB: Mégaoctets (Megabytes).

JPG: Joint Photographic Experts Group.

API: Analytical Profile Index.

RCA: Rouge Congo Agar.

PIA : Polysaccharide Intracellulaire Adhésine.

TCP : Plaque de Culture de Tissus.

Fe³⁺ : Ion ferrique.

Rpm : Tours par minute.

Liste des figures

Figure 1 : Les quatre étapes de l'adaptation de lait de vache à l'alimentation du nourrisson.....	05
Figure 2 : A. <i>Staphylococcus aureus</i> sous microscope optique (x100) / B. Observation par microscope électronique à balayage et à transmission de <i>Staphylococcus aureus</i> (Grossissement x10000).....	21
Figure 3 : Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman / B. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> (flèches blanches) sur gélose Baird-Parker / C. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieux TSA / D. Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose au sang.....	22
Figure 4 : La β -hémolyse causée par <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figure 5 : Observation du biofilm par microscope électronique.....	26
Figure 6 : Etapes de formation de biofilm.....	28
Figure 7 : Les lait infantiles utilisés pour l'isolement des souches bactériennes.....	33
Figure 8 : Les dilution de poudre de lait infantile.....	34
Figure 9 : Gélose nutritive inclinée stérile.....	37
Figure 10 : les étapes de la conservation.....	38
Figure 11 : Détection et lecture de biofilm par méthode PVC.....	41
Figure 12 : Détection et lecture de biofilm sur surface de verre.....	43
Figure 13 : <i>S. aureus</i> sur milieu Baird-Parker.....	44
Figure 14 : <i>S. aureus</i> sur Chapman.....	45
Figure 15 : Coloration de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> sous microscope optique (Gx100)..	46
Figure 16 : Test catalase positive de <i>S. aureus</i>	46
Figure 17 : Test coagulase positive de <i>S. aureus</i>	46
Figure 18 : Test oxydase de <i>S. aureus</i>	47
Figure 19 : <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose au sang.....	47

Figure 20 : *S. aureus* sur RCA.....48

Figure 21 : La densité optique de biofilm des souches de l'échantillon 1 en fonction du temps..49

Figure 22 : La densité optique de biofilm des souches de l'échantillon 2 en fonction du temps..50

Figure 23 : La densité optique de biofilm des souches de l'échantillon 3 en fonction du temps..51

Figure 24 : La densité optique de biofilm des souches des échantillons 1, 2 et 3 en fonction du temps.....52

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition microbiologique de lait en poudre.....	15
Tableau 2 : Les principaux groupes bactériens de lait.....	16
Tableau 3 : Classification de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Tableau 4 : Caractères biochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Tableau 05 : Résultats de dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> pour les échantillons étudiés (les résultats en ufc/ml).....	45

Résumé

Staphylococcus aureus est l'une des bactéries les plus dangereuses pouvant provoquer des intoxications alimentaires. C'est une bactérie pathogène capable de produire des entérotoxines dans les aliments. Le lait est un milieu de croissance idéal pour *Staphylococcus aureus*, dont la consommation peut poser problème, notamment chez les nourrissons. L'objectif de cette recherche était de détecter la présence de *Staphylococcus aureus* dans le lait en poudre pour nourrissons et étudier la capacité de cette bactérie pour former le biofilm. Trois échantillons du marché ont été utilisés pour l'isolement et l'identification de *Staphylococcus aureus*, d'une part. D'autre part, évaluer la capacité des souches identifiées à former le biofilm. L'étude a obtenu des résultats d'énumération spécifiques pour chacune. Pour l'échantillon 01, le nombre de bactéries isolées est de $37,27 \times 10^1$ ufc/ml, tandis que l'échantillon 02 montre une concentration estimée de *S. aureus* à $40,90 \times 10^1$. Quant à l'échantillon 03, nous avons relevé une valeur dépassant les deux précédents échantillons, atteignant ainsi $224,54 \times 10^1$. Les trois échantillons présentent une évolution similaire de la formation de biofilm sur microplaque, avec une augmentation progressive des densités optiques sur 24 heures. Toutefois, à long terme, les capacités diffèrent selon les souches. La souche 2 de l'échantillon 1 (DO = 0,318), la souche 2 de l'échantillon 3 (0,315) et surtout la souche 3 de l'échantillon 3 (0,325) montrent une capacité nettement supérieure à former un biofilm mature. Ces souches ont une capacité de formation de biofilm plus supérieur sur les surfaces de verre. En effet, toutes les souches ont été positives au test du rouge Congo.

Mot clés : Poudre de lait infantile, *Staphylococcus aureus*, biofilm.

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most dangerous bacteria that can cause food poisoning. It is a pathogenic bacterium capable of producing enterotoxins in food. Milk is an ideal growth medium for *Staphylococcus aureus*, whose consumption can pose a problem, especially in infants. The objective of this research was to detect the presence of *Staphylococcus aureus* in infant powdered milk and to study the ability of this bacterium to form biofilm. Three market samples were used for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus*, on one hand. On the other hand, evaluate the ability of the identified strains to form biofilm. The study obtained specific enumeration results for each sample. For sample 01, the number of isolated bacteria was 37.27×10^1 CFU/ml, while sample 02 showed an estimated concentration of *S. aureus* at 40.90×10^1 CFU/ml. As for sample 03, it recorded a value exceeding the previous two samples, reaching 224.54×10^1 CFU/ml. The results showed that the three samples exhibit a similar trend in biofilm formation on microplates, with a gradual increase in optical density over 24 hours. However, in the long term, the capacities vary depending on the strains. Strain 2 from Sample 1 (OD = 0.318), Strain 2 from Sample 3 (0.315), and especially Strain 3 from Sample 3 (0.325) show a significantly higher ability to form mature biofilms. These strains demonstrate a greater capacity for biofilm formation on glass surfaces. Indeed, all the strains tested positive for the Congo red test, indicating a potential to produce a biofilm on microplates and glass.

Key words: Infant powdered milk, *Staphylococcus aureus*, and biofilm.

ملخص

يُعتبر المكور العنقودي الذهبي من بين أخطر البكتيريا التي يمكن أن تسبب التسممات الغذائية. فهو بكتيريا ممرضة قادرة على إنتاج السموم المعوية في الأغذية. ويُعدّ الحليب وسطاً مثالياً لنمو هذه البكتيريا، مما يجعل استهلاكه يُشكل خطراً، خاصةً عند الرُضع. كان الهدف من هذا البحث هو الكشف عن وجود المكور العنقودي الذهبي في حليب الرُضع المجفف، ودراسة قدرة هذه البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي (البايوفيلم). تم استخدام ثلاث عينات من السوق لعزل وتحديد المكور العنقودي الذهبي من جهة، ومن جهة أخرى تقييم قدرة السلالات المُحددة على تكوين الغشاء الحيوي. وقد أظهرت النتائج أن هذه السلالات تمتلك القدرة على تكوين البايوفيلم، حيث أن جميع السلالات كانت إيجابية في اختبار الكونغو الأحمر، مما يدل على قدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي على الألواح الدقيقة وعلى الزجاج

الكلمات المفتاحية: حليب الرضع المجفف، المكورات العنقودية الذهبية، الأغذية الحيوية

Table de matière :

Introduction générale.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique.....	3
Chapitre I : lait infantile.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Historique.....	3
I.3. Substitut de lait maternel.....	6
I.4. Classification de lait infantile.....	6
I.4.1. Laits standards.....	6
I.4.1.1. Poudre de lait infantile 1er âge.....	6
I.4.1.2. Poudre de lait infantile 2eme âge.....	7
I.4.1.3. Poudre de lait infantile 3eme âge.....	7
I.4.2 Lait et préparations pour indications spécifiques.....	7
I.4.3. Laits et préparations pour indications thérapeutiques.....	8
I.5. Fabrication des laits infantiles.....	8
I.5.1. Les prétraitements du lait de vache.....	8
I.5.1.1. L'écémage.....	8
I.5.1.2. La coagulation suivie de l'égouttage.....	8
I.5.2. Le mélange	9
I.5.3. L'homogénéisation.....	9
I.5.4. La concentration.....	9
I.5.5. L'atomisation.....	9
I.5.6. Le séchage à lit fluidisé.....	9
I.5.7. Emballage et stockage.....	9
I.6. Composition de lait infantiles.....	10
I.6.1. Protéines.....	10

I.6.1.1. Caséines.....	10
I.6.1.2. Protéines solubles.....	10
I.6.2. Glucides.....	10
I.6.2.1. Lactose.....	11
I.6.2.2. Autres sucres complexe.....	11
I.6.3. Lipides.....	11
I.6.3.1. Une source essentielle d'énergie.....	11
I.6.3.2. Une source majeure d'acides gras essentiels (AGE)	11
I.6.4. Vitamines.....	11
I.6.5. Minéraux.....	12
I.6.6. Autres élément.....	12
I.7. Propriétés physicochimiques du lait infantile en poudre.....	12
I.7.1. Taille.....	12
I.7.2. Densité.....	12
I.7.3. Fluidité.....	13
I.7.4. Mouillabilité.....	13
I.7.5. Solubilité.....	13
I.7.6. Viscosité.....	13
I.7.7. Stabilité à la chaleur.....	13
I.7.8. Propriété moussante et émulsifiant.....	14
I.8. Propriété microbiologique de lait infantile.....	14
I.8.1. Bactéries d'altérations.....	14
I.8.2. Bactéries pathogènes.....	14
I.8.3. Bactérie de contamination.....	15
I.8.4. Source de contamination.....	15
I.8.4.1. La qualité de la matière primaire.....	15

I.8.4.2. Contamination à partir de l'équipement.....	16
I.9. Caractères de bonne qualité de lait en poudre infantile.....	16
I.10. Marché des laits infantiles.....	17
I.10.1. Production et consommation, estimations en chiffres.....	18
Chapitre II : Généralité sur <i>Staphylococcus aureus</i>.....	19
II.1. Définition.....	19
II.2. Historique.....	19
II.3. Classification.....	19
II.4. Caractères biologiques.....	20
II.4.1. Caractères Morphologiques.....	20
II.4.2. Caractères cultureux.....	21
II.4.3. Caractères biochimiques.....	22
II.4.4. Caractères génétiques.....	23
Chapitre III : biofilm.....	24
III.1. Définition.....	24
III.2. Historique.....	24
III.3. Caractéristiques de biofilm.....	25
III.4. Structure et composition du biofilm.....	26
III.5. Les étapes de la formation du biofilm	26
III.5.1. L'attachement initial ou réversible.....	26
III.5.2. L'attachement irréversible.....	27
III.5.3. La formation de micro colonies.....	27
III.5.4. La maturation ou le développement.....	27
III.5.5. La dissémination ou le détachement de la matrice.....	27
III.6. Facteurs favorisant la formation du biofilm.....	28
III.6.1. Caractéristiques de la surface.....	28

III.6.1.1. Rugosité de la surface.....	28
III.6.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface.....	28
III.6.1.3. Présence de films protéiques sur la surface.....	28
III.6.2. Caractéristiques de milieu.....	28
III.6.2.1. Température.....	29
III.6.2.2. pH.....	29
III.6.2.3. Sources de carbone disponibles.....	29
III.6.2.4. Concentrations en nutriments.....	29
III.6.2.5. Concentrations en certains cations.....	29
III.6.2.6. Hydrodynamique du fluide.....	29
III.6.3. Propriétés des cellules.....	29
III.7. Le quorum sensing.....	30
III.8. Problèmes liés aux biofilms en industrie agroalimentaire.....	31
III.9. Facteurs favorisant la dispersion du biofilm.....	31
III.10. Les biofilms à Staphylocoques.....	32
Partie II : Matériel et Méthodes.....	33
Partie 01 : Isolement et identification de <i>staphylococcus aureus</i>.....	33
I.1. L'échantillonnage.....	33
I.2. Isolement et identification de <i>S. aureus</i>	33
I.2.1. Identification microbiologique.....	33
I.2.1.1. Recherche et dénombrement des <i>staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird-Parker.....	34
I.2.1.2. Recherche et dénombrement des <i>staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman.....	35
I.2.2. Identification biochimique.....	35
I.2.2.1. Coloration de Gram.....	35
I.2.2.2. Test de Catalase.....	35
I.2.2.3. Test de coagulase.....	36

I.2.2.4. Test oxydase.....	36
I.2.2.5. Test de l'hémolyse.....	36
I.2.3. Conservation.....	37
I.2.3.1. Conservation à courte terme sur gélose inclinée.....	37
I.2.3.2. Conservation à long terme avec glycérol.....	37
Partie 02 : Evaluation de la capacité de formation de biofilm in vitro.....	39
II.1. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)	39
II.2. Evaluation de la formation de biofilm par la méthode de microplaques de titration à 96 puits en PVC (polychlorure de vinyle)	39
II.2.1. Préparation de la suspension bactérienne.....	39
II.2.2. Protocole de formation de biofilm.....	39
II.3. Evaluation de la formation de biofilm sur surface en verre.....	41
II.3.1. Préparation les lames en verre.....	41
III.3.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	42
III.3.3. Protocole de formation de biofilm.....	42
Partie III: Résultat et discussion.....	44
Partie 01 : Isolement et identification de <i>staphylococcus aureus</i>.....	44
I.1. Identification microbiologique.....	44
I.1.1. Sur milieu Baird-Parker.....	44
I.1.2. Sur milieu Chapman.....	45
I.2. Identification biochimique.....	45
I.2.1. Coloration de Gram.....	45
I.2.2. Test catalase.....	46
I.2.3. Test coagulase.....	46
I.2.4. Test d'oxydase.....	46
I.2.5. Test de l'hémolyse.....	47

Partie 02 : Evaluation de la capacité de formation de biofilm in vitro.....	48
II.1. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)	48
II.2. Méthode de microplaques de titration à 96 puits en PVC (polychlorure de vinyle)	48
II.3. Evaluation la formation de biofilm sur les surface en verre.....	50
Discussion.....	53
Conclusion.....	57
Référence.....	58
Annexes.....	73

Introduction Générale

L'allaitement maternel est crucial pour les nourrissons car il leur fournit tous les éléments nutritionnels nécessaires pour une santé optimale au cours de leurs premiers mois de vie (**Ahern et al., 2019**). Le lait maternel ne se limite pas à être une simple combinaison de nutriments, il renferme des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines, des cellules immunitaires, entre autres, et présente de nombreuses propriétés biologiques. En raison de ces caractéristiques, il est irremplaçable (**Turck, 2005**).

Toutefois, il peut arriver que le lait maternel ne soit pas en quantité suffisante ou ne soit pas disponible. Dans de telles situations, il est parfois nécessaire de se tourner vers la poudre de lait infantile. Celle-ci est conçue pour reproduire au mieux la composition nutritionnelle du lait maternel (**Ahern et al., 2019 ; Green et Shurley, 2016**).

Cependant, il est important de noter que l'augmentation de la production de poudres de lait peut entraîner des risques pour la sécurité sanitaire (**McHugh et al., 2017**). Les poudres de lait pour nourrissons, tout comme autres produits alimentaires, peuvent contenir des microorganismes qui peuvent être préjudiciables pour la santé (**Costa et al., 2020 ; Chitrakar et al., 2019 ; Wu et al., 2018 ; Sadiq et al., 2016 ; Chap et al., 2009 ; Iversen et Forsythe, 2004**). De ce fait, les poudres de lait pour nourrissons sont considérées comme des aliments à haut risque, surtout après reconstitution, car elles peuvent renfermer des bactéries pathogènes (**Yang et al., 2017 ; Kent et al., 2015 ; Haughton et al., 2010 ; Forsythe, 2005**). Il est important de souligner que les nourrissons sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes en raison de leur système immunitaire encore immature (**Vidic et al., 2020 ; Costa et al., 2020 ; Cho et al., 2019 ; Cortese et al., 2016 ; Hilliard et al., 2003**).

Le lait pour nourrissons peut contenir différents types de bactéries, dont *Staphylococcus aureus*. C'est une bactérie nuisible qui peut entraîner diverses maladies chez les nourrissons si le lait contaminé est consommé (**le Loire, 2003**). *Staphylococcus aureus* a la capacité de générer un biofilm, perçu comme une couche biologique se développant sur les surfaces, ce qui favorise sa survie et sa propagation (**Otto, 2008**).

L'objectif de la présente étude est d'une part l'isolement et l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* à partir de la poudre de lait infantile de trois marques de lait (lait de 01 âge) commercialisées en Algérie, d'autre part étudier la capacité de ces souches à former le biofilm par une approche qualitative via la méthode du Rouge Congo et une approche quantitative par la méthode du cristal violet sur le verre et les microplaques de titration a 96 puits en PVC. La structure du présent manuscrit est la suivante :

Dans un premier temps, une synthèse bibliographique présentent des généralités sur le lait infantile, *Staphylococcus aureus* et biofilm. Ainsi, la partie expérimentale est consacrée en deuxième lieu pour présenter les techniques appliquées. La troisième partie constitue les résultats obtenus et leur discussion. Une conclusion est présentée à la fin pour conclure le travail.

Partie I :

Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Le lait infantile

Chapitre I : Généralités sur le lait infantile

Quand un enfant naît, la première nourriture idéale et naturelle est le lait maternel. C'est propre, à la température parfaite et répond aux besoins nutritionnels du bébé. Cependant, il arrive que l'allaitement ne soit pas une option, que ce soit par choix ou par impossibilité, ce qui pousse les fabricants à créer des formules de lait pour nourrissons à base de lait d'animaux (**Agatha, 2021**).

I.1. Définition

Les laits infantiles sont des produits alimentaires spécialement conçus pour les enfants, de la naissance jusqu'à l'âge de douze mois ou plus. Ils peuvent être utilisés dès la naissance, que ce soit comme seule source d'alimentation ou en complément de l'allaitement maternel (**Rajf, 2021**). Ces préparations sont en concurrence avec le lait maternel et sont destinées à une catégorie de consommateurs particulièrement vulnérables. En raison de ces caractéristiques, ces produits sont soumis à des réglementations internes et internationales visant à prévenir toute pratique nuisible à l'allaitement maternel et à garantir leur qualité nutritionnelle (**Dénèm et al., 2018**).

I.2. Historique

Depuis longtemps, les mères qui ne pouvaient pas allaiter leurs nouveau-nés les confiaient à des nourrices à domicile pour les familles aisées ou les envoyaient chez des nourrices à la campagne pour les classes sociales moins favorisées. Moins fréquemment, elles utilisaient des laits artificiels préparés par elles-mêmes, souvent à base de lait de vache non stérile, ce qui entraînait la mort de nombreux bébés (**Andrew, 2003**). Grâce aux progrès des traitements thermiques tels que la pasteurisation et à l'apparition du biberon équipé d'une tétine en caoutchouc, ainsi qu'à l'augmentation du nombre de femmes travaillant en dehors du foyer et à l'évolution des mentalités, au cours du 19^{ème} siècle, l'utilisation préférentielle de ces laits artificiels à base de lait animal, de farine de céréales et de sucre s'est progressivement généralisée, même s'ils étaient encore mal formulés, entraînant des risques pour la santé (**Fildes, 1986**).

Les problèmes gastro-intestinaux, les déshydratations aiguës et les intoxications sont des risques associés à l'alimentation des nourrissons (**Mary et al., 1994**). Le lait maternel de substitution a été inventé par le professeur de chimie Justus Von Liebig pour ses deux petits-enfants qui ne pouvaient pas être allaités. En 1865, après avoir comparé la composition chimique

du lait humain et du lait de vache (**figure 01**), le premier lait artificiel pour nourrissons a été développé en mélangeant de la farine de blé, de l'extrait de malt et du bicarbonate de potasse, à diluer dans de l'eau et du lait de vache écrémé. Henri Nestlé a suivi cette approche en créant une préparation lactée similaire en 1866, qu'il a commercialisée avec plus de succès en 1867 que son prédécesseur (**Berthold, 2010**). Justus Von Liebig a décrit son produit comme une "nourriture parfaite pour les nourrissons" malgré le manque de connaissances sur sa valeur nutritive à l'époque (**Fomon, 1987**).

Par la suite, Otto Heubner et Max Rubner ont contribué à une meilleure compréhension des besoins énergétiques des nourrissons en développant la première méthode d'alimentation calorimétrique (**Cone, 1976**). Au début du 19^{ème} siècle, l'absence d'assainissement était répandue et les biberons mal lavés constituaient ainsi la principale cause de décès chez les nourrissons au cours de leur première année de vie (**Stevens et al., 2009**).

A partir de 1970, on assiste au développement d'une industrie des préparations pour nourrissons et les préparations commerciales étaient utilisées plus fréquemment. La majorité des nourrissons ont commencé à recevoir de manière régulière des préparations à base de lactosérum au cours des six premiers mois de vie ou du lait de vache jusqu'à un an (**Martinez et Dodd, 1983**). En 1980, la première norme du *Codex Alimentarius* pour les préparations pour nourrissons a été publiée (*Codex Alimentarius Commission « CAC »*, **1981**).

Au cours de cette période, l'utilisation de préparations pour nourrissons a continué à augmenter (**Martinez et Dodd, 1983**). À partir des années 1980, bien que les taux de consommation de préparations pour nourrissons soient restés élevés, on a observé une augmentation des taux d'allaitement (**Fomon, 1987**). Au fil du temps, des effets néfastes liés aux préparations pour nourrissons ont commencé à être constatés sur la santé, tels que l'hypersensibilité, l'obésité et le diabète (**Stevens et al., 2009**).

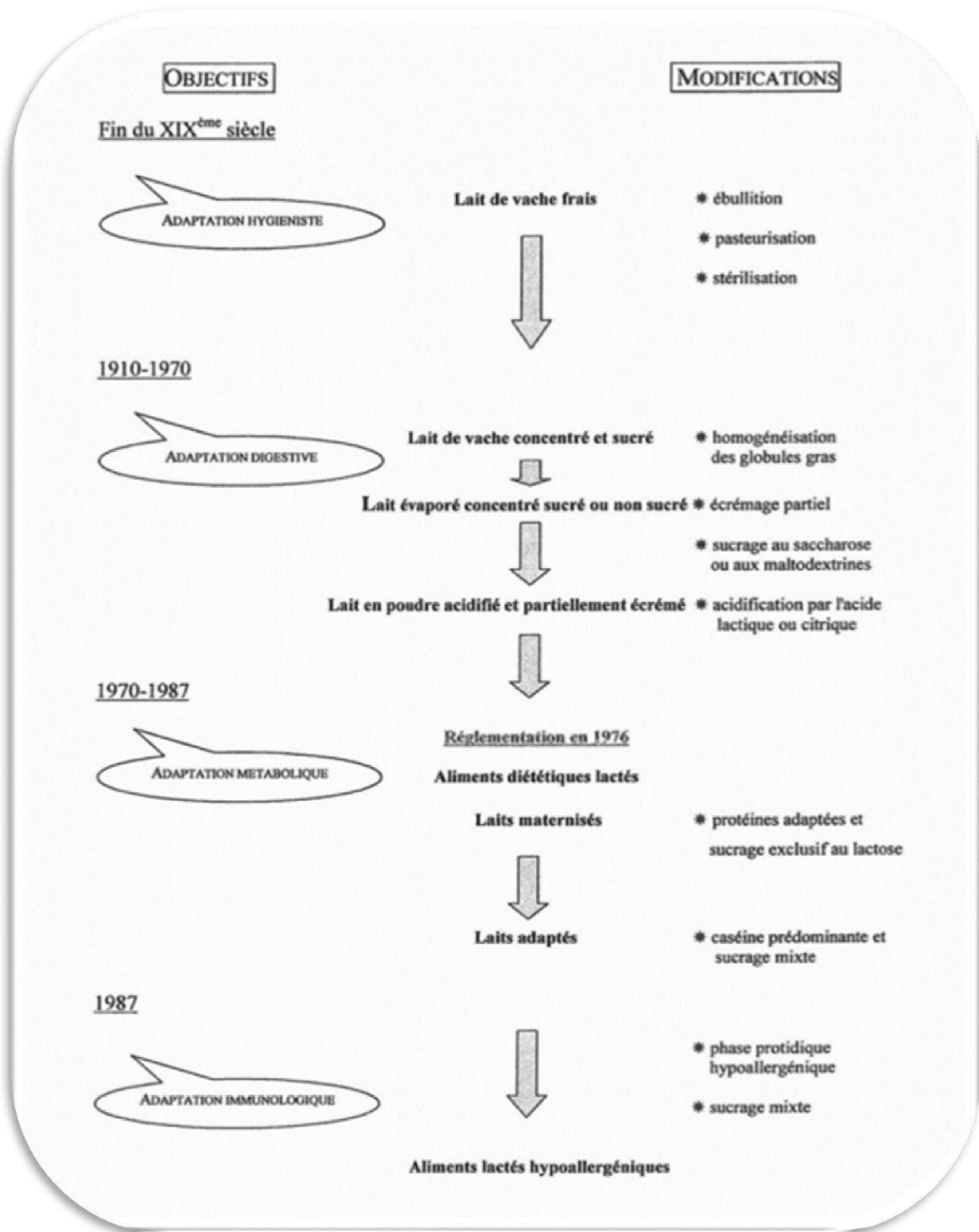


Figure 01 : Les quatre étapes de l'adaptation de lait de vache à l'alimentation du nourrisson (Simard, 2001).

I.3. Substitut de lait maternel

En raison des avancées dans le domaine de la santé publique et de l'importance cruciale de l'allaitement maternel et du lait maternel pour le développement humain et la santé tout au long de la vie, il est parfois nécessaire de recourir à des substituts au lait maternel (**Organisation Mondiale de la santé « OMS », 2003**). Ainsi, les parents et les soignants peuvent se tourner vers des alternatives au lait maternel dans des situations où ce dernier n'est pas disponible, nécessite une supplémentation en raison de problèmes de santé ou de déséquilibres hormonaux, ou lorsque la mère n'est pas en mesure d'allaiter (**Palmquist et al., 2019 ; OMS, 2003**).

L'OMS et l'UNICEF (United Nations International Children's Emergency Fund) recommandent différentes alternatives, comme le recours à l'allaitement par une autre femme en bonne santé, l'utilisation d'une banque de lait maternel, ou le recours à des substituts du lait maternel tels que les préparations pour nourrissons.

Si les deux premières options ne sont pas possibles, il est alors nécessaire d'avoir recours aux préparations pour nourrissons. Ces produits sont formulés pour reproduire au mieux la composition nutritionnelle du lait maternel et sont considérés comme des substituts efficaces (**Ahern et al., 2019 ; Green et Shurley, 2016 ; OMS, 2003**).

I.4. Classification de lait infantile

Le lait pour bébé est classé en trois catégories : standard, pour des besoins spécifiques et à visée thérapeutique. Pour chaque catégorie, les laits sont regroupés en fonction de l'âge de l'enfant (**Allaoui et al., 2015 ; Proudly, 2009**) :

I.4.1. Laits standards : Ces laits sont adaptés à tous les nourrissons et jeunes enfants en bonne santé, et sont similaires aux laits infantiles classiques. La plupart des nourrissons utilisent ces types de laits. Ils se divisent en trois sous-catégories :

I.4.1.1. Poudre de lait infantile 1^{er} âge : Les préparations pour nourrissons du premier âge (1^{er} âge) sont spécialement conçues pour les bébés de la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois. Pendant cette période, il est recommandé que l'alimentation du nourrisson soit exclusivement basée sur le lait maternel. Cela est dû au fait que les reins du nourrisson ne sont pas capables de gérer de grandes quantités de protéines et d'électrolytes, et que son système enzymatique n'est pas encore développé pour digérer de grandes quantités d'amidon (**CAC, 2007**).

I.4.1.2. Poudre de lait infantile 2eme âge : La Poudre de lait infantile du deuxième âge, également connue sous le nom de préparation de suite, est élaborée pour les bébés de six à douze mois. Durant cette phase, les nourrissons entament une période de transition alimentaire avec la diversification, qui consiste en l'introduction progressive d'aliments autres que le lait. Les préparations de suite, conçues pour répondre aux besoins nutritionnels des nourrissons de 6 à 12 mois, visent à combler d'éventuelles lacunes nutritionnelles résultant de la diversification alimentaire, notamment en acides gras indispensables et en fer, tout en évitant les excès de protéines (**Beylot, 2009**).

I.4.1.3. Poudre de lait infantile 3eme âge : Après une année, les nourrissons reçoivent des laits de croissance, aussi connus sous le nom de PLI. A l'âge de 12 mois, leurs systèmes digestif, rénal et neurologique sont suffisamment matures pour pouvoir digérer une alimentation similaire à celle des adultes. Durant cette période, les enfants sont en pleine croissance, ce qui signifie qu'ils ont encore des besoins importants en protéines, calcium, fer et acides gras essentiels. Cependant, il est fréquent que lors de la diversification alimentaire à cet âge, les enfants reçoivent trop de protéines, un déséquilibre lipidique avec des graisses animales en excès et peu d'acides gras essentiels, ainsi qu'un apport limité voire insuffisant en calcium et en fer. Ainsi, le remplacement de certains aliments par du lait de croissance au petit-déjeuner et au goûter présente de nombreux avantages pour la santé des enfants (**Beylot, 2009**).

I.4.2 Lait et préparations pour indications spécifiques : Les produits cités présentent des spécificités dans leur composition nutritionnelle, comme des épaississants, des pré- ou probiotiques. Ces éléments sont élaborés pour traiter certaines maladies et pour améliorer des symptômes parfois associés à des problèmes digestifs mineurs chez les nourrissons en bonne santé (**Labarth, 2013**).

Les laits hypoallergéniques, les laits acidifiés, les laits à prédominance de caséines, et d'autres types de laits sont inclus dans cette catégorie. Le médecin décidera de la nécessité d'utiliser ces produits après avoir examiné les besoins spécifiques du nourrisson lors de la consultation médicale. Ces laits peuvent être plus coûteux et ne fournissent pas toujours les mêmes bénéfices nutritionnels que les laits standards (**OMS, 2009**).

Il est essentiel de contrôler régulièrement s'il est nécessaire de continuer à prescrire des laits spécifiques, notamment lors du passage au lait de suite. Après l'âge de six mois et avec l'introduction d'aliments variés, la majorité des bébés n'ont plus nécessité de laits spécifiques (**Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail«ANSES», 2016**).

I.4.3. Laits et préparations pour indications thérapeutiques : Ces articles sont conçus pour les bébés qui ont été diagnostiqués avec une pathologie (**Allaouia *et al.*, 2015**).

I.5. Fabrication des laits infantiles

La production de lait infantile dans la réalité nécessite l'utilisation d'une variété d'éléments, certains étant dérivés du lait tandis que d'autres ne le sont pas. Parmi les composants lactiques, on peut citer le lait de vache, la crème et le lactosérum déminéralisé. En ce qui concerne les composants non lactiques, on peut citer les matières grasses végétales, les sels minéraux, les vitamines et différents types de glucides tels que le lactose, le saccharose et la maltodextrine (**Pubert, 2013**).

I.5.1. Les prétraitements du lait de vache : Au début du processus, le lait de vache est collecté chez l'agriculteur et soumis à des analyses pour vérifier l'absence d'antibiotiques et le taux de matières grasses. Ensuite, il est entreposé dans des cuves à laiterie où il fait l'objet de nouveaux contrôles. Après cela, le lait est pasteurisé en étant chauffé à 72°C pendant 15 secondes, puis refroidi, afin d'éliminer les micro-organismes nocifs pour la santé humaine (**Centre national interprofessionnel de l'économie laitière « CNIEL », 2021**).

Par la suite, différentes étapes peuvent être suivies :

I.5.1.1. L'écémage : le lait est centrifugé pour séparer la crème riche en matières grasses du lait écrémé (0% de matières grasses). Ensuite, de la crème peut être ajoutée pour obtenir du lait demi-écémé (1,5 à 1,8% de matières grasses par litre) ou du lait entier (3,5% de matières grasses par litre). Ce processus permet de standardiser la teneur en matières grasses du lait, qui peut varier en fonction de la saison et de l'alimentation des vaches (**CNIEL, 2021**).

I.5.1.2. La coagulation suivie de l'égouttage : Cette étape est réalisée grâce à l'action de la présure (ou des bactéries lactiques) pour obtenir une composition protéique similaire à celle du

lait maternel. Elle permet d'obtenir du lactosérum (riche en lactose et en protéines solubles) et du caillé (utilisé pour la fabrication du fromage). L'égouttage permet d'éliminer le lactosérum ou au contraire de le récupérer selon l'objectif (**Follain, 2015**).

I.5.2. Le mélange : Lorsque les ingrédients lactiques (comme les protéines du lactosérum, le lactose et les minéraux) et non lactiques (comme les huiles végétales, les vitamines et les émulsifiants) sont combinés en quantités appropriées, cela se fait dans une phase liquide pour recréer la formule lactée voulue. Pour assurer une dispersion efficace de la matière grasse et stabiliser le mélange, il est essentiel de passer par un homogénéisateur (**Pubert, 2013**).

I.5.3. L'homogénéisation : Ce processus implique de fragmenter les globules de graisse en petites particules qui se dispersent de manière uniforme dans la partie aqueuse du lait, empêchant ainsi la formation de deux phases distinctes. Pour ce faire, le lait est chauffé et poussé à travers une buse à une pression comprise entre 100 et 250 bars. La taille des globules gras est déterminée par la température et la pression, passant d'environ 3 à 6 μm à un diamètre moyen de 1 μm . Cela rend la formule lactée plus facile à digérer (**Qadir et al., 2016**).

I.5.4. La concentration : La formule lactée est par la suite concentrée afin de diminuer la teneur en eau de la préparation qui passe de 90% à 50% après concentration. La formule est alors d'aspect visqueux (**Beart et al., 2024**).

I.5.5. L'atomisation : En premier lieu, la formule lactée est déshydratée dans une chambre de séchage où elle est atomisée. L'atomisation est effectuée en utilisant des buses "haute pression" ou des turbines de pulvérisation qui propulsent le mélange à une vitesse de 70 m/s. Les gouttes résultant de la pulvérisation entrent en contact avec de l'air filtré et sont injectées à une température supérieure à 200°C. Cela permet de transformer les gouttes en une poudre contenant moins de 4% d'humidité. Afin d'obtenir une formule lactée facilement soluble, la déshydratation n'est pas complète : la présence d'une faible quantité d'humidité résiduelle favorise la formation de granulés poreux (**Inzan, 2018**).

I.5.6. Le séchage à lit fluidisé : Le produit est acheminé vers un appareil à lit fluidisé après quoi les particules se déposent sur une plaque vibrante perforée pour être séchées. Des prélèvements d'échantillons de la préparation sont réalisés à chaque étape de la production pour détecter toute

éventuelle présence de germes. Enfin, le lait obtenu est soumis aux derniers contrôles qualité avant d'être conditionné (**Pubert, 2013**).

I.5.7. Emballage et stockage : Le lait est généralement stocké après avoir été emballé dans des conditions aseptiques, souvent dans un emballage hermétique (**Walstra, 2006**).

I.6. Composition de lait infantile

Le lait pour bébé est principalement composé de lait de vache dans la plupart des cas. Ce type de lait est destiné à un animal dont le système digestif diffère de celui de l'être humain. A l'état naturel, il n'est pas adapté à la consommation par les bébés et doit subir des transformations pour se rapprocher autant que possible du lait maternel (**Pubert, 2013**).

I.6.1. Protéines : Les protéines jouent un rôle essentiel dans la construction, l'entretien et la réparation de tous les tissus du corps humain (**Allaoui et al., 2015**).

Les laits infantiles fournissent des protéines en quantités adéquates, correspondant aux besoins de croissance et au métabolisme de l'enfant. Un excès de protéines peut provoquer une surcharge rénale et des déséquilibres métaboliques. Il est crucial que ces protéines soient de haute qualité car elles renferment des acides aminés indispensables tels que la tyrosine, la cystine, l'histidine, la cystéine et la taurine, qui doivent être présents en quantités comparables à celles du lait maternel (**Gibney, 2009**).

Les besoins en protéines restent relativement stables, avec une recommandation d'environ 7g par jour jusqu'à 9 mois, 8g par jour jusqu'à 24 mois, et 9,5g par jour jusqu'à 3 ans (**Martin, 2001**). Il est recommandé que les enfants consomment 10g de protéines par jour. Ces protéines se divisent en deux catégories principales : les caséines et les protéines solubles (**Labarth, 2013**).

I.6.1.1. Caséines : Les protéines représentent 40% des composants du lait maternel, se présentant sous forme de micelles. Elles ont la particularité de coaguler en présence de présure ou de bactéries lactiques, formant ainsi des flocons insolubles dans l'estomac du nourrisson. Cette action ralentit le processus de vidange gastrique, procurant ainsi un sentiment de satiété au nourrisson. Cependant, un excès de ces protéines peut entraîner des problèmes de constipation (**Labarth, 2013**).

I.6.1.2. Protéines solubles : Les protéines qui représentent 60% du lait maternel ne coagulent pas ensemble lorsqu'on ajoute de la présure. Elles se composent principalement d'albumine et de lactoglobulines. Ces protéines sont mieux adaptées aux besoins physiologiques du nourrisson, ce qui favorise une meilleure digestion du lait et des selles plus molles (**Labarth, 2013**).

I.6.2. Glucides : Les laits infantiles contiennent en moyenne 7,8 à 8,2g de glucides pour 100 ml (**Labarth, 2013**). Le lactose et la dextrine maltose sont les principaux composants de la fraction glucidique des laits pour bébés, bien que certains ne contiennent que du lactose, et un type spécifique contient même du saccharose. Dans les laits AR (Anti-Régurgitations), une partie des glucides est parfois substituée par des amidons tels que le maïs, le riz, la pomme de terre, ou par de la farine de caroube (**Saad, 2008**).

I.6.2.1. Lactose : Le lactose, un sucre présent naturellement dans le lait de vache, est décomposé en glucose et galactose dans le système digestif. Il constitue 40% de l'énergie totale du lait maternel. Les prématurés et les nouveau-nés jusqu'à environ 2 mois peuvent souvent présenter une difficulté à absorber le lactose en raison de l'immaturation de leur système digestif. Ce qui n'est pas absorbé va fermenter dans le côlon, favorisant le développement de la flore intestinale et entraînant des gaz et des douleurs abdominales, communément appelées "coliques". Une plus grande quantité de lactose dans le lait entraîne une accélération et une facilitation du transit intestinal (**Follain, 2015**).

I.6.2.2. Autres sucres complexe : En raison de leur immaturité sur le plan immunologique, les nourrissons ont un système immunitaire très important. Certains aliments comme la dextrine maltose (qui réduit la fermentation et les ballonnements, et est donc recommandée pour les coliques du nourrisson), l'amidon et le fructose peuvent être bénéfiques (**Auxpuer, 2014 ; Labarth, 2013 ; Chauraqui, 2005**).

I.6.3. Lipides : Ils sont d'origine végétale ou animale, tout en jouant un rôle important :

I.6.3.1. Une source essentielle d'énergie : Il est crucial de fournir une quantité adéquate de lipides à un enfant jusqu'à l'âge de trois ans, car ils devraient représenter entre 45 et 50% de son apport énergétique. En revanche, chez les enfants plus âgés et les adultes, la proportion recommandée est de 35 à 49% (**Follain, 2015**). En fin de compte, la teneur en certains minéraux dans le lait n'est pas très importante car de l'eau de source ou de l'eau minérale y est ajoutée, lesquelles contiennent également des minéraux.

I.6.3.2. Une source majeure d'acides gras essentiels (AGE) : Il est essentiel de fournir les éléments nécessaires pour favoriser le développement cérébral et la maturation des fonctions neurosensorielles (**Auxpuer, 2014**).

I.6.4. Vitamines : Les vitamines sont des substances organiques essentielles en petite quantité pour le métabolisme des organismes vivants. Ces substances ne peuvent pas être produites en quantité suffisante par l'organisme (**Follain, 2015**).

I.6.5. Minéraux : Les minéraux sont fournis sous une forme neutre, ce qui signifie qu'ils sont liés à un élément qui neutralise les ions. Par exemple, on retrouve le carbonate de calcium, le sulfate de fer et le phosphate tricalcique. Tous les laits pour bébés contiennent : sodium, potassium, chlore, calcium, phosphore, magnésium, fer, zinc, iode, cuivre, manganèse et sélénium. Certains minéraux ne sont pas toujours ajoutés, tels que le fluor, le chrome et le molybdène (**Follain, 2015**).

I.6.6. Autres élément : Il y a plusieurs ajouts à l'alimentation, y compris les prés biotiques et les probiotiques, qui sont des composés non digestibles favorisant la croissance ou l'activité des bactéries dans le côlon, les facteurs de fermentation du lactose, les agents épaississants comme l'amidon et la caroube, ainsi que des substances supplémentaires comme les nucléotides, précurseurs des acides aminés avec des effets immunologiques, et la taurine, qui n'est pas essentielle pour le lait maternel.

I.7. Propriétés physicochimiques du lait infantile en poudre

Les critères essentiels de qualité pour le lait en poudre incluent : la qualité microbiologique, les propriétés organoleptiques ainsi que physico-chimiques. La qualité physicochimique des poudres est principalement déterminée par les paramètres technologiques utilisés lors de leur production. La valeur nutritionnelle est influencée par la force des traitements thermiques durant le processus technologique, ce qui tend à réduire la disponibilité des nutriments (destruction de vitamines, réduction de la quantité de lysine, dénaturation des protéines) ou à générer des composants nutritifs tels que le lactulose (**Deeb *et al.*, 2010 ; Jeantet *et al.*, 2008**).

I.7.1. Taille : La dimension des particules est une caractéristique physique essentielle qui peut influencer l'apparence et le comportement d'écoulement d'une substance. Une variation de taille

des particules peut entraîner une séparation des particules, avec les plus grosses se retrouvant en haut, ce qui peut impacter la reconstitution du produit sec (**Kalynker et al., 2016**).

I.7.2. Densité : La densité du lait n'est pas fixe et varie selon les types de lait. À une température de 20 °C, les valeurs moyennes se situent entre 1,030 et 1,033 (**Vierling, 2008**).

La densité apparente finale est le résultat de la densité des particules (air piégé et densité des solides) ainsi que de l'air interstitiel (air entre les particules). Plusieurs facteurs peuvent influencer la densité apparente, tels que la densité des solides et la quantité d'air interstitiel (**Kalynker et al., 2016**).

I.7.3. Fluidité : Selon une étude menée par (**Deeb et al., 2010**), la fluidité est un attribut important dans les secteurs des transports, de l'emballage et de la manutention. D'après les recherches de (**Kalynker et al., 2016**), la fluidité se définit comme la capacité d'une poudre à s'écouler librement sans former d'agrégats. Ce phénomène dépend de plusieurs facteurs tels que la taille et la forme des particules, leur densité et leur charge électrique.

I.7.4. Mouillabilité : lors de la reconstitution d'une poudre, il est essentiel que celle-ci soit d'abord pénétrée par l'eau dans laquelle elle est dissoute. Pour que la poudre de lait puisse se mélanger à l'eau, elle doit être capable de vaincre la tension superficielle entre elle et l'eau. Une méthode courante pour évaluer la capacité de mouillage consiste à placer une quantité mesurée de poudre sur la surface d'une quantité déterminée d'eau, à une température spécifique, puis à chronométrer le temps nécessaire pour que toute la poudre disparaisse sous la surface de l'eau (**Azza et al., 2010**).

L'influence principale sur le degré de mouillabilité est la quantité de matière grasse et la condition du lactose (**Kelly et al., 2016**).

I.7.5. Solubilité : La capacité de se dissoudre est essentielle pour de nombreux autres attributs fonctionnels, car si une poudre ne peut pas se dissoudre efficacement, elle ne pourra pas fournir l'attribut souhaité de manière efficace. Lorsqu'une poudre n'est pas entièrement dissoute, cela peut entraîner des problèmes lors du traitement, tels que l'obstruction des filtres et la perte de matière due à la sédimentation. De plus, la dissolution complète est également nécessaire pour éliminer ultérieurement les matières non dissoutes (**Azza et al., 2010**).

I.7.6. Viscosité : La gestion de la viscosité est primordiale dans les produits secs. La viscosité du lait reconstitué à partir de la poudre est généralement évaluée en utilisant une méthode conforme à l'application pour laquelle la poudre est prévue (**Kajal et al., 2012**).

I.7.7. Stabilité à la chaleur : les laits reconstitués à partir de poudres, une fois incorporés dans un produit, sont exposés à des températures variées lors du processus de chauffage. Il est essentiel de chauffer le lait pour éviter qu'il ne s'épaississe ou ne coagule trop. Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer la stabilité thermique des poudres. Une méthode courante consiste à mesurer le temps de coagulation d'une solution contenant une certaine quantité de matières solides de lait, à des températures comprises entre 120 et 140 °C (**Kajal et al., 2012**).

I.7.8. Propriété moussante et émulsifiant : La poudre présente de bonnes propriétés émulsifiantes et moussantes. Les phospholipides provenant de la membrane des globules gras du lait se dispersent dans une solution aqueuse qui comprend des protéines laitières, du lactose, des sels et des minéraux (**Olga, 2013**).

I.8. Propriété microbiologique du lait infantile

Les préparations pour nourrissons peuvent être contaminées pendant leur préparation, leur reconstitution, leur transport et leur stockage. Étant donné que les nouveau-nés sont considérés comme faisant partie d'un groupe à haut risque, il est logique que les produits utilisés pour eux soient plus sûrs que les aliments destinés aux adultes, qui ont développé plusieurs mécanismes de défense contre les infections (**Tahoun et al., 2015**).

I.8.1. Bactéries d'altérations : Il est important de noter que les germes d'altération sont influencés par le nombre et le type de bactéries présentes dans le lait cru, la température de préchauffage et les conditions de fonctionnement de l'évaporateur. Ainsi, un grand nombre de microorganismes présents dans le lait cru peuvent se retrouver dans la poudre (**tableau 01**) (**Deeb et al., 2010**).

I.8.2. Bactéries pathogènes : Les bactéries telles que *Salmonella*, *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Escherichia coli* sont des préoccupations majeures. Bien qu'elles ne se multiplient pas dans la poudre, elles peuvent proliférer lorsque le lait infantile en poudre est reconstitué et conservé à une température favorable (**Deeb et al., 2010**).

Tableau 01 : Composition microbiologique de lait en poudre (Pierre, 2003) :

Microorganismes	Nombre de microorganisme par g
Flore aérobie mésophile totale	<5.10
Coliformes totaux	<10
Coliformes fécaux	<1
<i>Streptococcus aureus</i>	Absence
<i>Salmonella</i> (dans 25g)	Absence
Bactérie sulfato-réductrice	Absence
Levures et moisissures	<10

I.8.3. Bactérie de contamination : Les microorganismes provenant de diverses sources constituent ce qu'on appelle la flore contaminant qui affecte le lait pour bébé :

I.8.4. Source de contamination : Le lait en poudre est un produit alimentaire complet en raison de sa composition. Cependant, il peut aussi favoriser la croissance des microorganismes, ce qui peut être dangereux pour la santé des consommateurs. Les risques de contamination du lait infantile proviennent de diverses sources, notamment :

I.8.4.1. La qualité de la matière primaire : Le lait non pasteurisé peut être contaminé par diverses sources microbiennes, telle que (**Tableau 02**) :

- Les excréments et les poils de l'animal : Coliformes, Entérocoques, *Clostridium*, *Salmonella*.
- Le sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques.
- L'air et l'eau : Diverses flores, bactéries sporulées (**Gurand, 2003**).

Tableau 02 : Les principaux groupes bactériens de lait (Michel *et al.*, 2001) :

Groupes	Caractères
1-Bactéries lactiques	• Activité biologique : fermentation du lactose.
2-Microcoques	• Flore banale de contamination du lait. • Activité enzymatique réduite.
3-Staphylocoques	• Anaérobies facultatifs, fermentent le lactose. • Exemple : <i>Staphylococcus aureus</i> . • Développement dans le lait à 15°C pendant plusieurs heures.
4-Bacillaceae	• Mésophiles, inhibées à 45°C, • Absentes dans le lait cru et les produits laitiers qui n'ont pas été chauffés. • Responsables des altérations des laits insuffisamment stérilisés.
5-Entérobactéries	• Des coliformes, fermentent le lactose. • Leur présence est liée à une contamination fécale. • Moins abondantes dans le lait par rapport à d'autres Gram (-). • Ces espèces résistent aux antibiotiques, se développent à des températures très différentes.
6-Achromobactériaceae	• Ces microorganismes forment l'essentiel de la flore psychrotrophe. • Ne fermentent pas les sucres.
7-Bactéries divers	• Les plus importantes <i>Pseudomonas</i> véhiculées par les eaux non potables et <i>Brucella</i> pathogène.

I.8.4.2. Contamination à partir de l'équipement : Il est fréquent que des biofilms laitiers se forment, étant dominés par diverses bactéries. Ces biofilms, lorsqu'ils se développent sur les équipements, peuvent causer des problèmes d'hygiène graves et des pertes économiques en raison de la détérioration des aliments et de la dégradation des équipements (Flint *et al.*, 1997). Les microorganismes présents dans les biofilms favorisent les réactions chimiques et biologiques qui entraînent la corrosion des métaux dans les tuyaux et les réservoirs, et ils peuvent également réduire l'efficacité du transfert de chaleur s'ils deviennent suffisamment épais (Simoes *et al.*, 2009).

I.9. Caractères de bonne qualité de lait en poudre infantile

Quand il s'agit de la santé d'un nourrisson, il est essentiel de prioriser ce point. Ainsi, il est donc crucial de choisir le meilleur lait premier âge pour votre enfant. Cependant, il peut être

difficile de faire le bon choix parmi la diversité de produits disponibles sur le marché. Le choix du produit non approprié peut présenter des risques pour la santé du nourrisson (**Tahoun et al., 2015**). Les critères déterminant la qualité d'un lait reposent sur la qualité du lait cru utilisé, le traitement thermique du lait, les méthodes de concentration, de séchage et les conditions de stockage (**Bourgeois et al., 1991**).

Les caractères d'un bon lait sont les suivant (**Makambala, 2012**) :

- La capacité de reconstitution est importante pour obtenir facilement un liquide homogène sans particules visibles. Cette capacité dépend des propriétés de mouillabilité et de solubilité.
- Il est essentiel que le liquide reconstitué ne présente pas de saveurs anormales telles que le goût de cuit, de brûlé ou de rance. De plus, il doit être exempt de germes pathogènes tels que les salmonelles et les staphylocoques, ainsi que de toxines et de micro-organismes nuisibles à sa conservation ou à son utilisation.
- Il est également crucial que le liquide ne contienne pas de substances anormales comme des antibiotiques ni de résidus provenant des différentes étapes de production, de récolte et de conservation du lait. Enfin, sa structure et sa composition physico-chimique ne doivent pas être altérées, afin de préserver sa valeur nutritionnelle et ses propriétés technologiques.

I.11. Marché des laits infantiles

En 2019, la population mondiale est estimée à 7,7 milliards de personnes et devrait augmenter pour atteindre 8,5 milliards en 2030 (**Nations Unies, 2019**). Cette croissance constante va générer une forte demande de laits infantiles, ce qui va stimuler la compétitivité mondiale en matière de promotion et d'innovation des produits commercialisés (**Statista, 2023**).

Dans le domaine économique, le marché mondial a été estimé à 45,12 milliards de dollars américains en 2018, avec 2,66 milliards de dollars pour les États-Unis et 6,18 milliards de dollars pour l'Union européenne (UE). On prévoit qu'il atteindra 103,75 milliards de dollars en 2026, avec un taux de croissance annuel d'environ 11 % au cours de la période 2019-2026 (**Infant Formula Market Size, 2019**).

La prospérité du marché mondial est actuellement influencée par l'augmentation des ventes liée à la croissance de la population, ainsi que par l'attention croissante portée au bien-être et à la

nutrition des nourrissons. Les industries tirent avantage de cette tendance en introduisant des allégations marketing telles que "favorise le développement cognitif" ou "soutient la santé digestive", parmi d'autres. Cependant, la plupart de ces allégations peuvent être trompeuses pour les consommateurs (**Hughes et al., 2017**).

I.11.1. Production et consommation, estimations en chiffres

En 2017, on estime que la production mondiale de laits infantiles s'élève à 2,7 milliards de tonnes. L'Union européenne se positionne en tant que premier producteur, suivi par la Chine et l'Asie du Sud-Est. En ce qui concerne les exportations, l'UE domine largement avec les Pays-Bas à 33 %, la France à 23 % et l'Irlande à 16 %. En revanche, la production chinoise et celle de l'Asie du Sud-Est sont principalement destinées à la consommation locale (**Pinson, 2018**).

Le principal flux d'exportation provient de l'Union européenne vers la Chine, représentant 50 % du total. En outre, des exportations sont également dirigées vers l'Afrique du Nord, le Moyen-Orient, l'Afrique subsaharienne et l'Asie du Sud-Est. Les échanges commerciaux en Amérique se caractérisent par des flux allant des États-Unis vers le Canada et l'Amérique du Sud (**CRI « Credit Rating Information » Report, 2023**)

En Europe, tout comme à l'échelle mondiale, cinq grandes sociétés multinationales - Nestlé (Suisse), Danone (France), Mead Johnson (États-Unis), Abbott (États-Unis) et Friesland Campina (Pays-Bas) - dominent la production, contrôlant plus de 62 % du marché. Ces entreprises concentrent principalement leurs activités en Europe aux Pays-Bas et en Irlande, tandis que le marché français voit une augmentation des investissements chinois (**Yi, 2018**).

Avec sa croissance urbaine rapide, la Chine affiche une production et une consommation étendues, ce qui devrait lui permettre de détenir la plus grande part de marché (**Infant Formula MarketSize,2019**).

Chapitre II :
Généralités sur Staphylococcus
aureus

Chapitre II : Généralités sur *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus est un genre de bactéries à Gram-positives qui comprend 55 espèces et 23 sous-espèces. Parmi celles-ci, on trouve *Staphylococcus aureus*, également connu sous le nom de Staphylocoque doré (**Madhaiyan et al., 2020**).

II.1. Définition

C'est une bactérie qui se présente sous la forme de coques mesurant entre 0,5 et 1,5 µm de diamètre. Elles peuvent être isolées ou regroupées en diplocoques ou en amas ressemblant à une grappe de raisin (**Landgraf et Destro, 2013**).

Il s'agit d'une bactérie omniprésente et peu exigeante qui peut se développer sur des milieux de culture non sélectifs. Sa capacité respiratoire aéro-anaérobie facultative lui permet d'être présente dans le microbiote cutané-muqueux en présence d'oxygène (**Roberts et Chambers, 2005**) et dans des tissus peu oxygénés tels que ceux des plaies profondes (**Turner et al., 2020**).

II.2. Historique

En Allemagne, en 1880, Robert Koch et en France, Louis Pasteur a observé des amas de coques présents dans des pus d'origine humaine, tels que des furoncles et des ostéomyélites (**Hennekinne, 2009**). Ces amas ont été nommés "vibrions pyogéniques" (**Trouillet, 2011**). Plus tard la même année, le chirurgien Alexander Ogston a isolé ces bactéries dans le pus d'un abcès chirurgical situé dans une articulation du genou (**Licitra, 2009**), et il a proposé de les nommer "*Staphylococcus*" en raison de leur regroupement en amas irréguliers qui ressemblent à une grappe de raisin (**Hennekinne, 2009**).

Par la suite, un chirurgien allemand du nom d'Anton J. Rosenbach a réussi à identifier et à isoler deux souches de staphylocoques qu'il a nommées en fonction de la couleur de leurs colonies. Ainsi, il a nommé *Staphylococcus aureus*, en référence à l'or en latin, et *Staphylococcus albus*, en référence au blanc en latin (**Rosenbach, 1884**).

II.3. Classification

La famille des Staphylococcaceae comprend divers genres de Cocci à Gram positifs de l'ordre des Bacillales. En plus du genre *Staphylococcus* (**Tableau 03**), on y trouve d'autres genres moins connus tels que *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. À la fin des années 1990, le genre *Staphylococcus* était classé avec les genres *Micrococcus* et *Stomatococcus* au sein du groupe des Micrococcaceae (**Le Loir et Gautier, 2010**). Cependant, en 2001, les chercheurs Garrity et Holt ont suggéré de retirer les *S. aureus* de la famille des Micrococcaceae (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) suite à leur analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'ARNr 16S et d'autres analyses génétiques (**Dworkin, 2006**). Le genre *Staphylococcus* compte environ 53 espèces et 28 sous-espèces (**Touaitia, 2016**).

Tableau 03 : Classification de *Staphylococcus aureus* (**Meyer, 2021**) :

Règne	Bactéries
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

II.4. Caractères biologiques

Ces bactéries sont caractérisées par plusieurs propriétés, qui sont :

II.4.1. Caractères Morphologiques : *Staphylococcus aureus* est une coque à Gram positif (**Figure 02, A**) mesurant environ 0,5 à 1 µm diamètre, immobile, en forme d'orifice (**Brun, 2000**). Souvent encapsulé, notamment dans son cycle contagieux (**Ivain, 2017**). Cette bactérie peut se présenter sous forme isolée dans les diplocoques apparaissent le plus souvent en grappes ressemblant à une grappe de raisin (**Figure 02, B**).

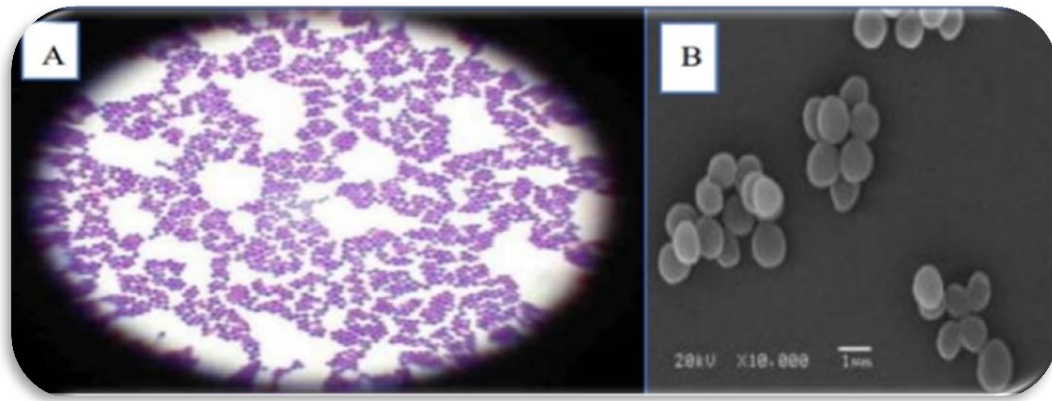


Figure 02 : A. *Staphylococcus aureus* sous microscope optique (x100) (Ragab *et al.*, 2021) ; B. Observation par microscope électronique à balayage et à transmission de *Staphylococcus aureus* (Grossissement x10000) (Boi, 2021).

II.4.2. Caractères culturels : Concernant les conditions de culture, il convient de mentionner que les espèces poussent dans des environnements mésophiles (températures comprises entre 15 et 45°C, avec une température optimale de 37°C), les neutrophiles (pH compris entre 4,5 et 9,5) et les halophiles (à présence de fortes concentrations de sel) (Bronsard, 2019 ; Trouillet, 2011). Quelques milieux utilisés pour l'isolement de *Staphylococcus aureus* : Sur milieu Chapman, les bactéries doivent une couleur dorée due à la production de pigments similaires aux caroténoïdes Xanthine de *Staphylococcus*. Ce pigment est considéré comme un élément de virulence car il protège les bactéries neutralisant les oxydants produits par le système immunitaire de l'hôte (Liu *et al.*, 2009) (Figure 03). Les colonies de *Staphylococcus aureus* montrant leur couleur sur milieu Baird et Parker noir dû à la réduction de la tellurite avec un halo clair autour (protéolyse) suivi du halo devient ensuite opaque en raison de la production de lipase (Denis *et al.*, 2007). Staphylocoque doré peut également être cultivé sur des milieux gélosés classiques tels que CBA (Columbia blood agar), TSA (TrypticSoy Agar) (Figure 03) ou sous forme de brouillard dans un bouillon où une culture de *S. aureus* riche et uniforme, parfois avec des dépôts et des voiles en surface, sans pigmentation (Morgene, 2018). Les colonies typiques sur gélose au sang sont crème/gris/blanc cassé, jaunâtres à orange, lisses, intactes et légèrement surélevées et hémolyse (Baptiste, 2022) (Figure 03).

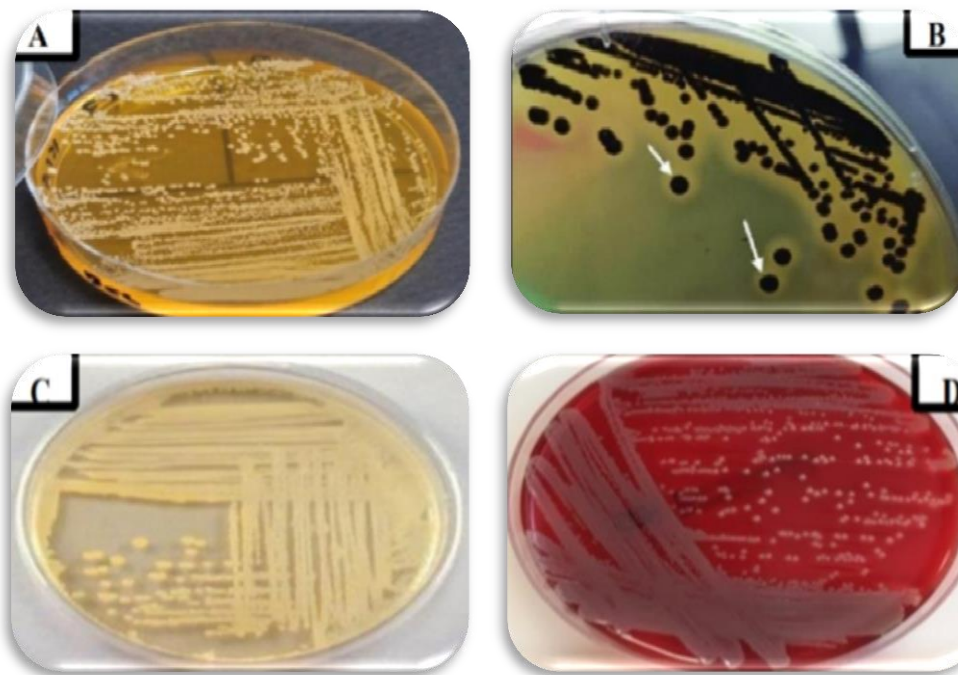


Figure 03 : **A.** Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman (<https://droguetsebastien.emonsite.com/>); **B.** Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* (flèches blanches) sur gélose Baird-Parker (Juwita *et al.*, 2022) ; **C.** Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur milieux TSA (Kaser, 2017) et **D.** Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur gélose au sang (Meyer, 2021).

II.4.3. Caractères biochimiques : Les bactéries de l'espèce *S. aureus* sont des organismes chimio-organotrophes qui peuvent vivre dans des conditions aérobies ou anaérobies facultatives. Elles partagent des caractéristiques communes avec d'autres bactéries du genre *Staphylococcus*, comme le fait d'être catalase positive, ce qui les différencie facilement des Streptocoques qui, eux, sont catalase négative. Ces bactéries possèdent un ensemble d'enzymes spécifiques à leur espèce qui facilitent leur identification, notamment la capacité à produire de la coagulase, de la thermonucléase et de la protéine A, ainsi que la capacité à dégrader le mannitol sur un milieu de culture Chapman (Beaudry, 2011 ; Trouillet, 2011). Il est important de noter que *S. aureus* est capable de provoquer une hémolyse dans un milieu de culture contenant du sang en raison de sa capacité à produire quatre types d'hémolysines (alpha, bêta, gamma et delta) (Dinges *et al.*, 2000) (Tableau 04). En général, les souches de *S. aureus* produisent principalement une hémolysine de type bêta (Figure 04) (Ploy, 2016).

Tableau 04 : Caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* (Le Loir et Gantier, 2009) :

Enzymes		Métabolisme des sucres	
Positif	Négatif	Positif	Négatif
Arginine dihydrolase	Omithine	D-Mannitol	D-Cellobiose
Catalase	décarboxylase	D-Mannose	D-Xylose
Coagulase	Oxydase	D-Tréhalose	L-Arabinose
Hémolyse	Pyrrolidonyl	D-Turanose	Raffinose
Phosphatase alcaline	arylamidase	Maltose	-
Thermonucléase	B-galactosidase	Saccharose	-
B-Glucosidase	B-Glucuronisase	-	-

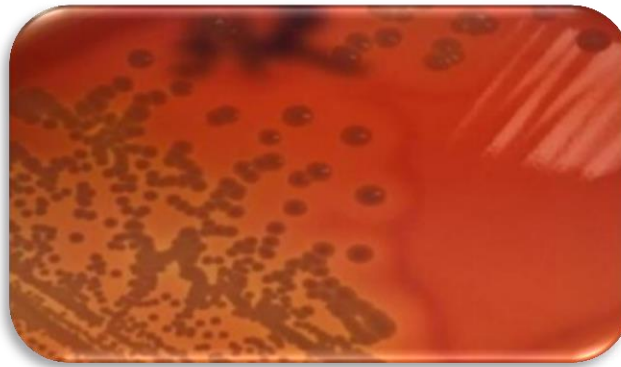


Figure 04 : La β -hémolyse causée par *Staphylococcus aureus* (Lainhart *et al.*, 2018).

II.4.4. Caractères génétiques : La capacité de *S. aureus* à coloniser divers environnements découle de son incroyable capacité d'adaptation, qui est étroitement associée à sa grande plasticité génomique (Costa *et al.*, 2020). En général, le génome de *S. aureus* est constitué d'un seul chromosome renferme environ 2,9 millions de paires de bases et comprenant en moyenne environ 2700 gènes (Park *et al.*, 2019). La première analyse du génome de *S. aureus* a été réalisée en 2001 (Kuroda *et al.*, 2001).

Chapitre III :
Généralités sur les biofilms

Chapitre III : Généralités sur les biofilms

Au cours des 150 dernières années, l'idée selon laquelle les bactéries ont une préférence pour la croissance sur des surfaces a été régulièrement avancée (**Costerton, 1999**). En parallèle, des observations au microscope optique ont révélé que les bactéries planctoniques se développent de manière différente une fois qu'elles se sont fixées à une surface et ont commencé à former un biofilm. Les termes "bactéries sessiles" et "bactéries planctoniques" font référence respectivement aux micro-organismes qui adhèrent à une surface et à ceux qui flottent librement dans une suspension. Les organismes sessiles peuvent adhérer à des surfaces abiotiques (matériaux inertes) ou biotiques (tissus ou cellules vivantes) (**Dune, 2002**).

III.1. Définition

Une part importante des micro-organismes dans la nature se développe au sein de biofilms, des écosystèmes structurés (**Figure 05**) (**Camba et al., 2024**). Un biofilm est une population de cellules microbiennes se développant sur une surface et enfermées dans une matrice extracellulaire amorphe (**Donlan, 2002**). Le biofilm formé dans les environnements de transformation des aliments revêt une importance particulière, car il peut être une source chronique de détérioration des aliments ou de transmission de maladies. Les bactéries présentes dans les biofilms présentent une résistance accrue au nettoyage et à l'assainissement (**Joseph et al., 2001 ; Bower et Daeschel, 1999**). De nombreuses études ont montré que les bactéries sont capables d'adhérer et de former un biofilm sur des surfaces en métal, en verre ou en caoutchouc. Ils sont entourés par une matrice extracellulaire complexe de polymères, connue sous le nom de "substances polymériques extracellulaires" (EPS), qui joue un rôle essentiel (**Joseph et al., 2001 ; Sinde et Carballo, 2000 ; Wong, 1998**).

III.2. Historique

Au 17^{ème} siècle, Anthony van Leeuwenhoek a été un précurseur dans l'exploration microscopique du biofilm. En utilisant un microscope qu'il avait lui-même fabriqué, il a été le premier à observer les micro-organismes appelés "animalcules" qui se trouvaient à la surface de ses dents. Il a noté que même après le nettoyage, ces organismes microscopiques restaient aussi compacts que de la pâte, mettant ainsi en évidence la persistance du biofilm (**Mirzaei et al., 2024**).

En 1933, Arthur Henrici a noté que la présence de boue au fond des navires était largement due aux bactéries. Il a remarqué que les bactéries présentes dans l'eau ne se trouvent pas principalement en suspension, mais qu'elles se développent en étant attachées aux surfaces immergées (**Høiby, 2014**).

En 1943, Zobell a avancé la théorie selon laquelle l'attachement des bactéries se déroule en deux phases distinctes : d'abord une adhérence réversible, puis une adhérence irréversible (**Høiby, 2014**).

Dans les années 1980, les recherches menées par William Costerton ont mis en lumière le fait que la plupart de la biomasse microbienne se trouve attachée à des surfaces. Ces micro-organismes forment des communautés diversifiées qui sont encapsulées dans une matrice extracellulaire contenant une grande quantité d'eau, de sucres et de protéines. Ces structures, présentes dans divers environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (telles que la surface des feuilles) ou animales (comme les muqueuses et les surfaces dentaires), sont couramment désignées sous le terme de biofilms (**Roux et Ghigo, 2006**).

III.3. Caractéristiques du biofilm

L'EPS peut servir de source de nutriments, faciliter les échanges génétiques entre les bactéries, maintenir l'hydratation, offrir une protection contre les agents antibactériens, et remplir d'autres fonctions encore. La variété des structures des biofilms est étroitement liée à l'organisation des EPS (**Cloutier, 2017**).

Une caractéristique importante des biofilms, qui les distingue de leurs homologues planctoniques, est leur capacité à survivre dans des environnements hostiles. Par exemple, ils peuvent supporter aux rayonnements ultraviolets, aux métaux lourds, aux conditions acides, aux variations de salinité et d'hydratation, ainsi qu'à la phagocytose (**Lebeaux et al., 2014**). Leur résistance accrue aux antibiotiques aggrave les infections constituent une menace pour la santé humaine. En réalité, on estime que 60 % de toutes les infections microbiennes et 80 % des infections chroniques sont associées à la formation de biofilms (**Flores et al., 2024**).

III.4. Structure et composition du biofilm

Il existe diverses structures de biofilms décrites par les scientifiques. Les biofilms sont des structures tridimensionnelles qui se composent de cultures mono ou mixtes (**Böhning *et al.*, 2024**).

La plupart des biofilms présentent une grande diversité, composée de micro colonies de cellules bactériennes emprisonnées dans une matrice EPS et séparées par des espaces vides, créant ainsi des canaux d'eau. Ces canaux favorisent le déplacement de liquide qui contribue à la diffusion des nutriments, de l'oxygène et même des agents antimicrobiens (**figure 05**) (**Lewandowski et Evans, 2000**).

L'EPS, qui peut constituer entre 50 et 90 % du carbone organique total des biofilms, est le principal composant de la matrice du biofilm. Il peut varier en termes de propriétés chimiques et physiques, mais est principalement composé de polysaccharides (**Donlan, 2002**).

Stoodley *et al.*, (1997) ont identifié plusieurs critères ou caractéristiques qui peuvent être utilisés pour décrire de manière générale les biofilms. Ces critères comprennent la présence d'un film de base mince, pouvant aller d'une monocouche de cellules inégale à un film de plusieurs couches d'épaisseur contenant des canaux d'eau. De plus, les organismes constituant le biofilm peuvent avoir un impact significatif sur sa structure.

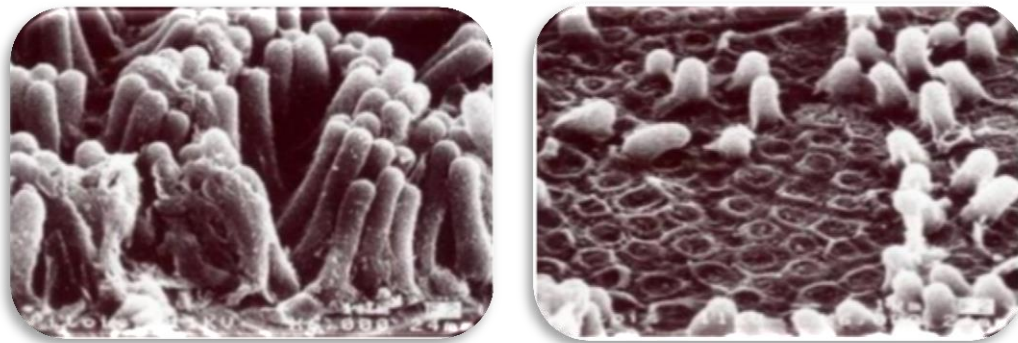


Figure 05 : Observation du biofilm par microscope électronique (**Robert, 2012**)

III.5. Les étapes de la formation du biofilm

La formation de biofilm est un processus continu. Il se développe en suivant différentes étapes sur une période de 24 à 48 heures (**Pereira *et al.*, 2020**) (**Schématiser dans la figure 06**).

Les étapes impliquées dans la formation du biofilm sont (**Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020**) :

- L'attachement initial ou réversible
- L'attachement irréversible
- La formation de micro colonies
- La maturation ou le développement
- La dissémination ou le détachement de la matrice

III.5.1. L'attachement initial ou réversible : Il est possible d'observer que la première phase de cette adhésion réversible se déroule de manière rapide. Cela est principalement dû à la présence des appendices générateurs qui facilitent le rapprochement de la bactérie vers la surface à coloniser. Lors de ce premier contact, une liaison temporaire se forme, permettant ainsi à la bactérie d'évaluer la nature de la surface sur laquelle elle se trouve (**Guilhen, 2017**).

III.5.2. L'attachement irréversible : En temps réel, un certain nombre de cellules adsorbé de façon réversible restent fixées et deviennent ensuite adsorbées de manière irréversible. D'après une hypothèse avancée, les structures physiques des bactéries comme les flagelles, les fimbriae et les pili surmontent les forces physiques répulsives de la double couche électrique. Ces structures entrent ensuite en contact avec le réseau global de la couche de conditionnement, ce qui provoque des réactions chimiques comme l'oxydation et l'hydratation, ce qui renforce le lien entre les bactéries et la surface (**Garrett *et al.*, 2008**).

III.5.3. La formation de micro colonies : Les bactéries qui s'attachent commencent à se reproduire, ce qui entraîne la création de petites colonies. Grâce au quorum sensing, ces petites colonies produisent une substance polymère extracellulaire, favorisant ainsi le développement et la croissance de la matrice EPS (**Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020**).

III.5.4. La maturation ou le développement : On observe actuellement une croissance des communautés tridimensionnelles.

III.5.5. La dissémination ou le détachement de la matrice : Les bactéries se détachent enfin de la structure sessile pour redevenir planctoniques. Cela leur permet de se disperser et de coloniser d'autres surfaces (**Rasamiravaka *et al.*, 2015**).

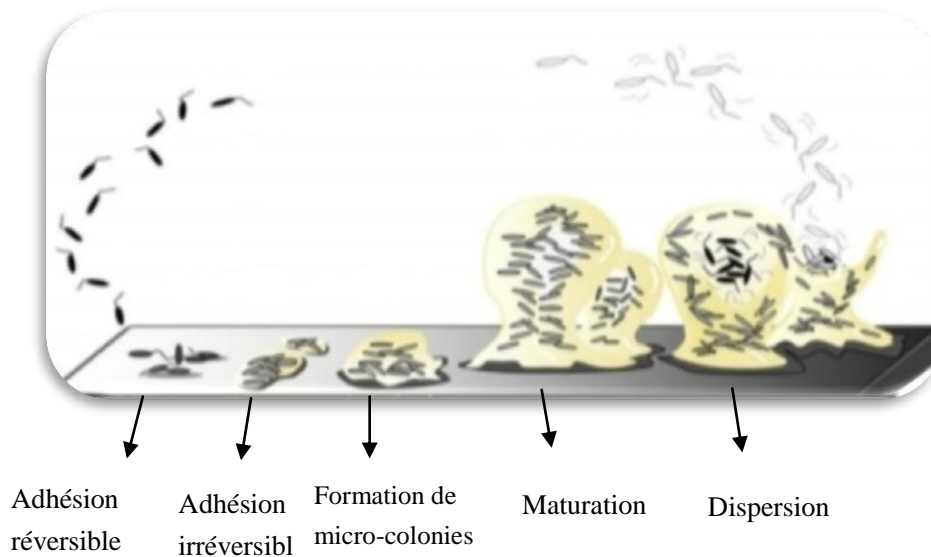


Figure 06 : Etapes de formation de biofilm (**Sauer *et al.*, 2022**)

III.6. Facteurs favorisant la formation du biofilm

La constitution d'un biofilm est un processus complexe, influencé par divers éléments : les propriétés du substrat où les bactéries se fixeront, les forces en présence dans l'environnement aqueux (hydrodynamique du liquide), les caractéristiques de cet environnement et les propriétés superficielles des cellules (**Donlan, 2002**).

III.6.1. Caractéristiques de la surface : Tout matériau en contact avec un liquide contenant des bactéries peut servir de base pour la création d'un biofilm. L'adhésion des bactéries à une surface et la création d'un biofilm sont affectées par la rugosité, les caractéristiques chimiques d'une surface et l'existence préalable de films protéiques (**De Chalvet et De Rochemonteix, 2009**).

III.6.1.1. Rugosité de la surface : Plus une surface est irrégulière, plus sa colonisation par de petites colonies est significative (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont préférentiellement colonisées du fait de forces répulsives plus faibles et d'une surface de fixation accrue, en raison de l'existence d'aspérités (**Donlan, 2002**).

Cependant, des souches sauvages de bactéries colonisent également des surfaces lisses. Ainsi, les biofilms ont tendance à se développer sur les irrégularités des matériaux, créant des zones propices à la multiplication bactérienne et moins réceptives aux désinfectants ou antiseptiques (**Donlan et Costerton, 2002**).

III.6.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface : Les caractéristiques physico-chimiques de la surface peuvent affecter le niveau et l'étendue de l'adhésion. Les micro-organismes ont une plus grande propension à adhérer à des surfaces non polaires et hydrophobes telles que le Téflon ou divers plastiques, plutôt qu'à des matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

III.6.1.3. Présence de films protéiques sur la surface : L'existence de polymères sur un matériau change les caractéristiques physico-chimiques de sa surface et impacte directement l'adhésion des bactéries à celle-ci. Effectivement, la présence d'un film protéique tel que le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires sur un biomatériau influence l'adhésion des bactéries à sa surface et favorise la création de biofilms (**Nobbs, 2009**).

III.6.2. Caractéristiques de milieu : Le développement et la formation d'un biofilm requièrent des outils enzymatiques spécifiques ainsi que des structures particulières, dont l'activation est influencée par des éléments environnementaux critiques (**Goller, 2008 ; Martinez, 2007 ; Donlan, 2002 ; O'Toole et al., 2000**).

III.6.2.1. Température : Elle est cruciale non seulement pour son impact sur l'activité enzymatique et métabolique des bactéries, mais aussi parce qu'elle modifie certains facteurs physicochimiques tels que le pH, l'activité ionique, la turbulence thermique et la solubilité des gaz, en plus d'affecter les caractéristiques de surface des microorganismes. La mobilité cellulaire et la production de flagelles, et par conséquent l'adhésion, peuvent être grandement influencées par la température de croissance (**Dumas, 2007**).

III.6.2.2. pH : L'environnement modifie la charge de surface des microorganismes et celle des supports solides en raison du déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés, en fonction de leur pKa (**Hamadi et al., 2004**). Cela peut entraîner une diminution ou une hausse des interactions électrostatiques répulsives qui sont défavorables à l'adhésion (**Boutaleb, 2007**).

III.6.2.3. Sources de carbone disponibles : Elles ont un impact sur la création d'un biofilm et son processus de maturation (Martinez, 2007).

III.6.2.4. Concentrations en nutriments : Dans un environnement statique, une concentration élevée en nutriments est nécessaire pour la formation d'un biofilm, ce qui n'est pas le cas dans un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008).

III.6.2.5. Concentrations en certains cations : L'accroissement de la concentration de divers cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) affecte l'adhérence de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en diminuant les forces répulsives qui agissent entre les bactéries à charge négative et la surface verre (Fletcher, 1988).

III.6.2.6. Hydrodynamique du fluide : En fonction de la position du matériau dans un fluide, son exposition aux turbulences sera plus ou moins importante. La zone de fixation, éloignée des courants laminaires, est celle qui présente les moindres turbulences.

C'est exactement dans cette région où les micro-organismes ont une meilleure chance de s'adhérer à une surface, car ils sont moins affectés par les forces liées au fluide (Donlan, 2002).

III.6.3. Propriétés des cellules

L'adhérence des bactéries à une surface est influencée par plusieurs facteurs, tels que l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles, ainsi que la production d'exopolysaccharides. L'adhésion des micro-organismes à une surface est influencée par sa nature hydrophobe. Plus les matériaux sont moins polarisés, plus les liaisons hydrophobes prennent de l'importance (Donlan, 2002). Les cellules bactériennes ont la capacité de former des biofilms grâce à la production d'exopolysaccharides. Ce processus implique l'utilisation de deux structures externes, à savoir les flagelles et les pili de type 3, qui sont essentiels pour leur adhérence à une surface.

La majorité des bactéries ont une charge négative et possèdent sur leur surface des zones hydrophobes. Divers aspects structuraux des bactéries jouent un rôle dans leur capacité à se fixer à une surface : les flagelles, les fimbriae et les polysaccharides. On peut observer des compétitions ou des collaborations entre cellules lorsque plusieurs espèces bactériennes sont impliquées. Les surfaces hydrophobes semblent être principalement attirées par les polymères apolaires présents à la surface des cellules, tels que les fimbriae, certaines protéines et les acides

mycoliques, qui sont des éléments constitutifs de certaines bactéries Gram positives (**Song et al., 2021**).

Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides jouent un rôle prépondérant dans les processus d'adhésion à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

III.7. Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme interne permettant aux bactéries de communiquer, d'interagir avec leur environnement et de fonctionner comme des entités multicellulaires (**Abisadoetal., 2018**). Cette communication repose sur la capacité des bactéries à produire des molécules de signalisation chimique de faible poids moléculaire, également appelées auto-inducteurs (**Quecan et al., 2019 ; Li et al., 2018 ; Mizan et al., 2016**). Ce système joue un rôle crucial dans divers processus biologiques, notamment la formation de biofilms (**Mizan et al., 2016 ; Yuan et al., 2018**).

Les bactéries à Gram négatif utilisent le système AHL (homosérine lactone acylée) pour contrôler la formation de biofilm, (**Machado et al., 2019 ; Li et al., 2018 ; Skogman et al., 2016**). En revanche, les bactéries Gram positif utilisent le système AIP (autoinducteur peptidique). Les deux types de bactéries, font également usage d'un autre système appelé AL-2 (autoinducteur-2), comme observé chez des espèces telles que *Bacillus cereus* et *Campylobacterjejuni*, (**Preda et Sandulescu, 2019 ; Brackman et Coenye, 2015**). Ces bactéries se servent de ce système pour former leur biofilm, (**Bezek et al., 2016 ; Duanis-Assaf et al., 2015**).

III.8. Problèmes liés aux biofilms en industrie agroalimentaire

Il est largement reconnu que la formation de biofilms sur les surfaces dans l'industrie agroalimentaire constitue une importante source de contamination microbienne (**Diaz et al., 2016 ; Winkelströter et al., 2014**). Plusieurs facteurs contribuent à ce phénomène, tels que l'humidité, la forte concentration en nutriments et la présence de matières premières contaminées par des bactéries (**Curcic-Trajkovska, 2015 ; Bower et al., 1996**). Une fois établis, ces biofilms entraînent divers problèmes causant des pertes économiques, notamment l'altération des aliments transformés, la réduction de leur durée de conservation, la corrosion des matériaux, la diminution du transfert de chaleur, l'augmentation de la résistance au frottement du fluide, et par conséquent, la détérioration des équipements. Les biofilms représentent un risque pour la santé publique car

ils favorisent la transmission de maladies causées par des microorganismes pathogènes associés aux aliments (Malek, 2019 ; Laura *et al.*, 2016 ; Winkelströter *et al.*, 2014 ; Simoes *et al.*, 2010 ; Gram *et al.*, 2007 ; Bremer *et al.*, 2006 ; Sharma et Anand, 2002).

III.9. Facteurs favorisant la dispersion du biofilm

Quand l'environnement se détériore, les cellules du biofilm se détachent. Cela peut entraîner l'isolement de certaines bactéries de la colonie principale. Ces bactéries peuvent alors se déplacer pour explorer les environs à la recherche de nouvelles surfaces à coloniser (Romain *et al.*, 2012 ; Spormann, 2008).

Des changements environnementaux tels que la modification du pH ou la présence de certains composés spécifiques, la limitation en oxygène, et la diminution de la concentration ou la modification de la nature des nutriments peuvent induire la dispersion du biofilm (Gjermansen *et al.*, 2005 ; Sauer *et al.*, 2004).

Il y a un lien mécanique entre l'attachement et le détachement. Afin de provoquer le détachement, il est essentiel de désactiver (ou rompre) les facteurs moléculaires impliqués dans l'attachement. Ainsi, les mécanismes moléculaires du processus d'attachement cellulaire jouent un rôle important dans la régulation du détachement.

Lorsque l'oxygène est limité, cela entraîne une diminution de l'activité respiratoire, ce qui conduit à un état de faible énergie pour les cellules qui forment un biofilm. Cela déclenche la dissolution du biofilm et le détachement des cellules. Il est important de noter que le processus de détachement dépend de l'âge et/ou de l'épaisseur du biofilm (Spormann, 2008).

Il arrive parfois qu'un biofilm se disperse lorsque les nutriments se font rares ou lorsqu'il est attaqué (Romain *et al.*, 2012). Par exemple, cela peut se produire avec la mort des cellules du biofilm provoqué par des bactériophages.

Divers éléments peuvent provoquer le détachement du biofilm, comme l'impact mécanique d'un écoulement de liquide ou l'arrêt de la production de composants du biofilm tels que les polysaccharides de la matrice (Spormann, 2008).

III.10. Les biofilms à Staphylocoques

Il est observé que les bactéries du genre *Staphylococcus* ont la capacité de former des biofilms sur diverses surfaces, qu'elles soient biotiques ou abiotiques. Ces biofilms créés par *Staphylococcus* sont reconnus pour leur résistance élevée au stress environnemental, comme les températures élevées et les agents antimicrobiens. Dans le secteur alimentaire, cette bactérie s'adapte et développe ses biofilms dans les chaînes de production alimentaire. Généralement, cette contamination est principalement causée par les manipulateurs ou les matières premières, en particulier pour les aliments d'origine animale (**Shan su et al., 2019 ; Galié et al., 2018 ; Fetsh, 2018 ; Grare, 2016 ; Duhfour et al., 2012 ; Vázquez et al., 2012 ; Simon et Sanjeev, 2007 ; Trampuz et Widmer, 2006**).

Ce biofilm peut causer des pertes financières dans les secteurs alimentaires (**Galié et al., 2018**). De plus, il peut entraîner des intoxications alimentaires chez les humains suite à la consommation d'aliments contaminés (**Bhunja, 2018**). C'est pourquoi il est essentiel de rechercher de nouvelles méthodes pour éliminer ce problème (**Bevilacqua et al., 2017**).

Partie II :
Matériel et Méthodes

Partie 01 :

Isolement et identification de

Staphylococcus aureus

Partie 01 : Isolement et identification de *Staphylococcus aureus*

Afin d'évaluer la capacité de formation de biofilm par des souches bactériennes isolées de la poudre de lait infantile commercialisée dans la région de Tlemcen, 03 marques ont été choisies. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) à l'Université de Tlemcen et laboratoire de microbiologie d'Institut Sciences et Technique Appliquées (ISTA) Université de Tlemcen. Le travail a été réalisé durant la période de Février à Mai 2025.

I.1. L'échantillonnage

Un total de 03 échantillons (**Figure 07**) a été choisi pour cette étude. Les PLIs sont achetées de la ville de Tlemcen. Elles ont été transportées au laboratoire et soumises aux différents traitements.



Figure 07 : Les échantillons de poudres de laits infantiles utilisés pour l'isolement des souches bactériennes

I.2. Isolement et identification de *S. aureus*

I.2.1. Identification microbiologique : Pour la préparation de la solution mère et les dilutions décimales, nous avons réalisé à partir de lait infantile des dilutions successives en progression selon la méthode suivante :

Pour obtenir une solution mère 1g de l'échantillon a été introduit aseptiquement dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologie stérile. Il s'agit de la dilution 10^{-1} , ensuite ce tube a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur. Après cela, 1ml de la dilution 10^{-1} a été prélevé à l'aide d'une

micropipette, puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'EP stérile, le contenu du tube a ensuite été homogénéisé à l'aide d'un vortex, c'est la dilution 10^{-2} . Enfin, 1 ml de la dilution 10^{-2} a été prélevé dans un autre tube stérile et ajouté à 9 ml d'EP, pour obtenir la dilution 10^{-3} (**Figure 08**).



Figure 08 : Les dilutions de poudre de lait infantile

A : dilution 10^{-1} / B : dilution 10^{-2} / C : dilution : 10^{-3}

I.2.1.1. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird-Parker

A partir des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-3}), nous avons prélevé 0,1 ml de chaque dilution à l'aide d'une micropipette que nous avons déposé sur une gélose Baird-Parker, additionnée de tellurite de potassium, pyruvate de sodium et de l'émission de jaune d'œufs. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24 à 48h. Les colonies typiques de *Staphylococcus aureus* apparaissent noires, brillantes, souvent entourées d'un halo clair dû à l'activité de la lécithinase. Les résultats sont rapportés en UFC/g, selon la formule de la norme AFNOR (1994) :

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0.1n_2) d}$$

- **N** : Nombre exprimé en UFC/g.
- **ΣC** : Somme des colonies comptées sur les boîtes retenues de trois dilutions successives.
- **V** : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en ml.
- **n_1** : Nombre des boîtes retenues à la première dilution.
- **n_2** : Nombre des boîtes retenues à la seconde dilution.
- **d** : Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

I.2.1.2. Recherche de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman

En cas de présence de Staphylocoques dans le milieu de Baird Parker (présence de colonies noires caractéristiques), un ensemencement est effectué sur le milieu Chapman. Ensuite, ils ont été incubés à 37 °C pendant 24 à 48 heures afin de détecter la présence de *Staphylococcus aureus*. Les colonies de couleur jaune doré qui sont apparues ont été transférées sur le même milieu de culture pour obtenir des colonies pures.

I.2.2. Identification biochimique

Afin de réaliser une identification biochimique de 9 souches isolées, la coloration de Gram, le test de catalase, de coagulase, d'oxydase et d'hémolyse ont été effectués.

I.2.2.1. Coloration de Gram : Il s'agit d'une technique de coloration utilisée pour mettre en lumière les caractéristiques de la paroi bactérienne et utilisée afin de différencier et classer les bactéries en bactéries à Gram positif ou négatif. Cette méthode a été développée de manière empirique par le bactériologiste danois GRAM en 1884.

Pour cela, un frottis est préparé à partir d'une culture bactérienne jeune de 24 heures. Le frottis est ensuite coloré avec une solution de violet de gentiane, également connu sous le nom de cristal violet et laisser agir pendant une minute avant de rincer à l'eau. Appliquer le Lugol et le laisser reposer pendant une minute, puis rincer avec de l'eau. La décoloration à l'alcool est effectuée rapidement, en seulement 15 secondes, puis suivie d'un rinçage. En dernier lieu, le frottis est soumis à une recoloration à la fushine pendant une minute. Les lames colorées sont examinées à l'objectif d'un grossissement de 10x100, en utilisant une immersion.

I.2.2.2. Test de Catalase : Les bactéries à métabolisme respiratoire produisent abondamment une enzyme qui a la capacité de décomposer les peroxydes d'hydrogène H₂O₂. Cette enzyme peut transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Quelques colonies provenant d'une culture pure de 24 heures des souches sont mises au contact avec quelques gouttes de l'eau oxygénée sur une lame stérile. Si des bulles d'air apparaissent immédiatement, cela indique une réaction positive à la catalase.

I.2.2.3. Test de coagulase : Le test de coagulase permet de distinguer les souches de *Staphylococcus aureus* des autres staphylocoques qui sont coagulase négative. L'enzyme coagulase est responsable de la coagulation du plasma en transformant le fibrinogène en fibrine.

Pour cela, une colonie pure de *S. aureus* estensemencée dans 5 ml de bouillon cœur-cerveau et de l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures. Ensuite, dans un tube stérile à hémolyse, mélanger 0,5 ml de plasma de cheval avec 0,1 ml de la culture en bouillon des souches. Le mélange est ensuite incubé à une température de 37°C. Évaluer le test de coagulase après 4 et 24 heures. Lorsqu'un caillou est présent dans le plasma, cela signifie que la bactérie est dotée d'une coagulase.

I.2.2.4. Test oxydase : Repose sur la détection de l'enzyme cytochrome c oxydase, qui se trouve dans certaines bactéries aérobies. Cette enzyme joue un rôle dans la chaîne respiratoire en transférant des électrons à l'oxygène moléculaire (O₂), ce qui conduit à la formation d'eau.

Pour ce technique, il est recommandé de prélever une colonie fraîche en utilisant un bâtonnet ou une anse non métallique, puis déposer la colonie sur une bandelette oxydase ou sur un papier filtre imbibé du réactif et observez attentivement le changement de couleur dans un délai de 10 à 30 secondes. Un résultat est positif si une coloration violet est obtenue révélant la présence de l'oxydase et vice versa.

I.2.2.5. Test de l'hémolyse : La toxine appelée hémolysine est cruciale dans la capacité pathogène de *Staphylococcus aureus* car elle provoque la destruction des globules rouges. En milieu clinique, le test d'hémolyse sur gélose au sang est un critère de sélection essentiel.

Pour réaliser cette technique, 250 ml de gélose nutritive ont été mélangés avec 5 ml de sang de mouton. Des cultures de jeunes *S. aureus* ont été transférées sur des boîtes de gélose au sang à 5% et l'ensemencement est réalisé en stries la surface de la gélose, puis les boîtes sont incubées à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures. La présence d'un halo caractéristique à la périphérie de chaque zoneensemencée révèle le pouvoir hémolytique.

I.2.3. Conservation

Toutes les souches pures et identifiées sont conservées à court terme et à long terme.

I.2.3.1. Conservation à court terme sur gélose inclinée : Après avoirensemencé les tubes et les avoir placés dans une étuve à 37°C pendant 24 heures, ils sont ensuite conservés au réfrigérateur à 4°C pendant maximum 20 jours (**Figure 09**).



Figure 09 : Gélose nutritive inclinée stérile

I.2.3.2. Conservation à longue terme avec glycérol : Il s'agit d'une méthode de préservation qui implique l'ajout de glycérol aux suspensions bactériennes. Le glycérol est un cryoprotecteur qui aide à minimiser les dommages cellulaires causés par le refroidissement.

Nous avonsensemencé les souches à partir d'une suspension jeune dans 3ml de BHIB. Puis, incubé à 37°C pendant 18 à 24heures. Après l'incubation, 1ml de la suspension a été prélevé et transféré dans un tube Eppendorf. La centrifugation a été ensuite effectuée 13200 rpm pendant 2min. Le surnageant a été éliminé, et le culot a été conservé. Par la suite, nous avons ajouté 500 µL de BHIB stérile et 500 µL de glycérol dilué à 50%, puis la suspension obtenue a été stockée au congélateur (**Figure 10**)



Figure 10 : Les étapes de la conservation à long terme (A) : suspension bactérienne dans les tube Eppendorf./ (B) : centrifugation les tubes à 13 200 rpm pendant 2min./ (C) : élimination le surnageant et conservation le culot./ (D) : l'ajoute de BHIB stérile et glycérol) 50%./ (E) : suspension final

Partie 02 :

***Evaluation de la capacité de
formation de biofilm
Staphylococcus aureus***

Partie 02 : Evaluation de la capacité de formation de biofilm par *Staphylococcus aureus*

Pour évaluer la capacité de formation de biofilm des souches étudiées, les techniques suivantes sont appliquées :

II.1. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)

Il est possible d'utiliser la culture sur gélose Rouge Congo pour identifier les souches qui produisent du slime. Les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intracellulaire Adhésine) se caractérisent par des colonies noires à la surface rugueuse, tandis que les souches PIA négatives présentent des colonies rouges à la surface lisse.

Le mélange a été préparé en combinant 0,8 g de rouge Congo (Sigma) et 50 g de saccharose avec 1000 ml de Bouillon cœur cervelle et 10 g d'Agar, puis stérilisé à 121°C pendant 15 minutes. Ensuite, le milieu a été inoculé avec une boucle de suspension des souches testées (une colonie dans 5 ml de bouillon nutritive). La lecture des résultats a été effectuée après une nuit d'incubation à 37°C, suivie de 24 heures supplémentaires à température ambiante.

II.2. Evaluation de la formation de biofilm par la méthode de microplaques de titration à 96 puits en polystyrène

II.2.1. Préparation de la suspension bactérienne : Des colonies isolées ont été prélevé de gélose nutritive à l'aide d'une anse de platine stérile, puis transférer dans 5ml de bouillon cœur cervelle (BHIB) stérile pour chaque souche à tester, cette étape permet d'obtenir une culture fraîche en phase exponentielle adaptée à l'étude de la formation du biofilm. Chaque suspension a été ajustée à une densité de 10^8 UFC/ml. La densité optique a été mesurée à 596nm à l'aide d'un spectrophotomètre, puis ajusté une DO comprise entre 0,08 et 0,1.

II.2.2. Protocol de formation de biofilm : Pour évaluer la capacité de formation de biofilm des souches bactériennes étudiées chaque puits d'une plaque de titration à 96 puits en polystyrène a été rempli avec 200 μ L de bouillon cœur-cerveau (BHIB) à 0,5% glucose. Ensuite, 10 μ L d'une culture bactérienne fraîchement préparée et ajustée a une densité d'environ 10^8 UFC/ml ($DO_{596nm} = 0,08$ à $0,1$) ont étéensemencé dans chaque puits. Les plaques ont été incubées à température ambiante pendant différentes périodes de contact : 30 minutes, 1heure, 1heure 30

minutes, 2heures, 2heures 30 minute, 3heures, et 24 heures. Ces temps d'incubation variables permettent d'évaluer la cinétique de la formation du biofilm. Les puits du contrôle négatif sont ensemencés avec le bouillon stérile à 0,25% glucose. Après les différentes périodes d'incubation, les cultures non adhérentes ont été éliminées délicatement de chaque puits. Les puits ont ensuite été lavés deux fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes. La plaque a été ensuite laissée séchée à l'air libre pendant 15 min. Par la suite, chaque puits a été rempli avec 250 μ L de cristal violet à 1%, et laissé en contact pendant 15 min. L'excès du colorant a été éliminé en rinçant plusieurs fois les puits avec l'eau distillée, puis la plaque a de nouveau été séchée à l'air libre pendant 15 min. Enfin, 200 μ L d'acide acétique à 33% a été ajouté à chaque puits afin de solubiliser le colorant retenu par les biofilms, pendant 30 min (**Figure 11**). La densité optique a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Elisa) à une longueur d'onde de 595nm, afin d'évaluer quantitativement la biomasse formée.

La classification des résultats obtenus est basée sur le DO du contrôle négatif. Les souches ont été regroupées de la manière suivante :

- $DO_{596} \leq 0,5$: non formatrice de biofilm.
- $0,5 < DO_{596} \leq 1,5$: faiblement formatrice de biofilm.
- $1,5 < DO_{596} \leq 3$: modérément formatrice de biofilm.
- $DO_{596} > 3$: fortement formatrice de biofilm.

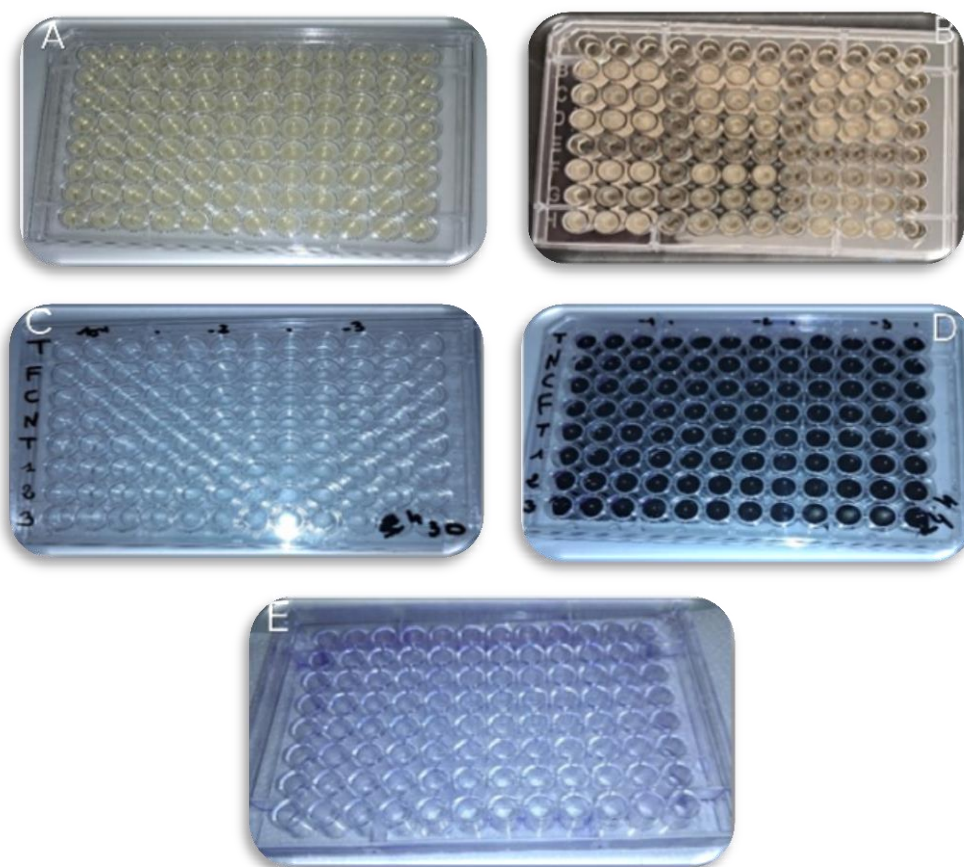


Figure 11 : Détection et lecture de biofilm par méthode de microplaques de titration à 96 puits : (A) : rempli les puits par la suspension et BHIB/ (B) : incubation à température ambiante pendant différentes périodes de contact. / (C) : rinçage par l'eau distillée. / (D) : coloration par cristal violet. / (E) : L'ajoute d'acide acétique à 33%.

II.3. Evaluation de la formation de biofilm sur surface en verre

II.3.1. Préparation les lames en verre : Avant l'évaluation de la formation de biofilm, les lames en verre ont été soumises à une procédure de nettoyage rigoureuse afin d'éliminer toute impureté résiduelle et de standardiser la surface. Dans un premier temps, les lames ont été rincées avec de l'acétone pure, puis immergées dans une solution de soude (NaOH) à 1% pendant 1 heure pour éliminer les matières organiques et rendre la surface plus hydrophile. Après ce traitement, les lames ont été soigneusement rincées avec de l'eau distillée puis séchées à l'air libre. Elles ont ensuite été lavées avec de l'alcool à 70% pour assurer une désinfection supplémentaire, suivie d'un rinçage final à l'eau distillée stérile. Enfin, les lames ont été séchées dans un étuve à 121°C pendant 20 min afin d'assurer une stérilisation complète avant leur utilisation dans les tests de formation de biofilm.

III.3.2. Préparation de la suspension bactérienne : La suspension bactérienne des souches étudiées a été préparée comme décrit précédemment.

III.3.3. Protocole de formation de biofilm : Après préparation et stérilisation, les lames en verre ont été placées individuellement dans les boîtes. Dans chaque boîte de pétri stérile, un volume de la suspension bactérienne a été ajouté. L'incubation a été réalisée à température ambiante pendant différentes durées (30 min, 1h, 1h 30min, 2h, 2h 30min, 3h et 24h) afin d'évaluer la cinétique d'adhésion bactérienne. A l'issue de chaque temps d'incubation, les lames ont été rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules non adhérentes. La fixation des biofilms a ensuite été réalisée par incubation des lames à 80°C pendant 30min. Les lames ont ensuite été immergées dans une solution de cristal violet à 1% pendant 15 min, puis soigneusement rincées à l'eau distillée et séchées à l'air libre. Pour quantifier la biomasse fixée, chaque lame a été placée dans une boîte de pétri contenant 5 ml d'acide acétique à 30%, et agité pendant 30 min afin de solubiliser le colorant. La densité optique de la solution obtenue a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 596nm, ce qui permet une estimation quantitative de la formation du biofilm (**Figure12**).

La classification des résultats obtenus est basée sur le DO du contrôle négatif comme décrit précédemment.

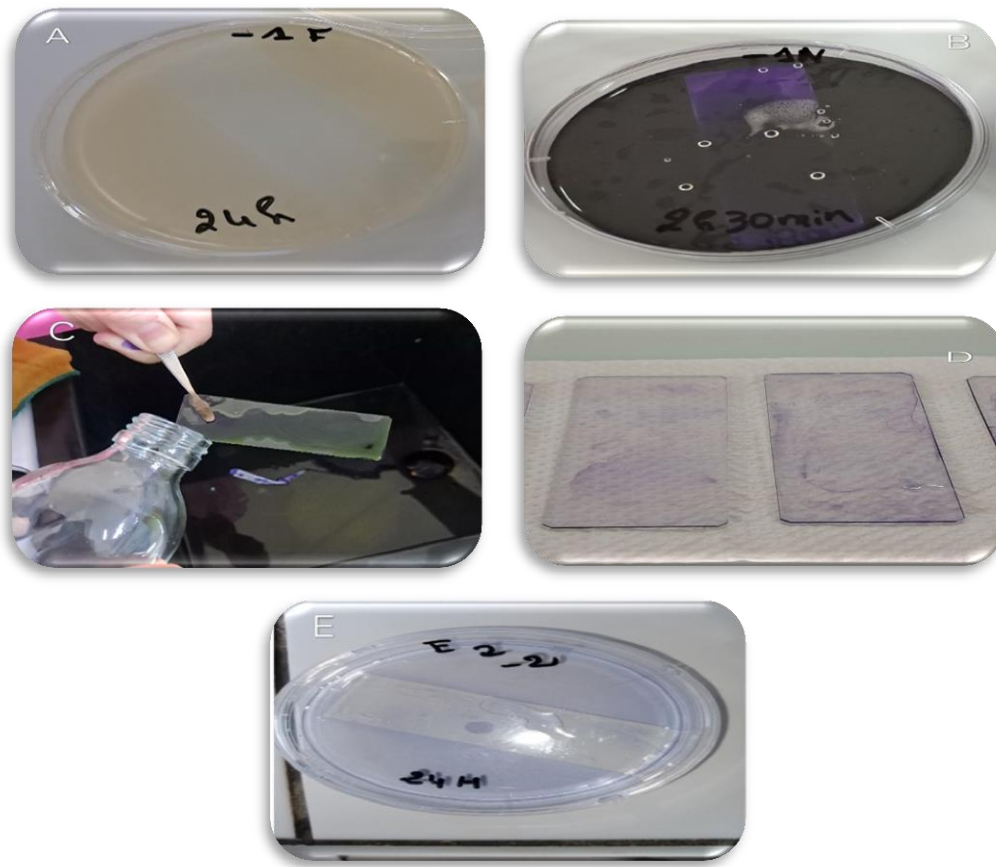


Figure 12 : Evaluation de la formation de biofilm sur les surfaces en verre.

(A) : l'incubation des lames à température ambiante pendant différentes durées. / (B) : coloration avec cristal violet. / (C) : rinçage avec l'eau distillé. / (D) : séchage à l'aire libre. / (E) : ajoute l'acide acétique

Partie III :
Résultats et discussion

Partie 01 :

***Isolement et identification de
Staphylococcus aureus***

Partie 01 : Isolement et identification de *Staphylococcus aureus*

Un total de 03 échantillons de poudre de lait infantile a été étudié dans le but de rechercher, dénombrer et isoler *Staphylococcus aureus* d'une part. Evaluation sa capacité à former biofilm, d'autre part.

I.1. Identification microbiologique

I.1.1. Sur le milieu Baird-Parker : Après l'ensemencement sur le milieu Baird-Parker et l'incubation à 37°C pendant 24h, nous avons obtenus des colonies typiques de *Staphylococcus aureus* apparaissent noires, brillantes, souvent entourées d'un halo clair dû à l'activité de la lécithinase (**Figure 13**). Après dénombrement de *Staphylococcus aureus* les résultats ont montré que la plupart des échantillons analysés révèlent la présence de cette espèce. Tous les échantillons contiennent une charge variable (**Tableau 05**). Le nombre de bactérie isolée dans échantillon 01 est $37,27 \times 10^3$ ufc/g alors que l'échantillon 02 présente une charge de *S. aureus* légèrement supérieure à l'échantillon 01 de l'ordre $40,090 \times 10^3$ ufc/g. Pour l'échantillon 03 nous avons obtenu une valeur inférieure des deux échantillons, soit $22,45 \times 10^3$ ufc/g.

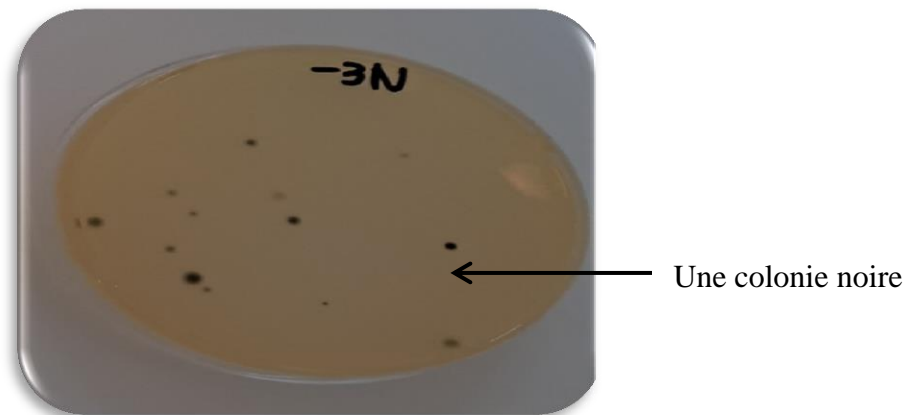


Figure 13 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur le milieu Baird-Parker.

Tableau 05 : Résultats du dénombrement de *Staphylococcus aureus* à partir des 03 échantillons étudiés :

Echantillons	Valeur N (ufc/g)
Echantillon 01	$37,27 \times 10^3$
Echantillon 02	$40,090 \times 10^3$
Echantillon 03	$22,45 \times 10^3$

I.1.2. Sur milieu le Chapman : Après l'incubation, nous avons détecté la présence des colonies de couleur jaune caractéristiques de *S. aureus* (**Figure 14**).



Figure 14 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur Chapman

I.2. Identification biochimique

I.2.1. Coloration de Gram : un total de 09 souches a été soumise à la coloration de Gram, et les souches étudiées ont donné après coloration des bactéries sous forme de Cocci regroupées en grappes de raisin colorées en violet indiquant que les souches étudiées sont des souches à Gram positif (**Figure 15**).

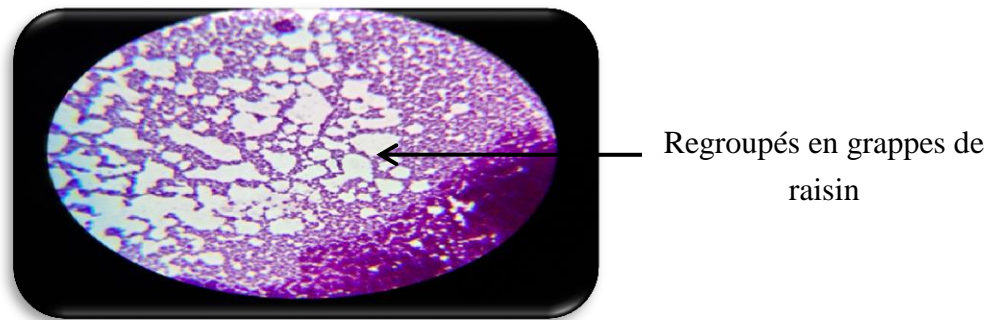


Figure 15 : Coloration de Gram de *Staphylococcus aureus* sous microscope optique (Gx100)

I.2.2. Test catalase : Le total des souches soumises au test de catalase ont montré un résultat positif avec formation des bulles d'air (**Figure 16**).

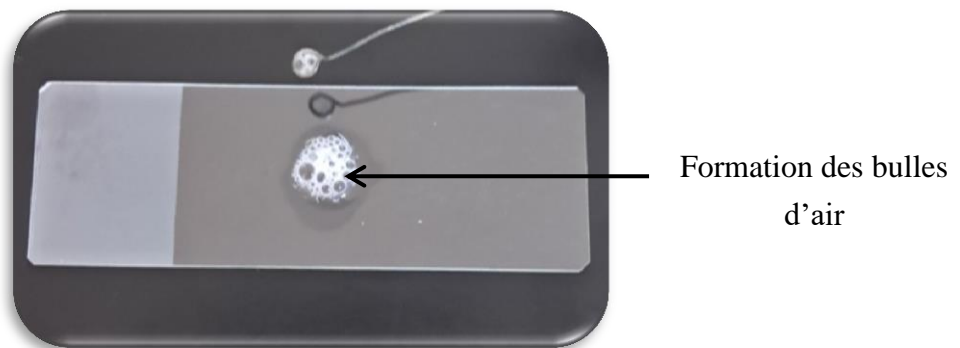


Figure 16 : Test catalase positive de *S. aureus*.

I.2.3. Test coagulase : Après le mélange du plasma de cheval avec la suspension bactérienne et l'incubation à 37°C pendant 4 et 24h, nous avons obtenu la formation d'un caillou (**Figure 17**), cela signifie que la bactérie est dotée d'une coagulase.

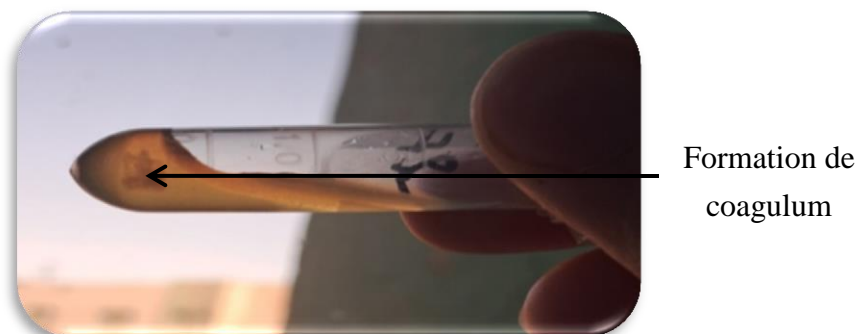


Figure 17 : Test coagulase positive de *S. aureus*.

I.2.4. Test d'oxydase : Quand nous avons mis en contact la colonie avec le disque d'oxydase, nous avons observé l'absence de coloration indiquant que les souches testées de *S. aureus* ne produisent pas l'enzyme cytochrome c oxydase (**figure 18**).



Figure 18 : Test oxydase de *S. aureus*

I.2.5. Test de l'hémolyse : Après l'ensemencement sur la gélose au sang et l'incubation à 37°C pendant 24h, nous avons observé la présence d'un halo caractéristique à la périphérie de chaque zone ensemencée révèle le pouvoir hémolytique (**Figure 19**).

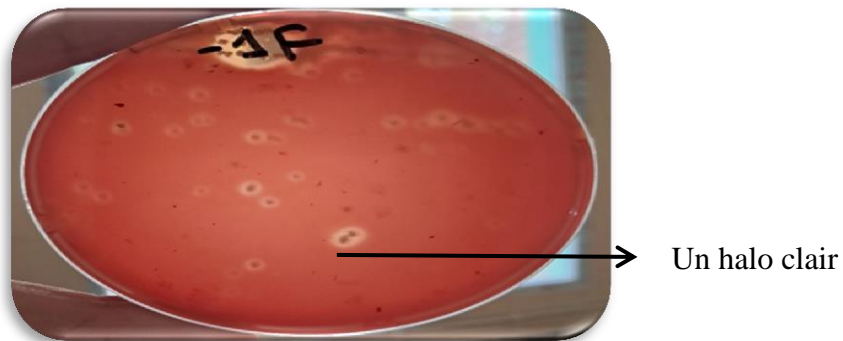


Figure 19 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur gélose au sang

Partie 02 :

***Evaluation de la capacité de
formation de biofilm de
Staphylococcus aureus***

Partie 02 : Evaluation de la capacité de formation de biofilm de *Staphylococcus aureus*

II.1. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)

Après l'ensemencement sur milieu de culture de Rouge Congo Agar et l'incubation à 37°C, suivie de 24 heures supplémentaires à température ambiante, nous avons observé que toutes les souches testées produisent du slime, formant des colonies noires ou presque noires (Un total de 9 souches présente un résultat positif) (**Figure 20**).

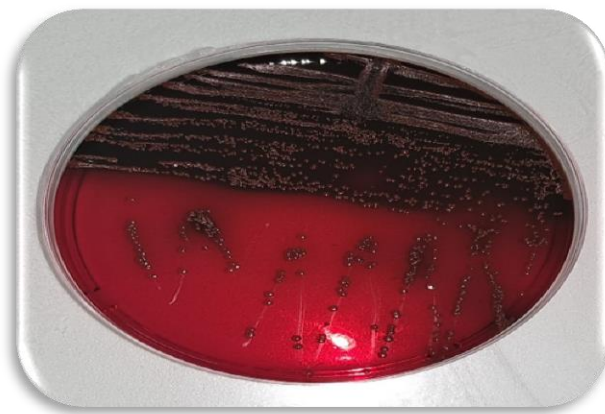


Figure 20 : *S. aureus* sur RCA

II.2. Méthode de microplaques de titration à 96 puits en polystyrène

La mesure de la densité du biofilm formé sur les microplaques de 96 puits a été réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Elisa). Après la solubilisation du cristal violet fixé au biofilm par l'ajout de l'acide acétique à 33%, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 596 nm. Les valeurs obtenues reflètent la biomasse du biofilm formé.

Les résultats de nos expériences ont montré que, les densités optiques de neuf souches de *staphylococcus aureus* mesurées à 30 min jusqu'à 24h d'incubation indiquent une faible capacité de formation de biofilm. La classification des résultats obtenus est basée sur la DO du contrôle négatif, servant de référence pour déterminer le seuil de formation de biofilm.

L'évolution des densités optiques au cours du temps montre une augmentation progressive de la formation de biofilm pour les trois souches. À court terme, après 30 minutes, les valeurs restent faibles et proches : 0,057 pour la souche 1, 0,058 pour la souche 2 et 0,062 pour la souche 3. Après 1 heure, on observe une légère augmentation avec 0,101 (souche 1), 0,116 (souche 2) et 0,105 (souche 3). À 3 heures, les densités optiques sont relativement similaires : 0,142 (souche 1), 0,141 (souche 2) et 0,146 (souche 3), traduisant une activité comparable. En revanche, après 24 heures, une différence marquée apparaît : la souche 2 atteint une densité optique de 0,318, contre 0,251 pour la souche 3 et 0,229 pour la souche 1. Ces résultats indiquent que la souche 2 présente une capacité plus élevée à former un biofilm mature sur microplaque, suggérant un potentiel d'adhérence plus important que les deux autres souches.

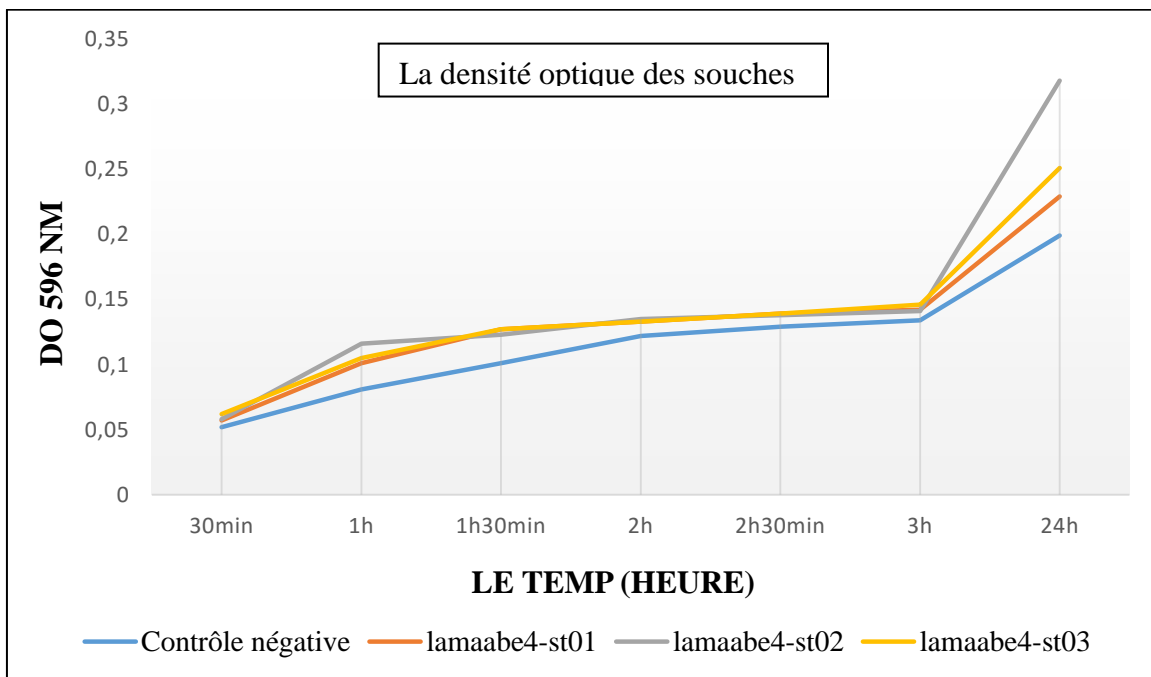


Figure 21 : Evaluation de la formation de biofilm des *Staphylococcus aureus* isolées de l'échantillon 1 en fonction du temps.

Pour l'échantillon 2, la formation du biofilm évolue progressivement chez les trois souches étudiées. À 30 minutes, les densités optiques restent faibles : 0,062 pour la souche 1, 0,054 pour la souche 2 et 0,061 pour la souche 3. Après 1 heure, une augmentation modérée est observée avec des valeurs de 0,111 (souche 1), 0,109 (souche 2) et 0,098 (souche 3). À 3 heures, les trois souches présentent des niveaux similaires : 0,146 (souche 1), 0,144 (souche 2) et 0,147 (souche 3), traduisant une activité équivalente de formation de biofilm. Après 24 heures, on observe un renforcement net de cette activité : la souche 2 présente la valeur la plus élevée avec 0,315, suivie de la souche 1 avec 0,304, tandis que la souche 3 atteint 0,265. Ces données

suggèrent que les souches 1 et 2 développent un biofilm plus dense à long terme, la souche 2 étant légèrement dominante.

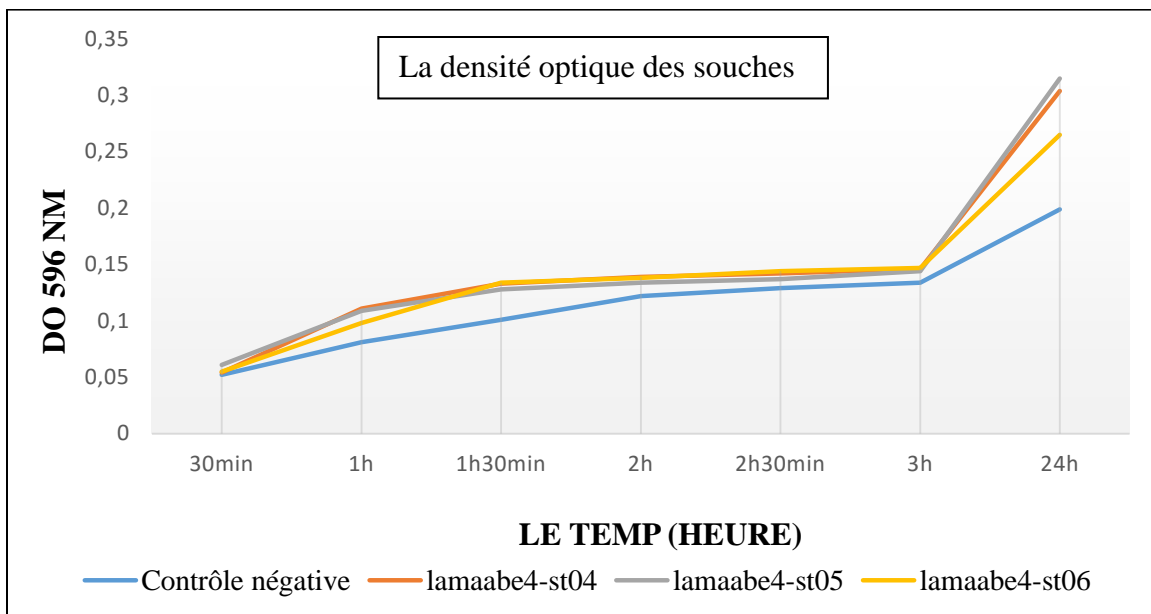


Figure 22 : Evaluation de la formation de biofilm des *Staphylococcus aureus* isolées de l'échantillon 2 en fonction du temps.

Pour l'échantillon 3, la formation du biofilm par les trois souches suit une évolution progressive au cours du temps. À 30 minutes, les densités optiques sont faibles et proches : 0,060 pour la souche 1, 0,054 pour la souche 2, et 0,053 pour la souche 3. Après 1 heure, une légère augmentation est observée, avec 0,097 pour la souche 1, 0,105 pour la souche 2, et 0,117 pour la souche 3, qui se démarque légèrement. À 3 heures, les valeurs restent proches, témoignant d'une activité similaire : 0,143 (souche 1), 0,147 (souche 2) et 0,141 (souche 3). Après 24 heures, les écarts deviennent plus significatifs : la souche 3 présente la densité optique la plus élevée avec 0,325, suivie de la souche 2 (0,315), puis de la souche 1 (0,270). Ces résultats indiquent une forte capacité de formation de biofilm à long terme, particulièrement pour les souches 2 et 3, la souche 3 étant la plus performante dans cet échantillon.

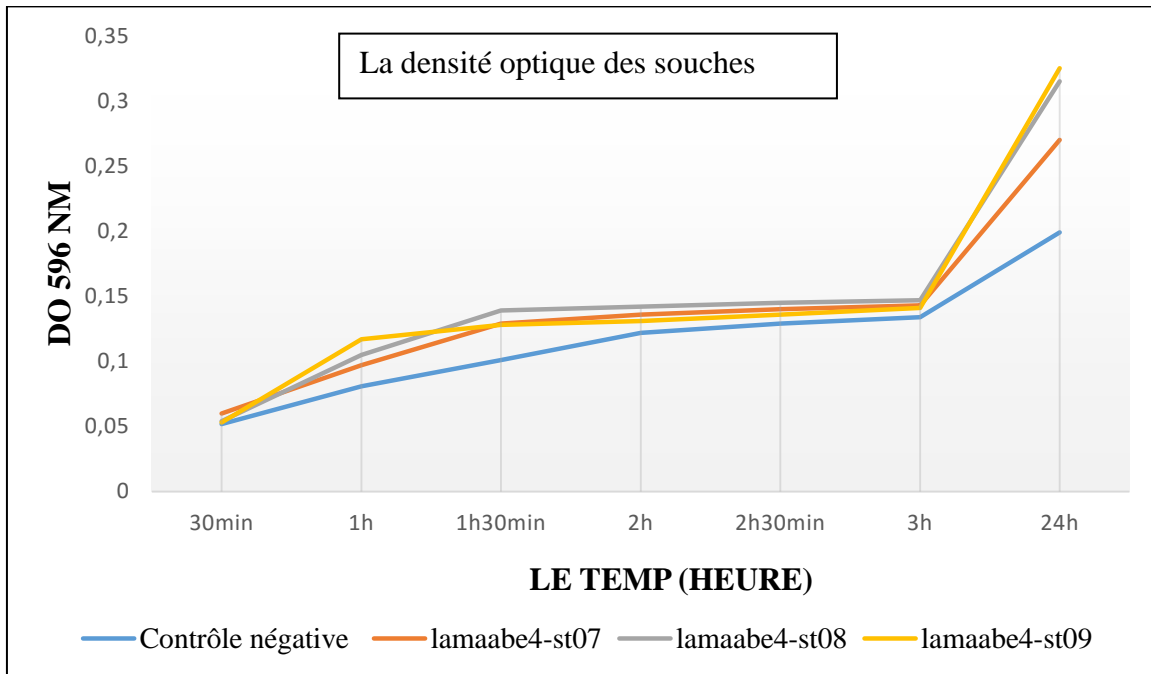


Figure 23 : Evaluation de la formation de biofilm des *Staphylococcus aureus* isolées de l'échantillon 3 en fonction du temps.

Les trois échantillons présentent une évolution similaire de la formation de biofilm, avec une augmentation progressive des densités optiques sur 24 heures. Toutefois, à long terme, les capacités diffèrent selon les souches. La souche 2 de l'échantillon 1 (DO = 0,318), la souche 2 de l'échantillon 3 (0,315) et surtout la souche 3 de l'échantillon 3 (0,325) montrent une capacité nettement supérieure à former un biofilm mature. Cela suggère que certaines souches isolées, en particulier dans l'échantillon 3, présentent un potentiel d'adhésion et de persistance plus élevé, ce qui pourrait être préoccupant dans le contexte de la contamination des poudres de lait infantile.

II.3. Evaluation la formation de biofilm sur les surfaces en verre

La lecture de la densité du biofilm formé sur les surfaces en verre a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre. Après solubilisation du cristal violet fixé au biofilm par l'ajout de l'acide acétique à 30%, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 596 nm. Les valeurs obtenues reflètent la biomasse du biofilm formé.

Nos résultats indiquent qu'entre 30min et 24 heures d'incubation, le total des souches testées présentent une faible capacité de formation de biofilm sur les surfaces de verre. La classification de ces résultats obtenus est basée sur la DO du contrôle négatif, pour évaluer la capacité des souches à former un biofilm.

Pour les trois échantillons : une adhésion initiale faible, une montée en puissance vers un biofilm modéré en 1 h, puis une structuration forte à 3 h, et enfin une maturité vers un biofilm très fort à 24 h. À 24 h, l'échantillon 3 présente la densité optique la plus élevée (0,73), indiquant une capacité légèrement supérieure à former un biofilm mature sur verre. Les échantillons 2 (0,72) et 1 (0,68) montrent également une formation robuste, mais avec un petit décalage.

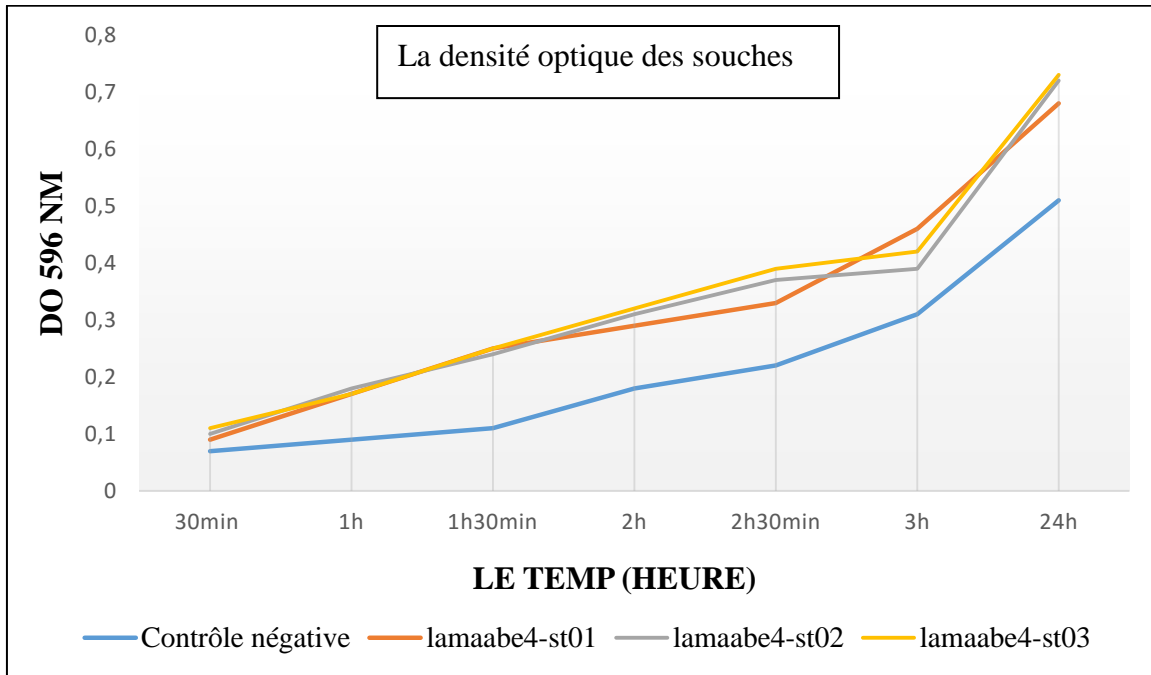


Figure 24 : La densité optique de biofilm des souches des échantillons 1, 2 et 3 en fonction du temps.

Discussion :

L'évaluation microbiologique est indispensable pour assurer la sécurité alimentaire, en tenant compte des conditions de stockage, des comportements alimentaires, et des particularités du produit. Le contrôle microbiologique est essentiel pour garantir que les produits conservent leur qualité commerciale et leur salubrité durant toute leur période de stockage.

Pour contrôler leur qualité, des échantillons de lait pour bébés ont été analysés en isolant, identifiant et dénombrant les *Staphylococcus aureus* tout en évaluant sa capacité de formation de biofilm.

Trois marques de lait infantile ont été analysées. Les résultats du dénombrement obtenus ont montré que l'échantillon 02 contenant la plus grande charge avec une valeur de $40,090 \times 10^3$ ufc/g, tandis que l'échantillon 01 et l'échantillon 03 ont montré de valeurs inférieures de celle de l'échantillon 01, $37,27 \times 10^3$ et $22,45 \times 10^3$, respectivement.

Après isolement et identification biochimique incluant coloration de Gram, test de catalase, test d'oxydase, test d'hémolyse et de coagulase, un total de 9 souches a été identifiée comme étant appartient à l'espèce *Staphylococcus aureus*. La présence de *Staphylococcus aureus* à coagulase positive dans un produit destiné à une catégorie sensible d'individus à savoir les nourrissons dont leurs systèmes immunitaires ne sont pas assez développés est très inquiétant.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Umoh et son équipe (1985)** qu'ont démontrés dans leur étude sur 114 échantillons de préparations pour nourrissons prélevés auprès de mères allaitantes contenaient des staphylocoques viables, avec un nombre moyen le plus élevé de $1,0 \times 10^2$ ufc g⁻¹, provenant d'échantillons prélevés le jour de l'ouverture de la boîte. Le nombre total moyen de bactéries aérobies était de $2,6 \times 10^3$ ufc g⁻¹.

Xin Wang et ses collaborateurs (2012) ont trouvé les mêmes résultats que nous sur un total de 367 échantillons d'aliments pour nourrissons, dont 143 échantillons de lait en poudre pour nourrissons (LPN) et 224 échantillons de céréales de riz pour nourrissons (CRI), ont été collectés dans la province du Shaanxi en Chine entre juillet et août 2010 et analysés pour *S. aureus*. Leurs résultats indiquent que les LPN et CRI de la province du Shaanxi étaient contaminés par *S. aureus*. La présence de souches de *S. aureus* dans ces aliments pour nourrissons constitue une menace potentielle pour la santé des nourrissons.

De même, **Tahoun et Abdelfatah en 2015** ont fait des recherches en évaluant l'état microbiologique de poudre de lait infantile et le lait maternel. Les résultats de votre étude ont révélé que 27 (54 %) des échantillons de lait infantile réhydraté examinés étaient contaminés par différents microbes, avec une numération moyenne de $6,8 \times 10^3 \pm 2 \times 10^2$ UFC/ml. Dans le cas des échantillons de lait maternel exprimé, 78 % étaient contaminés, avec une numération moyenne de $3,3 \times 10^5$ UFC/ml. *Staphylococcus epidermidis* était le micro-organisme le plus répandu dans les deux types de lait, présent dans 10 % et 30 % des échantillons de préparations pour nourrissons et de lait maternel, respectivement. D'autres microbes, notamment des staphylocoques, des entérobactéries, des entérocoques, des levures et des moisissures, ont également été détectés avec des pourcentages variables.

Un travail de **Palilu et ses collaborateurs (2017)** ont fait le même objectif basé sur la recherche et de détection la présence de *Staphylococcus sp* dans le lait en poudre pour nourrissons. Quatorze échantillons du marché ont été utilisés pour l'isolement bactérien. L'isolement a été réalisé par une étape d'enrichissement sur bouillon BHI, puis sur gélose Baird-Parker, qui produit une colonie typique. La colonie est ensuite prélevée et cultivée sur gélose au mannitol-sel, puis soumise à une coloration de Gram, un dosage de la coagulase et des tests de fermentation. L'étape de confirmation a été réalisée par API-Staph, qui a permis l'identification de *Staphylococcus hemoliticus*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, avec un pourcentage d'identité compris entre 65,9 et 97,7 %.

La deuxième partie de travail consiste à évaluer la capacité des souches isolées de poudre de lait infantile à former le biofilm pour cela en mise en point 03 méthodes : une méthode qualitative par l'ensemencement sur rouge Congo, et deux méthodes quantitative par la méthode des microplaques en polystyrène à 96 puits, et une surface solide le verre parce que le verre est utilisé pour la fabrication des biberons.

Les 9 souches de *Staphylococcus aureus* isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former le biofilm par techniques de Rouge Congo Agar (RCA).

Le slime est décrit comme une substance polymérique extracellulaire, aussi appelée exopolysaccharides (EPS). Dans le milieu RCA, les souches qui expriment le PIA (polysaccharide intercellulaire adhésion) produisent des colonies noires présentant une texture rugueuse, tandis

que les souches PIA négatif génèrent des colonies de teinte rouge et à surface lisse. Ces dernières interagissent directement avec certains polysaccharides bactériens pour former un biofilm et donner naissance à des colonies noires, à la différence des colonies non productrices qui demeurent rouges (**Kara Terki, 2014 ; Wadher, 2013**).

Krukowski et son équipe (2008) ont indiqué que parmi les 59 isolats de *S. aureus* prélevés de la sécrétion inflammatoire des glandes mammaires des vaches, 42,37 % produisent du Slime tandis que 57,68 % ne le font pas.

Gundogan et ses collaborateurs (2006), ont constaté que 58 (52,7 %) des 110 souches de *S. aureus* isolées à partir de lait cru, lait pasteurisé et glaces des échantillons étaient productrices de Slime.

Selon **Ciftci et son équipe (2009)**, sur les 59 souches de *S. aureus* prélevées dans les échantillons de lait, seulement 22 d'entre elles, soit 37,2%, ont produit du slime.

Achek et ses collègue (2020), qui ont détecté un taux de 100% pour des isolats provenant d'aliments. **Vasudevan et son équipe (2003)** ont signalé que 32 souches de *S. aureus* (91,4 %) isolées de mammites bovines ont été productrices de Slime.

Pour les microplaques en polystyrène à 96 puits, la densité du biofilm formé a été mesurée par un lecteur de microplaque. Le cristal violet a été appliqué pour la coloration du biofilm, suivi d'une dissolution dans l'acide acétique à 33 %. A une longueur d'onde de 596 nm, l'absorbance a été mesurée pour refléter la biomasse du biofilm. Plusieurs mesures ont été réalisées à différents moments : une demi-heure, une heure, une heure et demi, deux heures, deux heures et demi, ainsi que vingt-quatre heures. Les résultats ont révélé une faible formation de biofilm.

De nombreuses recherches précédentes attestent d'une grande disparité entre les souches, avec une prédominance de producteurs de biofilm faibles à modérés en milieu statique sur microplaques. Par exemple, selon **Xu et ses collaborateurs (2016)**, 74,3% des souches produisent un biofilm léger, 23,3% modéré tandis que seulement 2,3% le font de manière intense. Cette classification est fortement liée à la souche considérée et à la technique de mesure utilisée.

En ce qui concerne les souches de lait isolées, plusieurs études mettent en évidence une présence significative de producteurs faibles à modérés. Selon **Costa et son équipe (2018)**, 100 % des souches de lait cru, pasteurisé et UHT ont formé un biofilm sur des plaques de polystyrène, bien que la majorité se situe dans une catégorie de densité faible à modérée. Selon le seuil

employé, **Costa, Lira & Aragão (2019)** ont noté que 81,8% des isolats de lait cru, et 100% de ceux du lait pasteurisé et UHT formaient un biofilm. **Frontières et ses collègues (2019)** ont aussi mis en évidence la présence de gènes tels que *icaA*, *icaD*, *eno*, *clfA/B* et *fnbA/B* dans des isolats de lait pasteurisé, tous étroitement associés au biofilm. Ils soulignent ainsi le potentiel latent de formation (**Wu et al., 2019**).

En comparaison, **Singh et al. (2017)** ont démontré que l'incorporation de 3% de NaCl et 0,5% de glucose dans le milieu stimule la création de biofilm chez *S. aureus* sur microplaques. Selon **Grossman et ses collaborateurs (2021)**, un stress osmotique ou nutritionnel influence l'expression des régulateurs *agr* et *sarA*, qui ont une importance cruciale dans la dynamique du biofilm.

L'évaluation de la formation de biofilm a été réalisée sur des surfaces en verre à divers intervalles : trente minutes, une heure, une heure et demie, deux heures, deux heures et demie, trois heures, et vingt-quatre heures. Les données ont révélé une capacité de formation de biofilm qui est faible mais observable. Ces observations laissent à penser que le verre utilisé dans la fabrication des biberons, s'il est exposé à température ambiante pendant une période prolongée après préparation du lait, peut constituer un support favorable au développement de biofilms bactériens.

La surface en verre, réputée pour sa nature hydrophile, facilite l'adhérence initiale des bactéries. Cependant, d'après **Grossman et son équipe (2021)**, une simple adhésion initiale ne garantit pas un biofilm mature : sans des stimulateurs (glucose, NaCl, agitation), le processus de maturation demeure restreint. Donc, nos résultats même s'ils présentent quelques valeurs au-delà de 0,5 démontrent des souches en attachement partiel, plutôt que d'incorporer une matrice de protection complexe.

L'ensemble de ces techniques a permis de développer une approche intégrée pour détecter *S. aureus* et évaluer ses capacités de formation de biofilm sous différentes conditions et sur différentes surfaces, essentiel pour comprendre sa pathogénicité potentielle dans les produits laitiers pour nourrissons.

Conclusion

Le lait maternel est considéré comme le meilleur aliment pour les nourrissons. Cependant, dans certains cas, le nourrisson doit rester éloigné de sa mère et être alimenté en lait par d'autres moyens. Dans ce cas, nous avons le choix entre le lait maternel exprimé et les préparations pour nourrissons réhydratées. Le lait infantile est un élément essentiel dans l'alimentation des nourrissons, répondant aux besoins spécifiques de cette première phase de vie.

En raison de leur potentiel à transmettre des micro-organismes pathogènes aux consommateurs, le lait est un milieu idéal pour la croissance de microorganismes dont la consommation peut poser un problème pour les bébés. Ces produits industriels doivent faire l'objet d'un contrôle de qualité pour limiter tout risque.

Les analyses microbiologiques de lait infantiles ont révélé pour l'ensemble des échantillons, la présence de *Staphylococcus aureus* à coagulas positif, des bactéries les plus dangereuses pouvant provoquer des intoxications alimentaires. Nos résultats montrent que ces souches possèdent la capacité de former un biofilm. En effet, toutes les souches ont été positives au test du rouge Congo, indiquant une potentialité à produire un biofilm sur les microplaques et le verre. Ces observations soulignent un risque potentiel lié à l'utilisation des biberons en verre : si le lait infantile y est préparé et laissé à température ambiante pendant une durée prolongée, les conditions peuvent favoriser la formation d'un biofilm bactérien. Cela présente un danger pour la santé des nourrissons, notamment en cas de mauvaise conservation ou d'hygiène insuffisante. Il est donc essentiel de respecter rigoureusement les pratiques de préparation, de nettoyage et de conservation des biberons afin de limiter ce risque.

Ces résultats suggèrent que, bien que les souches soient potentiellement productrices de biofilm, les conditions environnementales influencent fortement leur expression de ce phénotype

Tous les biberons et équipements doivent être nettoyés efficacement afin de prévenir la formation de biofilm par le lait infantile et *S. aureus*.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Abisado RG., Benomar, S., Klaus, JR., Dandekar, AA., Chandler, JR. Bactérien détection de quorum et interactions des communautés microbiennes. MBIO, 2018, Vol 9 (3).
2. Achek, R., Benyahia, F., & Haddad, N. (2020). Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* isolées d'aliments : production de biofilm et résistance aux antibiotiques. *Revue Algérienne de Microbiologie*, 15(2), 45–53.
3. Agatha Derrien Université de Liège, Liège, Belgique, 2021.
4. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. (2016). Avis relatif à l'alimentation des enfants de 0 à 3 ans. Maisons-Alfort : ANSES.
5. Ahern, G. J., Hennessy, A. A., Ryan, C. A, Ross, R. P., Stanton, C. 2019. Advances in Infant Formula Science. *Annual Review of Food Science and Technology*. 10, 75-102.
6. Allaoui, F., Benbouabdellah, M., & Cherkaoui, M. (2015). Classification des laits infantiles selon les besoins nutritionnels et l'âge de l'enfant. *Revue Marocaine de Nutrition*, 18(2), 45–52.
7. Andrew, J et Schuman. 2003. A concise history of infant formula (twists and turns included). *Contemporary Pediatrics*. P : 91-103.
8. Auxpuer, M. (2014). Nutrition et immunité chez le nourrisson. Lyon : Presses Universitaires de Lyon.
9. AZZA. M. M. DEEB. AL HAWARY.I. I, I. AMAN ET DOAA M H SHAHINE, (2010). Bactériologique investigation on Milk Powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. *Journal Global vétérinaire* .04(05). p.p.424-433.
10. Baert, K., Ombecq, M., Van Winckel, M., Henry, S., Tommelein, E., & Vanhoorne, V. (2024). The viscosity- enhancing effect of carob bean gum and sodium carboxymethylcellulose when added to infant formula. *Food Science & Nutrition*, 00, 1–10.
11. Beaudry-Ferland, M. (2011). ÉTUDE SUR LE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RÉSISTANT À LA MÉTHICILLINE CHEZ LE PORC À L'ABATTOIR AU QUÉBEC, CANADA
12. Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf K., Zehnder A.J. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3973- 3977
13. Berthold, K. 2010. Drivers of Innovation in Pediatric Nutrition, Berthold, K. 2010. Drivers of Innovation in Pediatric Nutrition, Karger Publishers. P: 4. Publishers. P: 4.
14. Bevilacqua, A., Carbo, NR., Sinigaglia, M. the microbiological quality of food. 1^{ere} édition, 2017, publierieserie in food science, technologie and nutrition, pp 259

15. Beylot, G. 2009. Conseil en pédiatrie. Les laits infantiles. Actualités pharmaceutiques • n° 488
16. Bézec, K., Kurincic, M., Knauder, E., Klancnik, A., Raspor, P., Bucar, F., SmoleMozina, S. Atténuation de l'adhérence, la formation de biofilm et de détection de quorum *Campylobacter jejuni* par *Évodieruticarpa*. La recherche Phytothérapie, 2016, Vol. 30 (9), pp.1527-1532.
 17. Bhunia, A K. Foodborne Microbial Pathogens, Mechanisms and Pathogenesis. Foodborne Microbial Pathogens, 2018, pp 181-192
18. Böhning, J., Tarafder, A. K., & Bharat, T. A. M. (2024). Le rôle des molécules matricielles filamenteuses dans la formation de l'architecture et des propriétés émergentes des biofilms bactériens. *Biochem J*, 481(4), 245-263.
19. Boi, L. (2021). Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* par microscopie électronique à balayage et à transmission (Grossissement x10 000) [Photographie/Illustration]. Lyon : Institut de Microbiologie Appliquée.
20. BOURGEOIS C.M. & LEVEAU J.M, (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Sciences et technique agro-alimentaire : le contrôle microbiologique. 2ème édition. Paris. 03, p 454.
21. Boutaleb, A. (2007). Influence des facteurs physico-chimiques sur l'adhésion bactérienne aux surfaces inertes (Thèse de doctorat, Université Hassan II). Casablanca : Faculté des Sciences Ben M'Sik.
22. Bower, C. K., & Daeschel, M. A. (1999). Resistance of microorganisms in biofilms to sanitizing agents. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1141–1146. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1141>
23. Bower, C. K., McGuire, J., & Daeschel, M. A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 152–157. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10015-4](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10015-4)
24. Brackman, G., Coenye, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr. Pharm. Des*, 2015, Vol. 21, pp. 5–1
25. Bremer, P. J., Fillery, S., & McQuillan, A. J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.020>
26. Bronsard, C. (2019). Conditions de culture des staphylocoques : température, pH et tolérance au sel. *Revue de Microbiologie Appliquée*, 18(2), 45–53

27. BRUN Y. B.M., (2000). Staphylococcus. In « Précis de bactériologie clinique»,FRENEY J. R.F., HANSEN W., BOLLET C. (eds).
28. CAC (Codex Alimentarius Commission). 2007. Standards for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants; CODEX STAN 72-108; Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2007.
29. Camba, C., Walter-Lakes, B., Digal, P., Taheri-Araghi, S., &Bezryadina, A. (2024). Formation et manipulation de biofilms avec des pincettes optiques. *BiomedicalOptics Express*, 15, 1181-1191.
30. Camba, F., Morel, A., &Tani, C. (2024). Biofilms microbiens dans les environnements naturels et industriels. Paris : Éditions Biomicros.
31. Centre national interprofessionnel de l'économie laitière. (2021). Le processus de fabrication du lait pasteurisé. Paris : CNIEL.
32. Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S. 2009. International survey of *Cronobactersakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 185–188.
33. Characklis W.G., Marshall K.C. 1990. *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
34. Chauraqui, A. (2005). *Les troubles digestifs du nourrisson : causes et traitements nutritionnels*. Paris : Éditions Médicales.
35. Chitrakar, B., Zhang, M., BenuAdhikari, B., 2019. Dehydrated Foods: Are they Microbiologically Safe? *Crit Rev Food SciNutr*. 59, (17) 2734-2745.
36. Cho, T. J., Hwang, J. Y., Kim, H. W., Kim, Y. K., Il Kwon, J., Kim, Y. J., Lee, K.W., Kim, S.A., Rhee, M.S. 2019. Underestimated Risks of Infantile Infectious Disease from the Caregiver's Typical Handling Practices of Infant Formula. *Scientific Reports*, 9, 9799.
37. Ciftci A, Findik A, Onuk E. E., Savasan S .2009. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Braz. J. Microbiol*. 40:254-261.
38. Cloutier, J. (2017). *Relation Entre les Deux Souches Bactériennes Principales d'un Biofilm Dénitrifiant* (Doctoral dissertation, Institut National de la Recherche Scientifique, Canada).
39. Codex Alimentarius Commission. (1981). *Standard for infant formula (CODEX STAN 72-1981)*. Rome: FAO/WHO.
40. Cone TE. 1976. *200 Years of Feeding Infants in America*. Columbus, OH: Ross Lab.

41. Cortese, F., Scicchitano, P., Gesualdo, M., Filaninno, A., De Giorgi, E., Schettini, F., Laforgia, N., Ciccone M.M. 2016. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *PediatrNeonatal*. 57, 265-73.
42. Costa, M. C., Lira, T. S., &Aragão, G. M. F. (2018). Formation de biofilm par des isolats de *Staphylococcus aureus* provenant de lait cru, pasteurisé et UHT. *Journal of Dairy Science and Technology*, 98(7), 3214–3223. <https://doi.org/10.3168/jdst.2018-0123>
43. Costa, M. C., Lira, T. S., &Aragão, G. M. F. (2019). Analyse comparative de la formation de biofilm chez des isolats de lait cru, pasteurisé et UHT. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108249. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108249>
44. Costa, P. V., Vasconcellos, L., da Silva, I. C., Medeiros, V., Forsythe, S. J., Brandão, M. L. L. 2020. Multi-locus sequence typing and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobactersakazakii* and *Cronobactermalonaticus* isolated from corn-based farinaceous foods commercialized in Brazil. *Food Research International*. 129, 108805.
45. Costa, S.S., Guimarães, L.C., Silva, A., Soares, S.C., Baraúna, R.A., (2020). First Steps in the Analysis of Prokaryotic Pan-Genomes. *BioinformBiol Insights* 14, 117793222093806. <https://doi.org/10.1177/1177932220938064>.
46. Costerton J W., Stewart P S et Greenberg E P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
47. CRI Report. (2023). Research Report On China's Infant Formula Import 2023-2032. <https://www.cri-report.com/chinas-infant-formula-import-2023-2032>
48. Curcic-Trajkovska, S. (2015). Biofilms in the food industry: Formation, detection and control. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 11, 42–48.
49. De Chalvet, F., & De Rochemonteix, O. (2009). *Biofilms bactériens et interactions surface-microorganisme*. Paris : Éditions Lavoisier.
50. DEEB M.M.A., AL HAWARY I.I., AMAN I.M. & SHAHINE M.H.A.D., (2010). Bacteriological investigation on Milk Powder in the Egyptian Market with Emphasis on its safety. *Journal Global Veterinaria*. Mansoura University. Egypt. p.p.4-424-433.
51. Deeb, R., Martin, P., &Dupont, S. (2010). Qualité microbiologique et physico-chimique des laits en poudre : critères et impacts technologiques. *Journal International de Technologie Alimentaire*, 25(3), 145–158.
52. Dénèm D, Idriss B, Hassan SA. Contribution à l'étude de certaines protéines allergènes des aliments fréquemment consommés : cas du blé, blanc d'œuf et du lait de vache.

53. Denis, F., Ploy, M., Martin, CH., Bingen, E., et Quentin, R. (2007). Bactériologie médicale Techniques usuelles. Masson, Paris..
54. Diaz, M. H., Ledesma, M. A., & Fernández, A. S. (2016). Biofilm formation and resistance to disinfectants in food-processing environments. *International Food Research Journal*, 23(1), 45–52.
55. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* (2000). Jan;13(1):16-34, table of contents. doi: 10.1128/CMR.13.1.16. PMID: 10627489; PMCID: PMC88931.
56. Donlan R. M., Costerton J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
57. Donlan R.M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal*, 8 (9), 881-890
58. Donlan, R. M. (2002). Biofilms : vie microbienne sur les surfaces. *Maladies infectieuses émergentes*, 8(9), 881.
59. Duanis-Assaf, D., Steinberg, D., Chai, Y., Shemesh, M. Le quorum à base LuxS gouverne de détection du lactose induit la formation de biofilm par *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, Vol. 6, pp. 1517.
60. Dufour, D., Leung, V., Lévesque, CM. Bacterial biofilm : structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod. Top*, 2012, Vol. 22, pp. 2–16.
61. Dumas, C. (2007). Influence de la température sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms. Paris : Éditions de Microbiologie Appliquée.
62. Dunne W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*. 15(2): 155-166.
63. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schkeufer, KH., Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes : Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. Springer, New-York. Vol 4, Chap. 1.2.1. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p4-75.
64. Fetsh, A. (2018). Insights into antibiofilm mechanisms of phytochemicals: prospects in the food industry. *Food Research International*, 202, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.012>
65. Fildes, V. (1986). Breasts, bottles and babies: A history of infant feeding. Edinburgh : Edinburgh University Press.
66. Fletcher M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *J. Bacteriol*, 170, 2027-2030

67. FLINT B, BROOKS JD., (1997): Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of controle 54.p.p.81-97.
68. Flores, P., Luo, J., Mueller, D. W., Muecklich, F., &Zea, L. (2024). Space biofilms an overview of the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on silicone and cellulose membranes on board the international space station. *Biofilm*, 100182.
69. Follain C. Les laits infantiles : analyse comparative et rôle du pharmacien [Thèse d'exercice]. Université de Rouen. UFR de Médecine et de Pharmacie,2015.
70. Fomon SJ. 1987. Reflections on infant feeding in the 1970s and 1980s. *Am. J. Clin. Nutr.* 46:171–82. *Food Science &Technology*, 76, 101-118.
71. Forsythe, S.J., 2005. Enterobactersakazakii and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern. Child Nutr.* 2005, 1, PP: 44–50.
72. Frontières, A., Mendes, A. S., & Silva, T. A. (2019). Identification des gènes liés à la formation de biofilm chez *Staphylococcus aureus* isolés du lait pasteurisé. *MicrobialPathogenesis*, 137, 103758. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103758>
73. Galié, S., García- Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., &Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
74. Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, EM., Villar, C J., Lombó, F. Biofilms in the Food Industry : Health Aspects and Control Methods. *Frontiers Microbiol*, 2018, Vol 9, 898.
75. Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in natural science*, 18(9), 1049-1056.
76. Gibney, M. J., Lanham-New, S. A., Cassidy, A., & Vorster, H. H. (2009). *Introduction to human nutrition* (2nd ed.). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
77. Gjermansen, M., Ragas, P. C., Sternberg, C., &Molin, S. (2005). The role of nutrient limitation and quorum sensing in biofilm dispersion. *Microbiology*, 151(6), 1751–1760. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27773-0>
78. Goller, C. C. (2008). Molecular mechanisms of biofilm development in *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, University of Washington). <https://doi.org/10.7275/123456789>
79. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., &Givskov, M. (2007). Food spoilage–interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.029>

80. GRARE Marion. *S. capitis, S. caprae et S. lugdunensis : rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques*. Th. Doctorat BIOLOGIE MÉDICALE. UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER, 2016, 18 p.
81. Green, C. K., Shurley, T. 2016. What's in the Bottle? A Review of Infant Formulas. *Nutrition in Clinical Practice*, 31, PP: 723-729.
82. Grossman, N., Burgin, N., & Rice, S. A. (2021). Influence of surface properties and environmental conditions on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and maturation. *Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41522-021-00198-4>
83. Grossman, N., Shmueli, M., & Finkelstein, R. (2021). Osmotic and nutritional stress modulate agr and sarA regulators in *Staphylococcus aureus* biofilm development. *Frontiers in Microbiology*, 12, 635451. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635451>
84. Guilhen, C. (2017). *Caractérisations transcriptionnelle et phénotypique de bactéries dispersées de biofilm à Klebsiella pneumoniae* (Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne [2017-2020]).
85. GUIRAUD J. P, (2003). *Microbiologie Alimentaire*. Edition DUNOD. Paris. p.p.136-139.
86. Gundogan N, Citak S, Turan E .2006. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. *Food Cont.* 17:389-392.
87. Hamadi, F., Latrache, H., El Mdaghri, N., & Ellouali, M. (2004). The effect of pH on bacterial adhesion to glass. *Annals of Microbiology*, 54(4), 447–452.
88. Haughton, P., Garvey, M., Rowan, N. J. 2010. Emergence of *Bacillus cereus* as a dominant organism in Irish retailed powdered infant formulae (PIF) when reconstituted and stored under abuse conditions. *Journal of Food Safety*, 30, PP: 814-831.
89. Hennekinne, JA. (2009). *Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive*, thèse de Doctorat. Université Agro Paris Tech, France. p: 16-17.
90. Hilliard. N. J., Schelonka, R. L., Waites, K. B. 2003. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3441 -3444. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 109-17.
91. Høiby, N. (2014). Une histoire personnelle de recherche sur les biofilms microbiens et les infections par biofilms. *Pathogens and Disease*, 70(3), 205-211.

92. Hughes HK, Landa MM, Sharfstein JM. Marketing Claims for Infant Formula: The Need for Evidence. *JAMA Pediatr.* 2017;171(2):105. doi:10.1001/jamapediatrics.2016.3837
93. Infant Formula Market Size, Growth & Trends Forecast 2026. Published online September 2019
94. Inzan, L. (2018). Technologies de transformation laitière : homogénéisation et ses effets. Lyon : Éditions Agroalimentaires.
95. Ivain, Lorraine. (2017). Virulence et résistance aux antibiotiques du staphylocoque doré : recherche des ARNm ciblés par deux ARN régulateurs ; Université De Rennes 1.
96. Iversen, C., S. Forsythe. 2004. Isolation of Enterobactersakazakii and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, 21, 771–777.
97. Jeantet, R., Lethuaut, L., & Chevalier, J. (2008). Effets des traitements thermiques sur la qualité nutritionnelle du lait en poudre. *Industrie Laitière*, 63(5), 312–320.
98. Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 367–372. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00466-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00466-9)
99. Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). [Doubleton possible avec Joseph et al., à corriger si erreur de frappe]
100. Juwita, Sartika et Indrawati, Agustin et Damajanti, Retno et Safika, Safika et Mayasari, Ni. (2022). Genetic relationship of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, animals, environment, and Dangke products in dairy farms of South Sulawesi Province, Indonesia. *Veterinary World*. 15. 558-564. [10.14202/vetworld.2022.558-564](https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.558-564).
101. Kaiser, G. E. (2017). TSA Plate Culture of the Chromogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*.
102. KAJAL M.F.I., WADUD A., ISLAM M.N. & SARMA P.K, (2012). Evaluation of some chemical parameters of powder milk available in Mymensingh town. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 10, p.p.95-100.
103. KALYANKAR S.D., DESHMUKH M.A., CHOPDE S.S., KHEDKAR C.D., LULE V.K. & DEOSARKAR S.S, (2016). Milk Powder. In: Caballero, B., Finglas, P., and Toldrá, F. (eds.). *The Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press. 3, p.p.724-728.
104. Kara Terki, S. (2014). Étude des mécanismes de formation de biofilms chez les bactéries pathogènes. Alger : Université d'Alger, Mémoire de Master.

105. Kelly, A. L., O'Mahony, J. A., & FitzGerald, R. J. (2016). Milk fat and lactose: Properties and influence on the texture and mouillability of dairy products. *International Dairy Journal*, 60, 17–23.
106. Kent, R.M., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P, 2015. Novel Approaches to Improve the Intrinsic Microbiological Safety of Powdered Infant Milk Formula. *Nutrients*.7, PP :1217-1244.
107. Krukowski H., Szymankiewicz M., Lisowski A. 2008. Slime production by *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis *Pol. J. Microbiol.* 57 (3):253-255.
108. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A. Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., ... Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* (London, England), 357(9264), 1225–1240. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04403-](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04403-)
109. Labarth, J. (2013). *Les laits infantiles : innovations et spécificités nutritionnelles*. Paris : Éditions Techniques de Santé.
110. Lainhart, William et Yarbrough, Melanie et Burnham, Carey-Ann. (2018). The Brief Case: *Staphylococcus intermedius* Group—Look What the Dog Dragged In. *Journal of Clinical Microbiology*. 56. e00839-17. 10.1128/JCM.00839-17.
111. Landgraf M., Destro MT. 2013. Intoxication alimentaire staphylococcique. Dans *Infections et Intoxications d' ; Origine Alimentaire*, Presse académique, pp. 389-400.
112. Laura, G., Martins, P. A., & Oliveira, C. (2016). Biofilms and their impact on food safety: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(Suppl 1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
113. LE LOIR, Y et GAUTIER, M. (2010). *Staphylococcus aureus*, édition TEC & DOC, Eminter, Lavoisier, France.
114. Le Loire, R. (2003). *Staphylococcus aureus et la pathogénie bactérienne*. Paris: Institut Pasteur.
115. Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux*, 16(3), 112-121.
116. Lewandowski, Z., & Evans, L. V. (2000). Structure et fonction des biofilms. Dans *Biofilms : Avancées récentes dans leur étude et leur contrôle* (p. 466).
117. Li, T., Mei, Y., He, B., Soleil, X., Li, J. La réduction de l'expression de facteur de virulence à médiation par détection de quorum et la formation de biofilm en *Hafnia alvei* en utilisant

- l'inhibiteur de la détection de quorum potentiel l-carvone. *Frontiers in Microbiology*, 2018, Vol. 9, pp. 3324.
- 118.Licitra, G. (2009). Etymologia: Staphylococcus. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 1823.
- 119.Liu, G. Y., Doran, K. S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L., &Nizet, V. (2004). Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 209–215.
- 120.Machado, I., Silva, LR., Giaouris, ED., Melo, LF., Simões, M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. *Journal Pre-proofs*, 2019, Vol. 127.
- 121.Madhaiyan, M., Wirth, J. S., &Saravanan, V. S. (2020). Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus Staphylococcus as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five Staphylococcus species to Mammaliococcus gen. nov., and the formal assignment of Nosocomiicoccus to the family Staphylococcaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5926–5936. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004498>.
- 122.Mahamuni-Badiger, P. P., Patil, P. M., Badiger, M. V., Patel, P. R., Thorat-Gadgil, B. S., Pandit, A., &Bohara, R. A. (2020). Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110319.
- 123.Makambala N'dek, J. (2012). Hygiène et qualité du lait dans la production des laits infantiles. Kinshasa: Éditions Universitaires Africaines.
- 124.Malek, R. (2019). Biofilms alimentaires : un défi persistant pour l'industrie agroalimentaire. *Revue Maghrébine de Microbiologie Appliquée*, 25(2), 88–96.
- 125.Martinez, A. (2007). Regulation of biofilm formation and gene expression in bacteria. *Journal of Bacteriology and Molecular Biology*, 9(3), 123–135.
- 126.Martinez, G.A., Dodd, D.A. 1983. 1981.Milk feeding patterns in the United States during the first 12 months of life. *Pediatrics* 71:166–70
- 127.Mary, J. Y., Desjeux, J. F., Dupont, C., &Heyman, M. (1994). Nutrition infantile et risques digestifs. Paris : Éditions INSERM.
- 128.McHugh, A. J., Feehily, C., Hill, C., Cotter, P. D. 2017. Detection and Enumeration of Spore-Forming Bacteria in Powdered Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 109.
- 129.Meyer, P. (2021). Classification et caractérisation de Staphylococcus aureus. Lyon : Éditions Microbiologie et Santé.

130. Michel, V., Dupont, P., & Lefèvre, A. (2001). Les principaux groupes bactériens présents dans le lait. Lyon : Éditions Agroalimentaires.
131. Mirzaei, R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Arciola, C. R. (2024). Emerging Issues and Initial Insights into Bacterial Biofilms: From Orthopedic Infection to Metabolomics. *Antibiotics*, 13, 184.
132. Mizan, MF., Jahid, IK., Kim, M., Lee, KH., Kim, TJ., Ha, SD. Variabilité dans corrélats de formation de biofilm avec hydrophobicité et de détection de quorum parmi *Vibrioparahaemolyticus* isolé à partir des surfaces de contact avec les aliments et la distribution des gènes impliqués dans la formation de biofilm. *L'encrassement biologique*, 2016, Vol. 32 (4), pp. 497-509.
133. Morgene, M. (2018). *Staphylococcus aureus: Cultural Characteristics and Pigmentation*. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(8), e00458-18.
134. Nations Unies. (2019). La population mondiale atteindra 8,5 milliards d'ici 2030. Organisation des Nations Unies.
135. Nobbs, A. H. (2009). Adhesion of bacteria to host tissues and biomaterials. *Microbiology Today*, 36(1), 34–37.
136. OLGA R, (2013). Some aspects of the formation of emulsions and foams in food industry. Ternopil Ivan Pul'uj National Technical University. Ternopil. *Ukrainian Journal of Food Science*. Ukraine. 1, p.p.41-47.
137. Organisation mondiale de la santé. (2003). Alimentation du nourrisson et du jeune enfant : Document d'orientation. Genève: Organisation mondiale de la santé.
138. Organisation mondiale de la santé. (2009). Questions fréquemment posées sur l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant. Genève : Organisation mondiale de la santé.
139. O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
140. Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 207–228.
141. Paliu, P. T., & Budiarto, T. Y. (2017, May). Isolation and identification of *Staphylococcus* sp. in powdered infant milk. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1844, No. 1). AIP Publishing.
142. Palmquist, A.E.L., Perrin, M.T., Cassar-Uhl, D., Gribble, K.D., Bond, A.B., Cassidy, T. 2019. Current Trends in Research on Human Milk Exchange for Infant Feeding. *J Hum Lact*. 35(3):453-477.

143. Park, S.-C., Lee, K., Kim, Y.O., Won, S., Chun, J., (2019). Large-Scale Genomics Reveals the Genetic Characteristics of Seven Species and Importance of Phylogenetic Distance for Estimating Pan-Genome Size. *Front. Microbiol.* 10, 834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00834>.
144. Pereira, R., Santos Fontenelle, R. O., Brito, E. H. S., & Morais, S. M. (2020). Biofilm of *Candida albicans* : formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
145. Pierre, F. (2003). *Les bases de la technologie laitière*. Paris : Éditions Techniques et Sciences.
146. Pinson, V. (2018, 8 juin). La course pour remplir les biberons chinois. *Les Marchés by Réussir*. <https://www.reussir.fr/lesmarches/la-course-pour-remplir-les-biberons-chinois>.
147. Ploy, M., Poyart, C., Cattoir, V., Denis, F., Martin, C. (2016). *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. France : Elsevier Masson SAS Éditeur.
148. Preda, M., & Sandulescu, R. (2019). Quorum sensing mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria: Therapeutic implications. *Romanian Journal of Biology - Microbiology*, 64(1), 25–34.
149. Proudly I, Bougle D, Leclercq R, Vergnaud M., 2008. Tracing of *Enterobacter sakazakii* isolates in infant milk formula processing by BOX-PCR genotyping. *J. Appl. Microbiol.*, 105(2):550-8.
150. Pubert C. *Le lait de vache dans l'alimentation du nourrisson, avantages et inconvénients [Thèse d'exercice]*. Université d'Angers. UFR Sciences pharmaceutiques et Ingénierie de la santé, 2013.
151. Qadir, A., Tarhan, Ö., & Spotti, M. (2016). Effect of homogenization pressure and temperature on fat globule size distribution and digestibility of milk emulsions. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2105–2115. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10084>.
152. Quecan, B. X. V., Pinto, U. M., & Rosenthal, A. (2019). Quorum sensing: A key microbial communication mechanism for controlling biofilm formation. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.009>
153. Ragab, Tarek et Rady, Amgad & Mahmoud, Muhammad. (2021). The antimicrobial effect of *Bacillus* secondary metabolites on the human pathogen. 10.13140/RG.2.2.32627.04642.
154. Rajf.org | Décision n° 2000-D-66 du 7 janvier 2001 relative à des pratiques relevées dans le secteur de la distribution des laits infantiles [Internet]. [Cité 9 sept 2021].
155. Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMedresearch international*, 2015(1), 759348.

156. Robert, J.-C. (2012). Module - Bactériologie [Support pédagogique]. Faculté d'odontologie de Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
157. Roberts S., Chambers S. (2005). Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Internal Medicine Journal*. 35, 2, 97–105.
158. Romain B., Lise F., Murielle N., Catherine D. 2012. *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Quae. France.
159. Rosenbach, F.J. (1884). *Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*. JF Bergmann's Verlag, Wiesbaden, Germany, pp. 1–122.
160. Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.
161. Saad, N. (2008). *Formulation et propriétés des laits infantiles anti-régurgitations*. Paris: Éditions Médicales Scientifiques.
162. Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., He, G. 2016. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 200–208.
163. Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zeef L.A.H., Davies D.G., Gilbert P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*, 7312–7326.
164. Sauer K., Stoodley P., et Høiby N. (2022). Biofilm formation and its role in the pathogenesis of chronic infections. In M. Manefield (Ed.), *Biofilm Control and Antimicrobial Agents* (pp. 1-18). Caister Academic Press.
165. Shan Su, X., Wang, Y., & Zhang, Z. (2019). Phenotypic and genotypic detection of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* in food processing environments. *Journal of Food Safety*
166. Sharman, R., & Anand, S. (2002). Biofilms in the food industry: A review. *Food Microbiology and Safety*, 18(3), 204–211.
167. Simard, M. (2001). *Lait de vache et alimentation du nourrisson : adaptations et précautions*. Québec: Presses de l'Université Laval.
168. SIMOES M, SIMOES LC, VIEIRA MI, (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci. Technol.*, 43: p.p. 573-583

169. 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
170. Simon, SS., Sanjeev, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*, 2007, Vol. 18, pp. 1565–1568.
171. Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439–447. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0339>
172. Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2017). Effect of NaCl and glucose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 105, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.012>
173. Skogman, ME., Kanerva, S., Manière, S., Vuorela, PM., Fallarero, A. flavones comme Les inhibiteurs de quorum identifiés par criblage d'une plate-forme nouvellement optimisé en utilisant *Chromobacterium violaceum* que les bactéries reporters. *Molécules*, 2016, Vol. 21 (9)
174. Song, F., Ren, D., & Chen, H. (2021). Bacterial adhesion to surfaces: Mechanisms, influencing factors, and role in biofilm formation. *Biotechnology Advances*, 48, 107728. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107728>
175. Spormann A. M. 2008. Physiology of Microbes in Biofilms. *Bacterial Biofilms*, 17–36.
176. Statista. (2023). Infant formula market worldwide – statistics & facts. Retrieved June 2025, from <https://www.statista.com/topics/4934/infant-formula-market-worldwide/>
177. Stevens, E.E., Patrick, T.E., Pickler, R. 2009. A history of infant feeding. *J. Perinat. Educ.* 18(2):32.
178. Stoodley, P., Boyle, J. D., Dodds, I., & Lappin-Scott, H. M. (1997). Consensus model of biofilm structure.
179. TAHOUN A.B.M.B. & N. ABDEL FATAH E, (2015). Microbiological status of rehydrated infant formula Milk Powder versus expressed breast milk for Neonates. Food Control Department. Zagazig University. Egypt. *Zagazig Veterinary Journal*. 43, p.p.01- 09.
180. Touaitia, Rahima. (2016). ‘' ; *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: Emergence et mécanismes de résistance'; Université Badji Mokhtar –ANNABA.
181. Trampuz, A., Widmer, AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opin. Infect. Dis*, 2006, Vol. 19, pp. 349–356.

182. Trouillet, Sophie (2011). *Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis* ; Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis ; École Pratique Des Hautes Études.
183. Turck D. Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. Archives de Pédiatrie. 1 déc 2005 ;12: S145- 65.
184. Turner N. A, Sharma-Kuinkel B. K, Maskarinec S. A, Eichenberger E. M, Shah. P. P, Carugati. M et al. (2020). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research Nature Review Microbiology. 17, 4, 203–218.
185. Umoh, V. J., Obawede, K. S., & Umoh, J. U. (1985). Contamination of infant powdered milk in use with enterotoxigenic Staphylococcus aureus. Food microbiology, 2(4), 255-261.
186. Vasudevan, P., Shankar, S., & Karthikeyan, K. (2003). Biofilm production by Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. Indian Journal of Dairy Science, 56(4), 277–280.
187. Vazquez-, D., Lopez-Cabo, M., Saa-Ibusquiza, P., Rodriguez-Herrera, J J. Incidence and characterization of Staphylococcus aureus in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). Int J Food Microbiol, 2012; Vol. 157(2), pp.286-296.
188. Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., Heyndrickx, M. 2020. Food Sensing: Detection of Bacillus cereus spores in Dairy Products. Biosensors, 10(3):15, doi: 10.3390/bios10030015.
189. VIERLING E, (2008). Aliments et besoins filières et produits. 3ème édition Biosciences et Technique. PARIS. 2008. p.p.15-16.
190. Wadher, R. N. (2013). Caractérisation des exopolysaccharides produits par Staphylococcus aureus et leur rôle dans la formation de biofilms. Mumbai : Université de Mumbai, Thèse de doctorat.
191. Walstra, P. (2006). Dairy science and technology (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
192. Wang, X., Meng, J., Zhang, J., Zhou, T., Zhang, Y., Yang, B., ...& Xia, X. (2012). Characterization of Staphylococcus aureus isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. International journal of food microbiology, 153(1-2), 142-147.
193. Winkelströter, L. K., Teixeira, F. B. R., Silva, E. P., Alves, V. F., & De Martinis, E. C. P. (2014). Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. Microbial Ecology, 68(1), 35–46. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0301-6>
194. Wong, A. C. L. (1998). Biofilms in food processing environments. Journal of Dairy Science, 81(10), 2765–2770. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75836-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75836-9)
195. Wu, S., Jiang, Y., Lou, B., Feng, J., Zhou, Y., Guo, L., Forsythe, S., Man, C. 2018. Microbial community structure and distribution in the air of a powdered infant formula factory based on cultivation and high throughput sequence methods. Journal of Dairy Science, 101, 6915-6926.

196. Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., & Deng, Y. (2016). Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current Microbiology*, 73, 474–482.
197. Yang, Y., Yu, X., Zhan, L., Chen, J., Zhang, Y., Zhang, J., Chen, H., Zhang, Z., Zhang, Y., Lu, Y., Mei, L. 2017. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China. *Food Microbiology*, 62, 46 – 50.
198. Yi C. Global infant formula products market: estimations and forecasts for production and consumption. *China dairy Gira*. Published online July 2018.
199. Yuan, L., Sadiq, FA., Burmolle, M., Liu, T., He, G. Aperçus dans le lait bactérien l'altération avec un accent particulier sur le rôle des enzymes stables à la chaleur, les biofilms et la détection de quorum. *Journal de protection alimentaire*, 2018, Vol. 81 (10), pp. 1651- 1660.

Annexe

Annexe 1 : liste de matériel et accessoires utilisés.



Vortex



Pipette Pasteur



Densitomètre



Microscope optique



Bec Bunsen



Micropipette



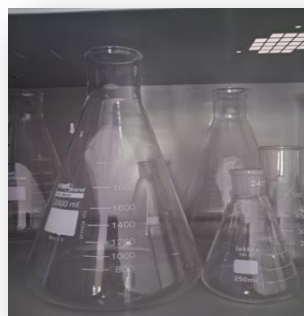
Anse de platine



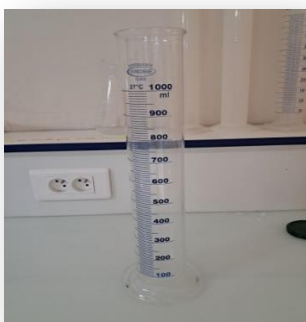
Centrifugeuse



Les lames



Etuve



Four Pasteur



Béchers



Eprouvette

Balance

Agitateur

Annexe 2 : Milieux de culture

1. Milieu de Baird Parker

➤ **Composition :**

Constituants Quantité en g/l

Hydrolysate trypsine de caséine.....	02g
Extrait de viande de bœuf.....	05g
Extrait de levure.....	01g
Pyruvate de sodium.....	10g
Chlorure lithium.....	05g
Agar.....	17g
Glycocolle.....	12g

2. Gélose nutritive pour conservation

➤ **Composition :**

Peptone.....	10g
Extrait de viande	3g
Gélatine peptone.....	5g
Agar	15g

3. Milieu Chapman**➤ Composition :**

Extrait de viande de bœuf	1.00 g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)	10g
Chlorure de sodium.....	75.00 g
Mannitol	10.00 g
Rouge de phénol	0.025 g
Agar.....	15.00 g

4. Milieu Rouge Congo Agar (RCA)**➤ Composition :**

BHIB.....	37g/l
Saccharose.....	50 g/l
Agar.....	10 g/l
Rouge Congo.....	0,4 g/l
Eau distillée	1000 ml/l

5. Gélose au sang :**➤ Composition :**

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5,0 g
Chlorure de soduim (NaCl).....	5,0 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
Sang.....	5ml

6. Bouillon cœur-cervelle (BHIB) :**➤ Composition :**

Protéose-peptone infusion de cervelle de veau.....	10.0g
Infusion de cœur de bœuf.....	2.5g
Glucose.....	5.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g
Hydrogénophosphate de sodium.....	2.5g
Eau distillé.....	1000ml

7. Bouillon nutritive :

➤ **Composition :**

Tryptone	10,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Eau distillé.....	1000ml