



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de  
l'Univers



Département de Biologie

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

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en biologie

Option : Microbiologie fondamentale

**Thème**

**Evaluation de l'effet de l'acide acétique et de l'acide citrique sur des  
biofilms isolés à partir de la viande de poulet**

**Présenté par:** HASSENAOUI Hanane

KHECHE Saida.

**Devant le jury composé de :**

Présidente	Dr BENDIMRED N	Maitre de conférences B	Université de Tlemcen
Examinatrice	DR BELLIFA S	Maitre de conférences B	Université de Tlemcen
Promotrice	Dr CHERIF ANTAR A	Maitre de conférences B	Université de Tlemcen
Invité	Mr BENAMAR I	Magister	Université de Tlemcen

**Année Universitaire 2018-2019**

# Remerciement

*Louange et Gloire à ALLAH Le Miséricordieux et Le Tout Puissant pour m'avoir donné la chance et aidé pour la réalisation de ce modeste travail.*

*En seconde lieu, je tient à remercier ma chère encadreur Mlle CHERIF ANTAR Asma maitre de conférences classe B à l'université ABOU BAKR BELKAID Tlemcen, pour ses précieux conseils sa confiance et son aide durant toute la période du travail.*

*Mes sincères remerciement à Mr. BENAMAR Ibrahim, Doctorant à ABOU BAKR BELKAID Tlemcen, pour leur disponibilité, précieux conseils et leurs encouragements.*

*Mes vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mme BENDIMRED Nahida maitre de conférences classe B à l'université ABOU BAKR BELKAID Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.*

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

*Mes profondes remerciements vont également à tous les enseignants qui m'ont donné les bases de la recherche pendant les cinq ans et les Personnes qui m'ont aidé et contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail, et surtout ma très chère sœur Naima et son époux Lahcene.*

*Enfin, j'adresse mes vifs remerciements à tous les enseignants et les étudiants de ma promotion de la microbiologie.*

*Je remercie également l'ensemble des personelles du laboratoire de Microbiologie Appliquée à L'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation de ce travail.*

*Je remercie énormément tous mes collègues de la spécialité Microbiologie fondamentale.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail : A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.*

*A la mémoire de ma chère mère, que Dieu ait pitié son âme.*

*A mon père qui a sacrifié sa vie pour notre instruction.*

*A ma belle mère.*

*A la bougie de ma vie, la fleur de mes jours, A ma chère sœur Naima qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau.*

*A Lahcene qui m'encourageait et m'aidait tout le temps.*

*A mes frères : Abdelhak, Larbi et sa femme Amina, Abderrahim et sa femme Asma et à Abderrahmen.*

*A mes anges : Tasnim et Assil.*

*A mes grands parents : Mohammed et Zineb.*

*A la mémoire de ma nièce : Djana qu'Allah ait son âme.*

*A la mémoire de ma chère cousine Samira qu'Allah ait son âme.*

*A toute ma famille : Oncles, Tantes, Cousins et cousines.*

*A tous mes amis.*

*Sans oublier mes collègues les étudiants de 2ème Année Master*

*Microbiologie Fondamentale.*

*Et toutes personnes que j'aime et qui m'aime.*

*Hanane*

## Résumé :

Dans l'industrie alimentaire, y compris celle de la volaille, la plupart des agents pathogènes et/ou d'altération ont la capacité aux surfaces en contact avec les aliments et par conséquent former des biofilms

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de formation de biofilms par des souches appartenant à *B.cereus* et *Staphylococcus aureus* isolées de la viande de poulet hachée crue et du Döner Kebab prêt à manger commercialisés dans la région de Tlemcen. L'effet de l'acide acétique et de l'acide citrique sur des biofilms de *Staphylococcus aureus* formés sur des surfaces en acier inoxydable à plusieurs concentrations et durées de contact différents.

Les résultats d'évaluation de la formation des biofilms des souches sur le PVC, gélose en rouge congo et sur l'acier inoxydable sont les suivants : 58,06% des souches sont non productrices de biofilms, 41,94% sont des souches productrices de biofilm sur le PVC, que 4 souches appartenant aux *S. aureus* sont productrices du slime sur gélose en rouge congo, ainsi que les résultats montrent que la plupart des souches sont non productrices sur l'acier inoxydable 61,29%, 45,16% et 54,83% pendant des différents temps d'incubation 24,48,72h, respectivement.

L'acide acétique a un effet réducteur important (**2,59 log**) par rapport à l'acide citrique (**2,36 log**) ; mais en même temps la valeur de la réduction la plus basse est de **0,070 log** enregistré pour l'acide acétique.

L'acide citrique a un effet d'élimination total du biofilm plus que réductionnel, contrairement à l'acide acétique.

**Mots clés :** biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, acide acétique, acide citrique.

## Abstract :

In food industry, including poultry, most pathogenic and or weathering have the ability of adhesion in surfaces that has a contact with food by forming a biofilms, such as *S. aureus* and *B. cereus*.

The main objective of this work is to evaluate the effect of acetic acid and citric acid on a selected strain of *Staphylococcus aureus* from 31 strains isolated from raw chicken meat and Döner Kebab ready to eat commercialized in the region of Tlemcen, including 20 strains of *Bacillus cereus* and 11 are *Staphylococcus aureus*.

All 31 strains were evaluated for quantitative and qualitative biofilm formation on titration microplates made of PVC, congo red agar and stainless steel.

The evaluation results of the biofilm formation of the strains on PVC, agar in Congo red and on stainless steel are as follows: 58.06% of strains are non-producing biofilms, 41.94% are strains producing biofilm on PVC, 4 strains belonging to *S. aureus* are producing slime on agar in red congo, as well as the results show that most strains are nonproducer on 61.29%, 45.16% and 54.83% stainless steel during different incubation times 24,48,72h, respectively.

The second experimental part shows that acetic acid has a significant reducing effect (2.59 log) relative to citric acid (2.36 log); but the lowest biofilm reduction (0.070 log) is recorded in acetic acid.

The citric acid has a total elimination effect of the biofilm more than reduction, unlike acetic acid.

**Key words:** chicken meat, biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, acetic acid, citric acid.

## الملخص:

في مجال الصناعات الغذائية، بما في ذلك الدواجن ، معظم العوامل المسببة للأمراض او التي تغير الحالة الطبيعية للأغذية لديها القدرة على التثبيت على مساحات متصلة بالأغذية مشكلة البيوفيلم، كالبكتيريا ( Gram positive ) التي من بينها *S. aureus* و *B. cereus* والبكتيريا.

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو تقييم تأثير حمض الأسيتيك(حمض الخل) وحمض الستريك على سلالة مختارة من المكورات العنقودية الذهبية من 31 سلالة معزولة من لحم الدجاج النيئ مسوق دونر كباب جاهزة للأكل في منطقة تلمسان، منها 20 سلالة من الباسيلوس سيغيوس و 11 سلالة من المكورات العنقودية الذهبية.

تم تقييم جميع ال 31 سلالة لفحوصات تشكيل بيوفيلم الكمي والنوعي على لوحات المعايرة PVC ، لوحات أجار الكونغو الأحمر ولوحات الفولاذ المقاوم للصدأ.

نتائج تقييم السلالات لتشكيل البيوفيلم على PVC ، لوحات أجار الكونغو الأحمر وعلى الفولاذ المقاوم للصدأ هي كما يلي: 58.06 % من السلالات غير المنتجة للبيوفيلم 41.94 %، هي سلالات منتجة للبيوفيلم على PVC ، 4 سلالات فقط تنتمي إلى *S. aureus* تنتج السلايم في أجار الكونغو الأحمر، وكذلك أظهرت النتائج أن معظم السلالات غير منتجة بنسبة 61.29 % و 45.16 % و 54.83 % على الفولاذ المقاوم للصدأ خلال أوقات حضانة مختلفة 24.48.72 ساعة على التوالي.

وضح الجزء التجريبي الثاني أن حمض الأسيتيك له تأثير تقليل للبيوفيلم كبير (log 2.59) مقارنة بحمض الستريك (2.36 log)؛ ولكن تم تسجيل أدنى تخفيض للبيوفيلم (log 0.070) عند حمض الأسيتيك.

حمض الستريك له تأثير القضاء التام على البوفيلم أكثر من التخفيض ، على عكس حمض الخليك.

**الكلمات المفتاحية:** لحم الدجاج ، البيوفيلم ، المكورات العنقودية الذهبية ، الباسيلوس سيغيوس ، حمض الأسيتيك ، حمض الستريك.

### Liste des abréviations et signe utilisés :

- % : Pourcentage.
- (-) : Négatif.
- (+) : Positif.
- °C : Température en degré Celsius.
- µl : Microlitre.
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- AISI: Institut américain de fer et de l'acier.
- *B. cereus* : *Bacillus cereus*.
- BHIA : Gélose infusion cœur-cerveille.
- BHIB : Bouillon cœur-cerveille.
- CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium.
- CV : Cristal Violet.
- DO : Densité optique.
- EDS : Eau Distillée Stérile.
- g : Gramme.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : L'hydrogénophosphate de potassium.
- KCl : Chlorure de potassium.
- l : Litre.
- Log : Le symbole mathématique du mot logarithme.
- Mg : Milligramme.
- MnSO<sub>4</sub> : Sulfate de manganèse.
- Mz : Mégahertz.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : L'hydrogénophosphate de sodium.
- NaCl : Chlorure de sodium.
- NaOH : L'hydroxyde de sodium.
- Nm : Nanomètre.
- P/V : Poids par Volume.
- PBS : Phosphate-Buffered Saline.
- PCA : plaque de gélose de compter (Plate Count Agar).
- PIA : Polysaccharide Intercellulaire Adhésion.
- PVC : Polychlorure de Vinyle: désigne une matière plastique.
- RCA : La culture de Rouge Congo Agar.

- **Rpm** : Nombre de tour par minute.
- ***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*.
- **TSB** : Tryptie Soy-Broth.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **V/V** : Volume par Volume



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm .....	6
<b>Figure 2</b> : La forme de <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579) sous microscopie optique .....	11
<b>Figure 3</b> : Infections causées par <i>B. cereus</i> chez l'homme .....	12
<b>Figure 4</b> : Observation et descriptif de la structure des spores de <i>Bacillus</i> .....	13
<b>Figure 5</b> : Observation microscopique de <i>Bacillus cereus</i> au cours de sa sporulation. ....	14
<b>Figure 6</b> : Cycle de la sporulation et régulation génétique chez <i>Bacillus subtilis</i> .....	15
<b>Figure 7</b> : Observation par microscope électronique à balayage de <i>Staphylococcus aureus</i> ...	17
<b>Figure 8</b> : Structure de l'acide acétique.....	20
<b>Figure 9</b> : Structure de l'acide citrique. ....	20
<b>Figure 10</b> : Formation de biofilm en microplaque .....	25
<b>Figure 11</b> : (A) : La composition du dispositif d'acier inoxydable: deux cercles sur lesquelles 12 lames du même diamètre disposées verticalement, (B <sub>1</sub> ) : Le modèle expérimental(Bécher + Le dispositif d'acier inoxydable) utilisé pour la formation de biofilm mono-espèce <i>Staphylococcus aureus</i> , (B <sub>2</sub> ) : système Batch qui contient le dispositif expérimental, BHIB stérile (200ml) et la suspension bactérienne de <i>Staphylococcus aureus</i> (50ml) avant incubation.....	29
<b>Figure 12</b> : Quantification de la formation de biofilm (DO <sub>595nm</sub> ) sur des microplaque de titration en PVC après une croissance statique des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> à 37°C dans le milieu BHIB après 24 d'incubation. ....	32
<b>Figure 13</b> : Quantification de la formation de biofilm (DO <sub>595nm</sub> ) sur des microplaques de titration en PVC après une croissance statique des souches de <i>Bacillus cereus</i> à 37°C dans le milieu BHIB après 24 d'incubation. ....	33
<b>Figure 14</b> : Évaluation du taux de la formation du biofilm par <i>B. cereus</i> par la révélation au cristal violet dans les plaques de titration au poly chlorure de Vinyle à 96-puits des souches Gram positif ; aspect des puits après coloration des souches.....	33
<b>Figure 17</b> : Quantification de la formation de biofilm (DO <sub>595nm</sub> ) sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance statique des souches de <i>Bacillus cereus</i> à 37°C dans le milieu BHIB après 24,48 et 72 h d'incubation.....	37
<b>Figure 19</b> : Traitement du biofilm à <i>Staphylococcus aureus</i> de 7 jours par l'acide citrique à différent concentration (1%, 2%, 3%, 4%, 5%) pendant des temps différents (5 minutes, 10 minutes, 15 minutes). ....	41

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> composition des EPS.....	5
<b>Tableau 2:</b> Capacité des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen à former le biofilm dans les microplaques de titration en PCV.....	34
<b>Tableau 3:</b> Capacité des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen à produire le slime dans le gélose à rouge congo.....	36
<b>Tableau 4:</b> Classement des souches testées pour leur capacité à former le biofilm selon le temps d'incubation .....	36

## Sommaire

Résumé .....	I
Abstract .....	II
المخلص .....	III
Liste des abréviations .....	IV
Liste des figures .....	VI
Liste des tableaux .....	VII
Introduction générale .....	1
<b>Partie I : synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : Les biofilms microbiens .....</b>	<b>4</b>
1.1. Définition de biofilm .....	4
1.2. Composition et organisation du biofilm .....	4
1.3. Les étapes de formation du biofilm .....	5
1.3.1. Film conditionnant et transport des bactéries vers le support .....	6
1.3.2. L'adhésion réversible .....	7
1.3.3. L'adhésion irréversible et la formation des microcolonies .....	7
1.3.4. La maturation du biofilm et la formation de la structure tridimensionnelle .....	7
1.3.5. Détachement et dispersion de biofilm .....	8
1.4. Les facteurs influençant la formation du biofilm .....	9
1.4.1. Les propriétés physiques de la surface .....	9
1.4.2. Les propriétés physicochimiques de la cellule bactérienne .....	9
1.4.3. La biosynthèse d'EPS .....	10
1.4.4. Les facteurs environnementaux .....	10
1.5. Les biofilms en industries alimentaire .....	10
<b>2. Chapitre 2 : Généralités sur <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>11</b>
2.1. Généralités sur <i>Bacillus cereus</i> .....	11
2.1.1. Taxonomie et caractéristiques .....	11
2.1.2. Pathogénicité de <i>Bacillus cereus</i> .....	12
2.1.3. La sporulation de <i>Bacillus cereus</i> .....	13
2.1.3.1. Structure de la spore .....	13
2.1.3.2. Cycle de sporulation .....	14
2.1.3.3. Caractéristiques des spores .....	15

2.2.	Généralité sur les <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.2.1.	Définition des <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	17
2.2.2.	Pouvoir pathogène .....	17
<b>Chapitre 3 :</b>	<b>Effet de l'acide acétique et l'acide citrique sur la formation des biofilms</b> .....	<b>19</b>
3.1.	L'acide acétique : .....	19
3.2.	L'acide citrique: .....	20
3.3.	L'effet antibactérien de l'acide acétique et de l'acide citrique : .....	20
<b>Partie II : Matériel et méthodes</b>		
<b>Chapitre 1 :</b>	<b>Évaluation de la capacité de formation des biofilms</b> : .....	<b>23</b>
1.1.	Origine des souches : .....	23
1.2.	Revivification des souches : .....	23
1.3.	Observation microscopique : .....	23
1.4.	Conservation des souches .....	23
1.5.	Évaluation de la capacité de formation de biofilm .....	24
1.5.1.	Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96puits en Polychlorure de Vinyle PVC .....	24
1.5.1.1.	Principe de la technique. ....	24
1.5.1.2.	Préparation de la suspension sporale et bactérien. ....	25
1.5.1.3.	Protocole.....	26
1.5.2.	Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par la production de slime sur la gélose au Rouge Congo .....	26
1.5.2.1.	Principe de la technique .....	26
1.5.2.2.	Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne.....	27
1.5.2.3.	Protocole.....	27
1.5.3.	Évaluation de la capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable .....	27
1.5.3.1.	Préparation des surface.....	27
1.5.3.2.	Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne .....	27
1.5.3.3.	Protocole.....	28
<b>Chapitre 2 :</b>	<b>Évolution de l'effet de l'acide acétique et l'acide citrique sur des biofilms à <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>29</b>
2.1.	Préparation des systèmes .....	29
2.2.	Préparation de la suspension bactérienne. ....	29
2.3.	Protocole de développement du biofilm mono-espèce à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
2.4.	Traitement des biofilms .....	30
2.5.	Démembrement des bactéries attachées sur les lames après les traitements .....	30

## **Partie III : Résultats et Discussion**

<b>Chapitre 1 : Évaluation de la capacité de formation des biofilms :</b> .....	32
3.1.1 Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96puits en Polychlorure de Vinyle PVC .....	32
3.1.2 Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par la production de slime sur la gélose au Rouge Congo.....	34
3.1.3 Évaluation de la capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable .....	36
<b>Conclusion Générale</b> .....	45
<b>Références Bibliographiques</b> .....	47
<b>Annexes</b> .....	59

# **Introduction générale**

## **Introduction :**

La consommation et la production de la viande de poulets et des sous-produits de poulets augmentent annuellement dans le monde entier, que ce soit dans les pays développés, ou ceux en voie de développement (FAO/OMC, 2015). La viande de poulet est une source importante de protéines animales utilisées couramment en raison de sa valeur nutritionnelle élevée et ses prix relativement raisonnables (Zhou *et al.*, 2010). Elle est considérée comme un milieu favorisant la croissance des différents types des micro-organismes durant tout le cycle de production tel que les bactéries (Ghafir et Daube, 2007). Parmi ces bactéries, les bactéries à Gram positif dont les bactéries sporulées tel que *Bacillus cereus* et les bactéries productrices des toxines dont *Staphylococcus aureus*. Ces agents pathogènes peuvent passer dans la chaîne alimentaire. Un grand nombre d'espèces de bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme est retrouvé dans la viande de poulet (Van Immerseel *et al.*, 2003a, 2003b).

Dans l'industrie alimentaire, la plupart des agents pathogènes d'origine alimentaire ont la capacité de s'échapper à la stérilisation de routine (telles que les températures et pressions élevées, le rinçage mécanique) en formant un biofilm sur les surfaces des matériaux couramment utilisés dans le secteur alimentaire, tels que l'acier inoxydable, le verre, le caoutchouc, le polycarbonate, le polyuréthane, le polystyrène, le polypropylène, le titane, l'aluminium et la céramique (Rode *et al.*, 2007 ; Di Ciccio *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2019).

Le phénomène de sporulation de *Bacillus cereus* préoccupe l'industrie alimentaire en raison que les spores confèrent à la bactérie une capacité à survivre aux des différents conditions environnementales tel que les hautes températures et les valeurs extrêmes de pH (Immerseel *et al.*, 2004; Cartman *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2016). En effet, *Staphylococcus aureus* est le troisième agent pathogène d'origine alimentaire, il a une capacité élevée de former un biofilm sur les différents surfaces (Di Ciccio *et al.*, 2015; Thiran *et al.*, 2018).

*Staphylococcus aureus* est l'un des principaux microorganismes pathogènes présent dans les aliments pouvant provoquer des intoxications alimentaires qui résultent de l'ingestion d'entérotoxines (SE) staphylococciques produites lors de la croissance de *S. aureus* dans les aliments, tandis que *Bacillus cereus* fait partie des espèces pathogènes du genre *Bacillus* susceptibles de provoquer des maladies d'origine alimentaire (Fernandes *et al.*, 2018 ; Martínez-Vasallo *et al.*, 2019).

Dans ce cadre, la présente étude a été menée avec les objectifs suivants :

- ✓ Évaluer la capacité des souches isolées à partir de la viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger et commercialisés dans la région de Tlemcen à former un biofilm par différentes techniques à savoir les microplaques de titration en PVC, la gélose au Rouge Congo et sur des surfaces solides en acier inoxydable.
- ✓ Tester l'effet de l'acide acétique et l'acide citrique sur des biofilms formés par *Staphylococcus aureus* à différentes concentrations.

Ce mémoire est structuré comme suit :

1. Une synthèse bibliographique qui comporte trois chapitres : Les biofilms microbiens, Généralités sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* et Effet de l'acide acétique et l'acide citrique sur la formation des biofilms ;
2. Une description de la méthodologie envisagée ;
3. Les résultats obtenus sont décrits et discutés par la suite ;
4. Ce travail sera clôturé par une conclusion et des perspectives qui peuvent ouvrir de nouveaux axes de recherches.



**Partie I :**  
**Synthèse bibliographique**

## **Chapitre 1 : Les biofilms microbiens**

### **1.1. Définition de biofilm :**

Les biofilms sont des structures bien organisées de microorganismes (**Tremblay et al., 2014**) soit de la même espèce, soit d'espèces différentes qui vivent en symbiose et forment une communauté (**Banger et al., 2017**). Cette dernière est caractérisée par son adhésion à une surface biotique ou abiotique présentant des caractéristiques fonctionnelles et structurelles complexes (**Rodríguez-Calvo et al., 2017**). Les microorganismes en interaction sont piégés dans une substance polymérique extracellulaire autoproduite appelée : la matrice (**Gaunand et Matt, 2012 ; Al Shamsi, 2015**).

### **1.2. Composition et organisation du biofilm :**

Un biofilm est formé d'un ensemble de microorganismes lié à une surface solide et enrobés dans une matrice extracellulaire (**Filloux et Vallet, 2003 ; Clutterbuck et al., 2007 ; Ardré, 2014**).

Les biofilms se composent par différents types de microorganismes à savoir les bactéries, les protozoaires, les algues, les mycètes et les virus (**Phillips et al., 2011 ; Coughlan et al., 2016**). Ces microorganismes présentent des propriétés totalement différentes de leur homologues planctoniques (**Jamel et al., 2015**). Ils représentent 10 à 25% du volume total du biofilm (**Al Shamsi, 2015**). Les biofilms multi-espèces représentent le mode de vie le plus adapté par les micro-organismes dans la nature (**Yang et al., 2011**). Ils sont plus complexes que les biofilms mono-espèce ce qui rend leur étude très difficile (**Burmølle et al., 2014**).

La matrice du biofilm est le constituant majeur car elle représente 50 à 90% avec une épaisseur qui varie de 0.2 à 1µm (**Sutherland 2001 ; Branda et al., 2005 ; Al Shamsi, 2015 ; Jamal et al., 2017**). Les substances polymériques extracellulaire (EPS) sont des matériaux gélatineux recouvrant les cellules de biofilm composées par des molécules excrétées par les cellules elles-mêmes (**Coughlan et al., 2016**). La composition de la matrice est présentée dans le tableau 1, elle varie selon l'espèce bactérien et les conditions de croissance (**Tremblay et al., 2014**). Les EPS (substances polymériques extracellulaires) sont divisées en trois types : les EPS solubles (S-EPS), les EPS faiblement liés (LB-EPS) et les EPS étroitement liés (TB-EPS). Les EPS-LB et

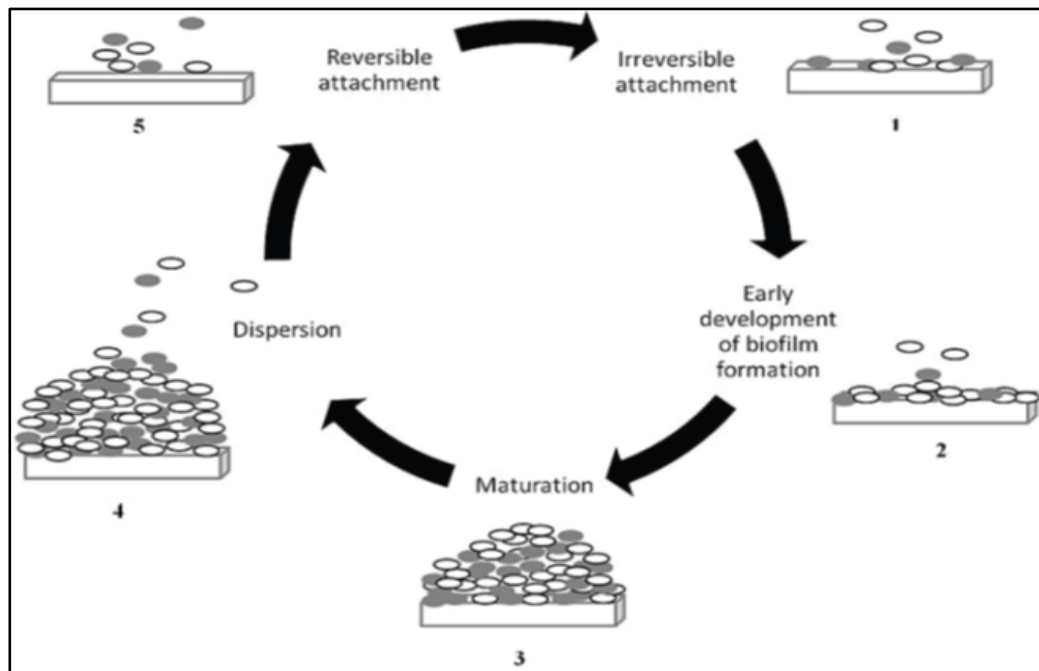
TB-EPS sont les composantes dominantes des EPS totaux (Miao *et al.*, 2017). L'EPS constitue la partie la plus vaste d'un biofilm et remplit de nombreuses fonctions incluant la structure et la stabilité mécanique du biofilm (Fish *et al.*, 2017), une barrière de protection pour augmenter la tolérance des biofilms aux stress environnementaux (Wang, 2018). Elles jouent également un rôle important dans l'adhésion et l'agrégation microbiennes (Miao *et al.*, 2017).

**Tableau 1** : composition des EPS d'après Greener *et al.*, (2016) :

Composition de la matrice	%
Protéines	2
Polysaccharides	1-2
ADN et ARN	1-2
Eau	97
Ions	Traces
Cellules microbiennes	2-5

### 1.3. . Les étapes de formation du biofilm :

La formation des biofilms peut être décrite en cinq étapes (comme indiqué dans la figure 1), avec une notion de cycle car un biofilm constitue un réservoir potentiel pour la création d'un nouveau biofilm (Banger *et al.*, 2017). Ce processus a été observé presque chez toutes les espèces bactériennes étudiées au fil du temps (Hughes, 2016), où les cellules microbiennes se transforment de la forme planctonique à la forme sessile pour l'adaptation aux diverses conditions nutritionnelles et environnementales (Jamal *et al.*, 2015). La formation du biofilm fait appel à un type particulier de signalisation appelé « le quorum sensing », et une transcription d'un ensemble des gènes par rapport à ceux des formes planctoniques de la même espèce microbienne (Jamal *et al.*, 2017).



**Figure 1** : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (Akbas, 2015).

**1.3.1. Film conditionnement et transport des bactéries vers le support** : La première étape est la formation du film primaire. Dans l'environnement alimentaire, il est généralement riche en nutriments, telle que les protéines, les glucides, les lipides et la matière minérale. Ces composants agissent souvent comme un film visqueux, modifiant les propriétés physicochimiques de la surface et stimulant l'attraction et l'adhésion des bactéries vers la surface (Al Shamsi, 2015 ; Banger *et al.*, 2017). Le transport des bactéries implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. Il dépend de plusieurs propriétés dynamiques, dont les caractérisations des bactéries incluant différentes appendices tel que les flagelles et cils, ainsi que la nature et le mouvement de milieu (Parot, 2007 ; Brain-Jaisson, 2014).

**1.3.2. L'adhésion réversible :** C'est une étape de transport qui permet aux bactéries de s'approcher de la surface grâce à la force du flux, à la gravitation, à leur mobilité intrinsèque, et dans certains cas où il y a un gradient de concentration de certaines substances entre les deux interfaces s'implique un transport actif (**Ying et Wei, 2017**), les appendices cellulaires tels que la flagelle, fimbriaes et les pilis sont impliqués dans l'attachement réversible. À ce stade, les bactéries peuvent s'engager dans le mode de vie du biofilm ou quitter la surface pour revenir au mode de vie planctonique (**Toyofuku et al., 2016**). Dans cette étape les cellules bactériennes se fixent à la surface grâce à leur appendices tels que les pillis, les flagelles et les fimriaes et peuvent également être attachées par d'autre forces physiques comme Van der Waal's et les interactions électrostatiques. Les microorganismes s'attachent plus facilement aux surfaces hydrophobes et non polaires (**Chmielewski et Frank, 2003 ; Katsikogianni et al., 2004 ; Jamal et al., 2017**).

**1.3.3. L'adhésion irréversible et la formation des microcolonies :** Dans cette étape certain protéines de surface sont sécrétés (**Toyofuku et al., 2016**), et permettant de consolider la fixation des bactéries au support avec l'application des interactions irréversibles de courte distance d'énergie plus élevée entrent en jeu qui sont les liaisons covalentes (**Vallet et al., 2001 ; Banger et al., 2017**) qui se manifeste entre les bactéries et la surface : des interactions hydrophobes, liaisons de Van der Waals, forces hydrodynamiques et interactions répulsives électrostatiques caractérisées par la formation de ponts entre une charge négative du micro-organisme et une charge négative du substrat, par l'intermédiaire de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) (**Banger et al., 2017 ; Doghri, 2018**). Ces attachements ne peuvent être éliminés que sur l'action d'une forte force d'agitation, et la synthèse des EPS se poursuit (qui débute dès les premières étapes d'adhésion) pendant la maturation du biofilm (**Spiers et al., 2003 ; Kuchma et al., 2005**).

Cette étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attache sur le biofilm en formation (**Chmielewski et Frank, 2003 ; Stanley et al., 2003 ; Roux et Ghigo, 2006 ; Akbas, 2015**).

Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (Davey et O'Toole, 2000 ; Sauer *et al.*, 2002).

**1.3.4. La maturation du biofilm et la formation de la structure tridimensionnelle :** Dans cette étape les cellules communiquent entre elles par des molécules de signalisation du quorum sensing « les auto-inducteurs ». Il s'agit d'un système de stimulation pour l'expression des gènes en coordination avec d'autre cellule et une réponse liée à la densité de leur population locale. La molécule de signalisation s'attache à un récepteur d'autre bactérie et aide la transcription des gènes spécifiques.

Le système de quorum sensing permet la communication entre les espèces intra-spécifiques et interspécifiques (Jamal *et al.*, 2015). Certains gènes spécifiques expriment d'importantes substances pour la formation d'EPS qui est le principal matériau de la structure tridimensionnelle de biofilm. Des canaux interstitiels sont ensuite produits dans la matrice qui agissent comme un système circulatoire pour distribuer les nutriments et éliminer les déchets des communautés microbiennes au sein du biofilm (Jamal *et al.*, 2017). Le biofilm grandit et devient mature, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimales (Banger *et al.*, 2017).

**1.3.5. Détachement et dispersion de biofilm :** Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à savoir limitation en oxygène, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles. L'apparition des forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques peuvent intervenir. Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Donlan, 2002 ; Sauer *et al.*, 2002 ; Sauer *et al.*, 2004 ; Parot, 2007 ; Kaplan, 2010).

Le détachement des cellules bactériennes est considéré comme un problème majeur car cela peut conduire à la contamination des aliments ou à la colonisation d'autres régions, donnant lieu à la formation de biofilm sur une nouvelle surface (Fernandes *et al.*, 2018).

#### **1.4. Les facteurs influençant la formation du biofilm :**

La formation des biofilms et leur organisation structurale résultent essentiellement d'interactions entre l'environnement, la flore microbienne et le matériau. Ils sont donc tributaires et influencent tout à la fois des paramètres propres à chacun des trois acteurs, notamment l'oxygénation, le pH, la température, l'accès à la lumière, la quantité de matière organique en ce qui concerne l'environnement, la nature du matériau, la microstructure, l'état de surface pour le matériau, et le métabolisme, les polymères sécrétés et les interactions cellulaires pour les micro-organismes (**Doghri, 2018 ; Miao et al., 2019**).

**1.4.1. Les propriétés physiques de la surface :** Les biofilms revêtent une grande importance pour l'industrie alimentaire et se produisent sur une grande variété de surfaces en contact avec les aliments. En fait, plusieurs auteurs ont signalé la capacité de bactéries à former des biofilms sur des matériaux couramment utilisés dans le secteur alimentaire, tels que l'acier inoxydable, le verre, le caoutchouc, le polycarbonate, le polyuréthane, le polystyrène, le polypropylène, le titane, l'aluminium et la céramique. Outre, les surfaces contaminées lors de la propagation d'agents pathogènes dans les aliments sont déjà bien établies dans les secteurs de la transformation des aliments, de la restauration et dans les environnements domestiques (**Bendinger, 2003 ; Rode et al., 2007 ; Garzoni et Kelley, 2009 ; Di Ciccio, 2015**).

Les matériaux de la surface ont un effet substantiel sur la fixation et la formation des biofilms. L'adhésion à une surface abiotique est affectée par ses caractéristiques physicochimiques telles que la rugosité, la charge, l'hydrophobicité, le pH et la température (**Akbas, 2015 ; Di Ciccio, 2015 ; Fernandes et al., 2018**).

**1.4.2. Les propriétés physicochimiques de la cellule bactérienne :** L'hydrophobicité de la surface bactérienne. La structure de la cellule bactérienne peut influencer sur la formation de biofilm, par exemple la présence de fimbriae, des protéines, l'EPS et les flagelles qui jouent un rôle très important dans l'attachement des bactéries (**Akbas., 2015**).

**1.4.3. La biosynthèse d'EPS :** Les molécules d'EPS sont acceptées comme un facteur majeur affectant la formation des biofilms. Les EPS ont des différentes propriétés chimiques et physiques en fonction de leur composition chimique. La synthèse d'EPS est affectée par les facteurs environnementaux comme le carbone ou l'azote. La plupart des types d'EPS sont à la fois hydrophiles et hydrophobes (**Donlan et Costerton, 2002**).

**1.4.4. Les facteurs environnementaux :** La formation de biofilm peut être influencée par l'espèce bactérien et les conditions environnementales défavorables incluant les nutriments, le pH et la température pression osmotique, qui existent couramment dans l'industrie agro-alimentaire (**Akbas, 2015 ; Fernandes et al., 2018 ; Miao et al., 2019**).

### **1.5. Les biofilms en industries alimentaire :**

Les biofilms étaient généralement considérés comme des sources de contamination microbienne dans divers domaines industriels. Le contrôle des biofilms est une question très importante dans l'industrie alimentaire, la croissance des biofilms est un problème majeur dans les secteurs de la santé et de l'alimentation (**Furukawa, 2015 ; Amrutha et al., 2017**).

La sécurité alimentaire reste une préoccupation mondiale majeure pour le secteur alimentaire (**Yuan et Yuk, 2018**). La viande et les produits carnés sont particulièrement exposés à des contaminations par des agents pathogènes et d'altération. La viande de poulet est une sources importante de protéines animales utilisées couramment en raison de sa valeur nutritionnelle élevée et ses prix relativement raisonnables (**Zhou et al., 2010**). Pendant la production, la transformation, la distribution et le stockage des denrées alimentaires, ils subissent des détériorations par le biais de produits chimiques et par des processus microbiens. Plusieurs études ont montré que la viande est plus susceptible d'être contaminée et altérée par différentes bactéries et surtout les bactéries sporulantes tel que *Bacillus cereus* et des bactéries productrices de toxines tel que *Staphylococcus aureus*. Plusieurs études antérieures ont montré la capacité de telles bactéries à adhérer et à former des biofilms dans les lignes de production et de transformation alimentaires y compris celle de la viande (**Ayari et al., 2015**).



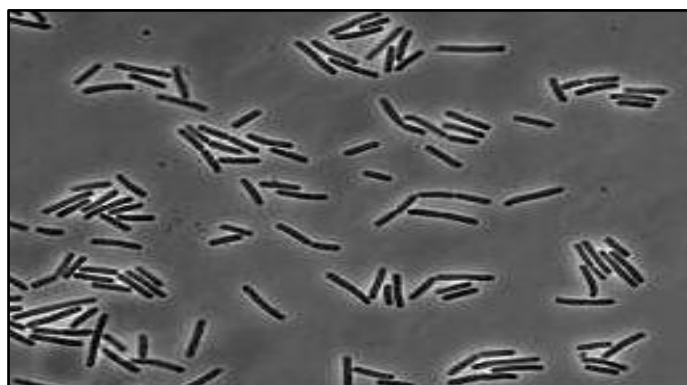
**Chapitre 2 : Généralités sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*****2.1. . Généralités sur *Bacillus cereus* :**

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont des bactéries à Gram positif, mobiles, formatrices d'endospores, thermorésistantes, anaérobies facultatives (Delanas, 2014). *Bacillus spp* a été signalée à avoir une tolérance aux conditions défavorables telle que la pasteurisation ou l'acidité rencontrée dans l'estomac (Laouami, 2012 ; Chitra Pandey *et al.*, 2018).

**2.1.1. Taxonomie et caractéristiques :**

*Bacillus cereus* appartient au domaine des Eubactéries, phylum des Firmicutes (bactéries à bas G+C % et à coloration de Gram positive), classe des Bacilli, l'ordre des Bacilliales et la famille des *Bacillaceae* (Dromigny, 2008). Le genre *Bacillus* renferme plus de 90 espèces, dont certaines forment le groupe «*Bacillus cereus*» qui rassemble *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. pseudomycoide*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis* (Delanas, 2014).

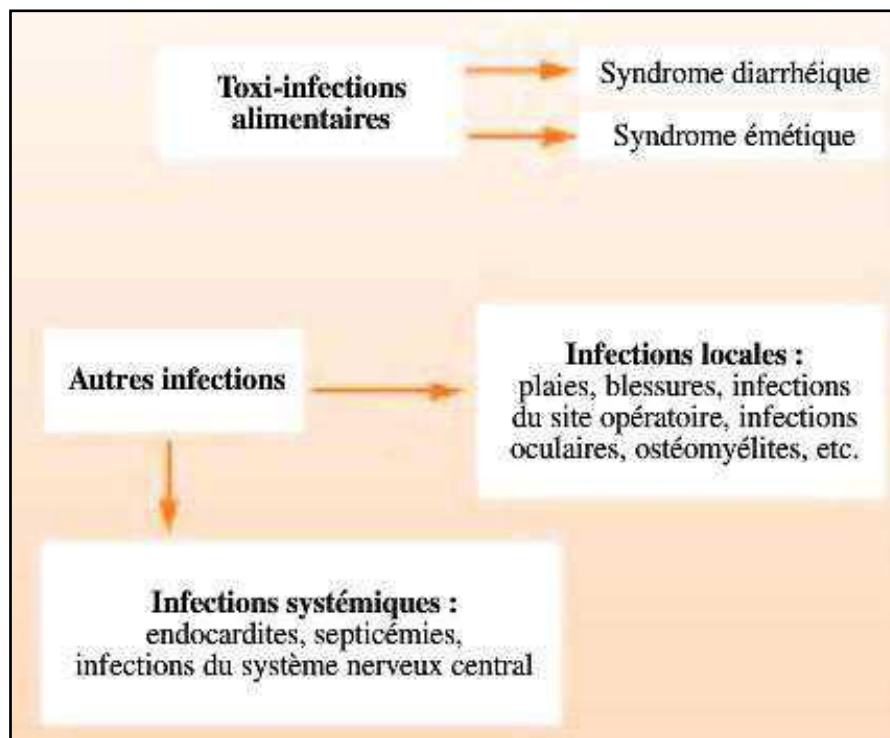
*Bacillus cereus* est un agent pathogène d'origine alimentaire. Il est ubiquitaire dans la nature, couramment présent dans les aliments. C'est un microorganisme opportuniste largement reconnu comme agent étiologique des épidémies d'origine alimentaire (Lopez *et al.*, 2014). Il a été isolé des fruits, légumes, noix, céréales, lait et produits laitiers, viande, aliments séchés et épices (RijuBasu *et al.*, 2016). Les viandes non cuites et cuites sont considérées comme des substrats favorables pour le développement de *B. cereus*. Elle a contribué à 9% de la charge totale des microorganismes isolés à partir de la viande fraîche du marché international (Ayari *et al.*, 2012). *Bacillus cereus* peut former des biofilms qui agissent comme une source de contamination persistante (Shakhawat et Deog-Hwan, 2017).



**Figure 2 : La forme de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) sous microscopie optique (Laouami, 2012).**

**2.1.2 Pathogénicité de *Bacillus cereus*** : *B. cereus* cause d'importantes maladies d'origine alimentaire. Elle est fréquemment impliquée dans des épidémies d'origine alimentaire à partir des aliments traités thermiquement en raison de leurs endospores et de l'absence de flore compétitive et provoque la détérioration des aliments qu'elle contamine (RijuBasu *et al.*, 2016).

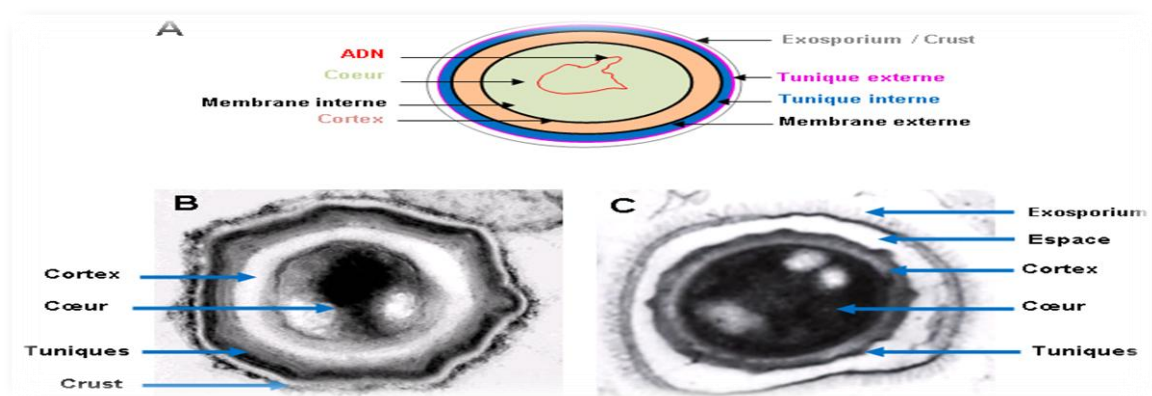
Ce pathogène provoque deux types d'intoxication alimentaire distinctes : le type diarrhéique et le type émétique. Le syndrome diarrhéique est causé par des entérotoxines complexes produites lors de la croissance végétative du microorganisme dans l'intestin grêle. Ces toxines (hémolysine BL et l'entérotoxine non hémolytique Nhe) agissent sur les cellules épithéliales tout en provoquant une sécrétion massive du liquide dans la lumière intestinale. Le syndrome émétique est causé par la toxine émétique produite par les bactéries au cours de leur croissance dans les aliments qui affecte les nerfs (RijuBasu *et al.*, 2016). En plus des toxines produites (figure 3), *Bacillus cereus* provoque des infections locales (plaies et blessures) et des infections systémiques (le système nerveux central) (Laouami, 2012 ; Shakhawat et Hwan, 2017).



**Figure 3** : Infections causées par *B. cereus* chez l'homme (Laouami, 2012).

**2.1.3. La sporulation de *Bacillus cereus* :** La sporulation est le processus qui conduit à la formation d'une forme cellulaire de résistance qui s'appuie sur une morphologie unique et remarquable. En 1876, Robert Koch et Ferdinand Cohn publient la première description morphologique des endospores de *B. anthracis* et *B. subtilis* (Loison, 2013). Les bactéries sporulées les plus fréquentes dans les aliments appartiennent aux genres *Bacillus* et *Clostridium*. La majorité des espèces sont des flores d'altération des aliments (coagulation du lait, développement d'odeurs, gonflement des boîtes de conserve et des emballages...), certaines espèces peuvent être pathogènes pour l'homme et agissent par l'intermédiaire de toxines (Christieans *et al.*, 2011).

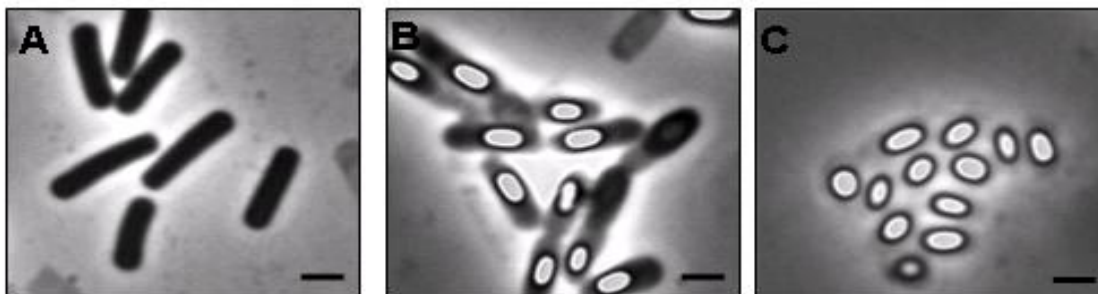
**2.1.3.1. Structure de la spore:** La description de la structure d la spore est schématisée dans la figure ci-dessous. La spore de *Bacillus cereus* se compose d'une multitude de couches survivant à protéger leur génome dans un espace central déshydraté. Chaque couche possède des spécificités notamment en termes de composition (Loison, 2013). La membrane interne peut être visible sur des coupes de spores mais la membrane externe l'est plus rarement. Le centre de la spore est protégé par le cortex et les tuniques qui se séparent en deux couches la tunique interne et la tunique externe. Selon les espèces un exosporium entoure les tuniques. L'exosporium constitué d'une base et de projections aériennes est séparé des tuniques par un espace (McKenney *et al.*, 2010 ; McKenzie *et al.*, 2013 ; Bressuire-Isoard, 2015).



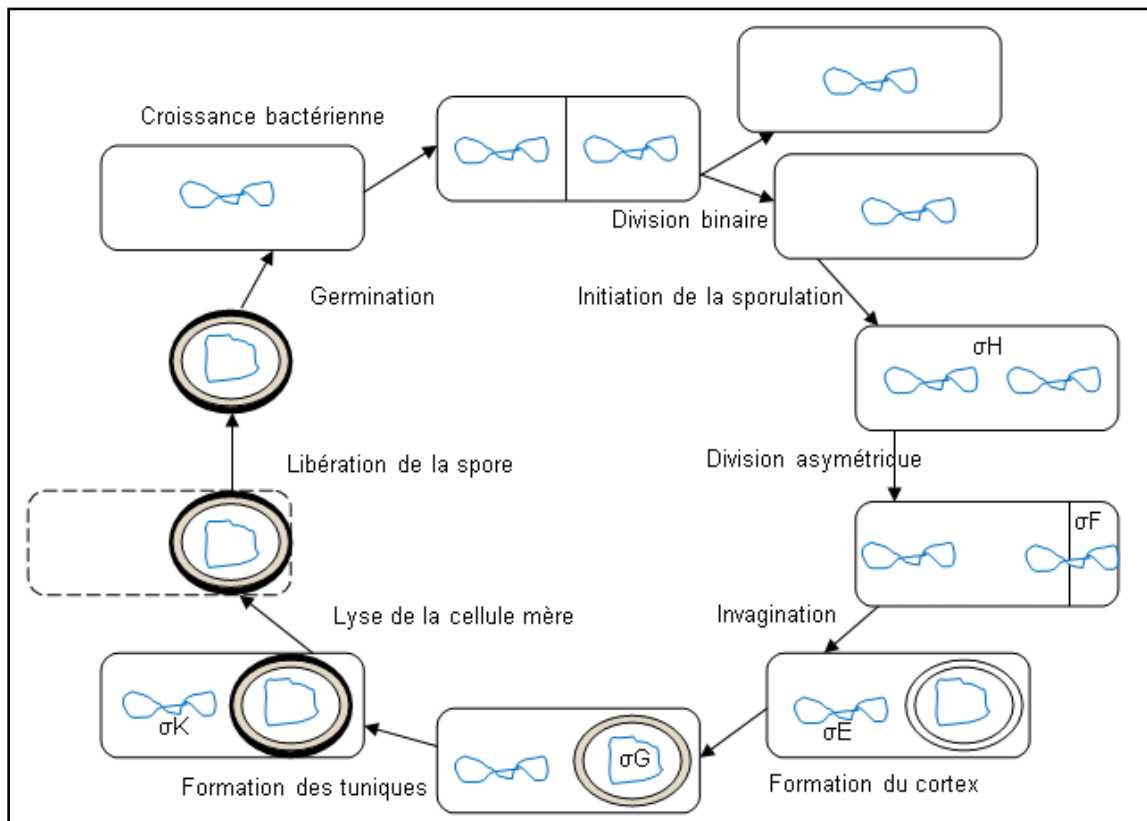
**Figure 4 :** Observation et descriptif de la structure des spores de *Bacillus* (A) : structure schématisée, (B) : Observation au microscope électronique à transmission (MET) de coupes de spores de *B. subtilis* marquées au rouge de ruthénium pour visualiser l'exosporium (McKenney *et al.*, 2010), échelle: 0,125 nm et (C) : *B. anthracis* marquées au tétraxide d'osmium (McKenney *et al.*, 2013).

**2.1.3.2. Cycle de sporulation :** Le processus de la sporulation est affecté par les conditions environnementales incluant la composition moyenne du milieu, disponibilité en minéraux, activité de l'eau du milieu, température de sporulation (22°C), disponibilité en oxygène et la distribution spatiale dans la culture liquide contre la surface de gélose (**Hayrapetyan, 2015**). Le cycle de sporulation se compose de plusieurs étapes schématisées dans la figure 4. Pendant la croissance bactérienne, l'ADN se réplique, puis la cellule se divise symétriquement et donne deux cellules filles. La sporulation initiée est visible par la mise en place d'un septum asymétrique séparant les deux copies du chromosome en deux compartiments : une cellule mère et une pré-spore où  $\sigma F$  devient actif. Après l'invagination, le facteur  $\sigma E$  est actif dans la cellule mère puis le cortex se met en place parallèlement à l'activation de  $\sigma G$  dans la pré-spore. Le facteur  $\sigma K$  devient actif et les tuniques se mettent en place autour de l'endospore. Après la lyse cellulaire, la spore est libérée et peut redonner une cellule par germination (**De Hoon et al., 2010**). La figure 5 montre par le biais du microscope électronique le processus de sporulation chez *Bacillus cereus*.

La germination des spores en cellules végétatives occupent un intérêt considérable pour l'alimentation des micro-organismes car c'est non seulement un point de contrôle pour empêcher la production de toxine, mais aussi une méthode de réduire la dormance et la résistance des spores (**AswathiSoni et al., 2018**).



**Figure 5 :** Observation microscopique de *Bacillus cereus* au cours de sa sporulation. Des cellules végétatives ; (B) : Des endospores ; et (C) : Spores (**Bressuire-Isoard, 2015**).



**Figure 6:** Cycle de la sporulation et régulation génétique chez *Bacillus subtilis* (De Hoonet al., 2010)

**2.1.3.3. Caractéristiques des spores :** Le genre *Bacillus*, y compris *Clostridium*, est thermorésistant grâce à la formation des spores capables de supporter des températures supérieures à 100°C pour des durées de traitement de plusieurs minutes, de résister à la cuisson des aliments et de s’y multiplier potentiellement durant la conservation. Pour pallier à cette problématique, les industriels ont développé des stratégies pour détruire les spores (traitements thermiques comme l’appertisation ou le traitement UHT) ou inhiber le développement des formes végétatives et sporulées via l’acidification, l’ajout de sel ou d’additifs de conservation (Christieans et al., 2011).

Il a été signalé que la sporulation pourrait se produire dans les biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments et le niveau de sporulation dépend de la souche et du milieu de croissance. Les conditions nutritionnelles minimales favorisent la formation du biofilm ou la sporulation des cellules de *Bacillus*.

Les spores sont souvent définies comme dormantes, inertes ou métaboliquement inactives. Cette activité métabolique extrêmement réduite des spores est à l’origine de leur extrême longévité (Bressuire-Isoard, 2015).

Les souches de *Bacillus* ont pu former des biofilms mono-espèces sur des coupons en acier inoxydable et des biofilms mixtes avec des souches résidentes et que la sporulation se produisait encore facilement dans ces structures complexes. Ces spores étaient très résistantes au nettoyage mais étaient facilement transférées sur l'agar.

*Bacillus* provoque la contamination alimentaires croisées (Faïlle *et al.*, 2014 ; Rajamani *et al.*, 2019).

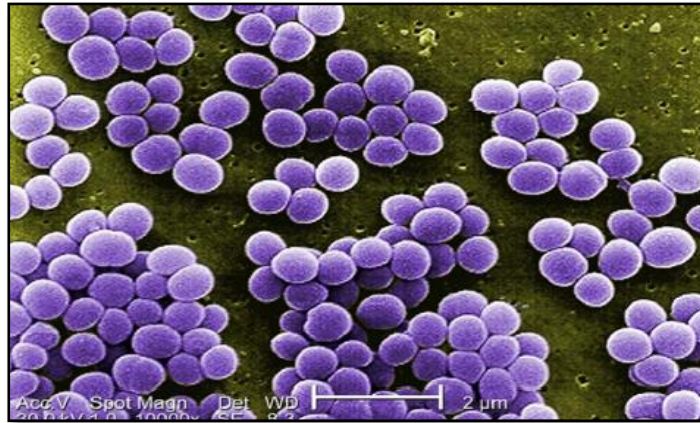
Les spores de *Bacillus cereus* posent un défi à l'industrie alimentaire car elles résistent aux traitements thermiques (sauf la mise en autoclave) et ont été détectés dans une large gamme de produits alimentaires y compris le riz cuit, aliments à faible teneur en eau comme les épices et le lait en poudre ainsi que pasteurisés, produits alimentaires réfrigérés. Sous conditions favorables, les spores de *B. cereus* peuvent germer en cellules végétatives, capables de produire deux types de toxines (Faïlle *et al.*, 2014).

Pour le genre *Bacillus*, l'espèce *B. cereus*, suivie par *B. subtilis* sont les plus étudiées (Christieans *et al.*, 2011). Les souches de *Bacillus* sont souvent isolées de biofilms dans les industries alimentaires.

Certaines bactéries, appartenant aux genres *Bacillus*, *Clostridium* (bâtonnets) ou *Sporosarcina* (coques) sont capables dans des conditions défavorables, de produire une structure de résistance particulière : l'endospore. Les spores de ce microorganisme peut survivre à la pasteurisation et se retrouver dans le produit final avec le potentiel de causer la détérioration et l'intoxication alimentaire, en particulier puisque la pasteurisation élimine la plupart des formes végétatives des bactéries (Hayrapetyan, 2015).

## 2.2. Généralité sur les *Staphylococcus aureus* :

Staphylocoques sont des cocci à Gram positive, catalase positive, coagulase positive ou négative selon les espèces et thermo-nucléase positive (DjalmaChaves, 2017). *Staphylococcus spp.*, sont souvent associés aux intoxications alimentaires et aux épidémies dans le monde entier en raison de leurs capacité à produire plusieurs types d'entérotoxines (Viçosa, 2009).



**Figure 1 :** Observation par microscope électronique à balayage de *Staphylococcus aureus* (Rubab *et al.*, 2018)

**2.2.1. Définition des *Staphylococcus aureus* :** C'est un coccus à Gram positif, anaérobie facultatif, non mobile et ne forme pas de spores. Elles sont mésophiles et produisent des entérotoxines thermostables à des températures comprises entre 10 °C et 46 °C responsable des intoxications alimentaires (Kroning, 2016 ; Chang, 2017 ; Papadopoulos, 2017 ; Qiuchun Lia, 2018).

**2.2.2. Pouvoir pathogène :** Ce germe est largement distribué dans la nature. Il est présent dans l'air, eau et nourriture; à la surface du corps humain, dans la cavité nasale, sur le pelage des animaux et dans l'appareil digestif tract parmi d'autres sites. *S. aureus* a été responsable de plusieurs maladies infectieuses, y compris infections tissulaires et cutanées, pneumonie, septicémie, mammite, arthrite et infections des tissus mous (Qiuchun Lia, 2018). Ils peuvent coloniser des volailles saines, être isolé dans les usines de transformation de la volaille, et du poulet au détail avec des résistances aux antimicrobiens (Dupre, 2019). L'intoxication alimentaire due au staphylocoque est provoquée par l'ingestion orale des produits alimentaires contaminés par des entérotoxines staphylococciques (Wakabayashi *et al.*, 2017 ; Dupre, 2019).

La virulence de *Staphylococcus aureus* est un processus multifactoriel impliquant la production de diverses protéines liées et sécrétées aux cellules ainsi que la formation de biofilm (SchneidKroning, 2016). Les entérotoxines classiques à staphylocoques (A, B, C, D et E) sont responsables de 95% des épidémies d'intoxication alimentaire, et les entérotoxines A et C sont les plus courantes (SchneidKroning, 2016). Les entérotoxines sont thermostable et peuvent maintenir leur stabilité même après les traitements thermique généralement employés dans les industries alimentaires. Cela représente un risque pour les consommateurs d'où la nécessité de contrôler ces micro-

organismes au cours des premières étapes de la production (NogueiraViçosa, 2009). La virulence implique également la présence de l'opéron *ica* qui est responsable de la production du polysaccharide d'adhésion intercellulaire (PIA), et par conséquent, la formation de biofilm (SchneidKroning, 2016). Elle est aussi exprimée par la capacité des *S. aureus* d'acquérir des déterminants de la résistance aux antibiotiques (Papadopoulos, 2017).



### Chapitre 3 : Effet de l'acide acétique et de l'acide citrique sur la formation des biofilms

Les maladies d'origine alimentaire entraînent des taux de mortalité élevé dans le monde entier. Selon le rapport de l'Organisation mondiale de la santé en 2015, 420000 personnes sont décédées dans le monde après avoir consommé des aliments contaminés par des bactéries pathogènes. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments a indiqué que les viandes sont les principaux sources des agents pathogènes d'origine alimentaire (Hoa Van Ba *et al.*, 2000), notamment *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, et *staphylococcus aureus* qui pourraient se fixer et se former un biofilm dans un environnement de transformation des aliments tel que le verre, le métal, et l'acier inoxydable (Akbas, 2015). Ces deux éléments (la souche bactérienne et le matériau de surface en contact avec les aliments) sont les facteurs les plus importants pour la formation des biofilms et peuvent entraîner une détérioration des aliments et la transmission des maladies (Akbas et Cag, 2016). Donc, de nombreuses recherches sur la prévention et l'éradication de la formation des biofilms ont été menées pendant plusieurs années (Rode *et al.*, 2007 ; Akbas, 2015).

Les acides organiques sont parmi les nouvelles approches sécurisées pour le contrôle de la formation de biofilm (Akbas, 2015). Les acides organiques sont naturellement présents dans les fruits et les aliments fermentés (Akbas et Olmez, 2007), ils sont obtenus par fermentation et extraction et ils sont utilisés comme acidulant antimicrobien contre les bactéries et les levures, et comme des agents aromatisants et des conservateurs des aliments (Mogosanu *et al.*, 2017). Il est observé que l'effet antimicrobien des acides organiques varie d'un acide à un autre (Garzoni et Kelley, 2009 ; Akbas et Kokumer, 2015 ; Akbas et Cag, 2016).

#### 3.1. . L'acide acétique :

C'est un acide faible qui peut être produit soit par fermentation de l'éthanol (acide éthanoïque) soit par synthèse (Bjarnsholt *et al.*, 2014). Il est considéré comme le composant principal de vinaigre et joue un rôle important dans les domaines de la médecine, l'industrie alimentaire et la chimie (Yang *et al.*, 2018). Le vinaigre (concentration de l'acide acétique égale à 20%) est utilisé comme agent de conservation naturel pour la prévention de la détérioration de divers produits alimentaires : viandes,

saucés, cornichons (Mogosanu *et al.*, 2017). La figure 8 représente la structure de l'acide acétique.

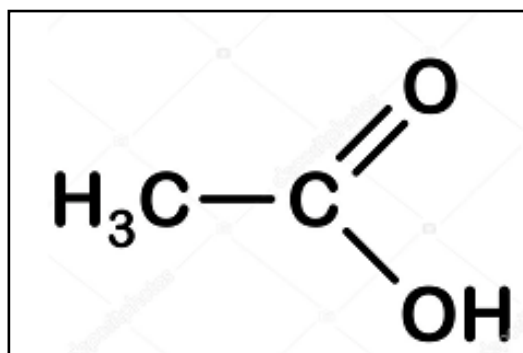


Figure 8 : Structure de l'acide acétique (Site web 1).

### 3.2. L'acide citrique:

C'est un acide tricarboxylique hydroxyle à six atomes de carbone et il constitue le principale acide organique des agrumes. Il a nombreuses applications comme agent de conservation des aliments et il est capable d'inhiber une grande variété de microorganismes grâce à sa capacité d'abaissement du pH. L'acide citrique fonctionne également comme un agent de chélation des métaux (Akbas et Cag, 2016). La figure 9 représente la structure de l'acide acétique.

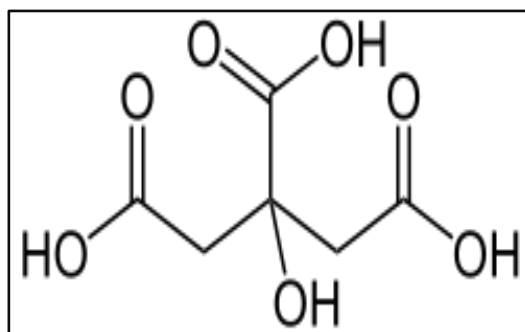


Figure 9 : Structure de l'acide citrique (Site web 2).

### 3.3. . L'effet antibactérien de l'acide acétique et de l'acide citrique :

En plus d'être les agents antimicrobiens les plus largement utilisées pour la décontamination des carcasses des viandes dans nombreux pays comme les Etas Unis et Canada. Les acides organiques comme l'acide acétique et l'acide citrique ont un effet antioxydant pouvant éliminer une couche minérale et biologique de la surface des

racines et le même effet attendu dans les biofilms (**Ba et al., 2000**). L'action des acides organiques dépend de plusieurs facteurs (**Lecompte, 2008**) :

- Le type d'acide
- Le pH : plus le pH est faible, plus l'action est importante.
- Le degré de dissociation de l'acide : les acides faibles non dissociés sont plus efficace. Pour inhiber et détruire les microorganismes que les formes dissociés.

L'acide acétique ou l'acide citrique traversent la membrane cellulaire, à l'intérieur des cellules. Le pH intracellulaire élevé provoque la dissociation de l'acide et la libération des anions et des protons chargés qui ne peuvent plus traverser la membrane en sens inverse. Une augmentation de la concentration en acide dans la cellule provoque des différents effets concourent à l'inhibition de la croissance bactérienne tels que :

- La rupture de la membrane bactérienne et modification de sa perméabilité.
- L'inhibition des réactions métaboliques vitales.
- Un stress lié à l'homéostasie du pH intracellulaire par un changement de gradient d'hydrogène entre les sites intracellulaires et extracellulaires.
- Accumulation des anions toxiques (**Souza et al., 2000 ; Lecompte, 2008**).

La combinaison d'acide acétique et citrique a montré une activité antimicrobienne plus élevée lorsque l'un des deux acides était utilisé individuellement et ils représentent un effet de rémanence extrêmes intéressent et peu d'effets indésirables et autorisés dans l'alimentation humaine (**Lecompte, 2008 ; Al Rouzan, 2017**).

**Partie II :**

**Matériel et Méthodes**

**Chapitre 1 : Évaluation de la capacité de formation des biofilms :****1.1. Origine des souches :**

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

**1.2. Revivification des souches :**

Une fraction issue du stock des cultures sur glycérol de chaque souche à tester est transférée dans 7ml du bouillon BHIB (Liofilchem, Italy) et incubée à 37°C pendant 24h. Chaque souche est étalée, après homogénéisation au vortex, sur une boîte de pétri contenant une gélose BHIA (Liofilchem, Italy) pour les souches de *Bacillus cereus* et une gélose Baird Parker pour les souches de *Staphylococcus aureus*. L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 24h.

**1.3. Observation microscopique :**

Afin de vérifier la pureté des souches une observation microscopique est réalisée. Des frottis bactériens sont préparés puis colorés avec le bleu de méthylène. L'observation est réalisée au microscope optique au grossissement 100.

**1.4. Conservation des souches :**

Des tubes de gélose inclinée de 5ml sont préparés et ensemencés par stries à partir des cultures pures de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. Après l'incubation les tubes sont récupérés et conservés au réfrigérateur à 4°C pendant 20 jours.

### **1.5. Évaluation de la capacité de formation de biofilm :**

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

**1.5.1.1. Principe de la technique :** La méthode de plaque de titration décrit par **O'Toole et al., (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm. Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits.

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion cœur cerveau (BHIB), les puits d'une microplaque de 96 puits sont inoculés avec des bactéries. Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec de tampon phosphate salin (PBS) (**Figure 10**).

Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 1%. En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm, les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (**Mathur et al., 2006 ; Afreenich et al., 2011**).

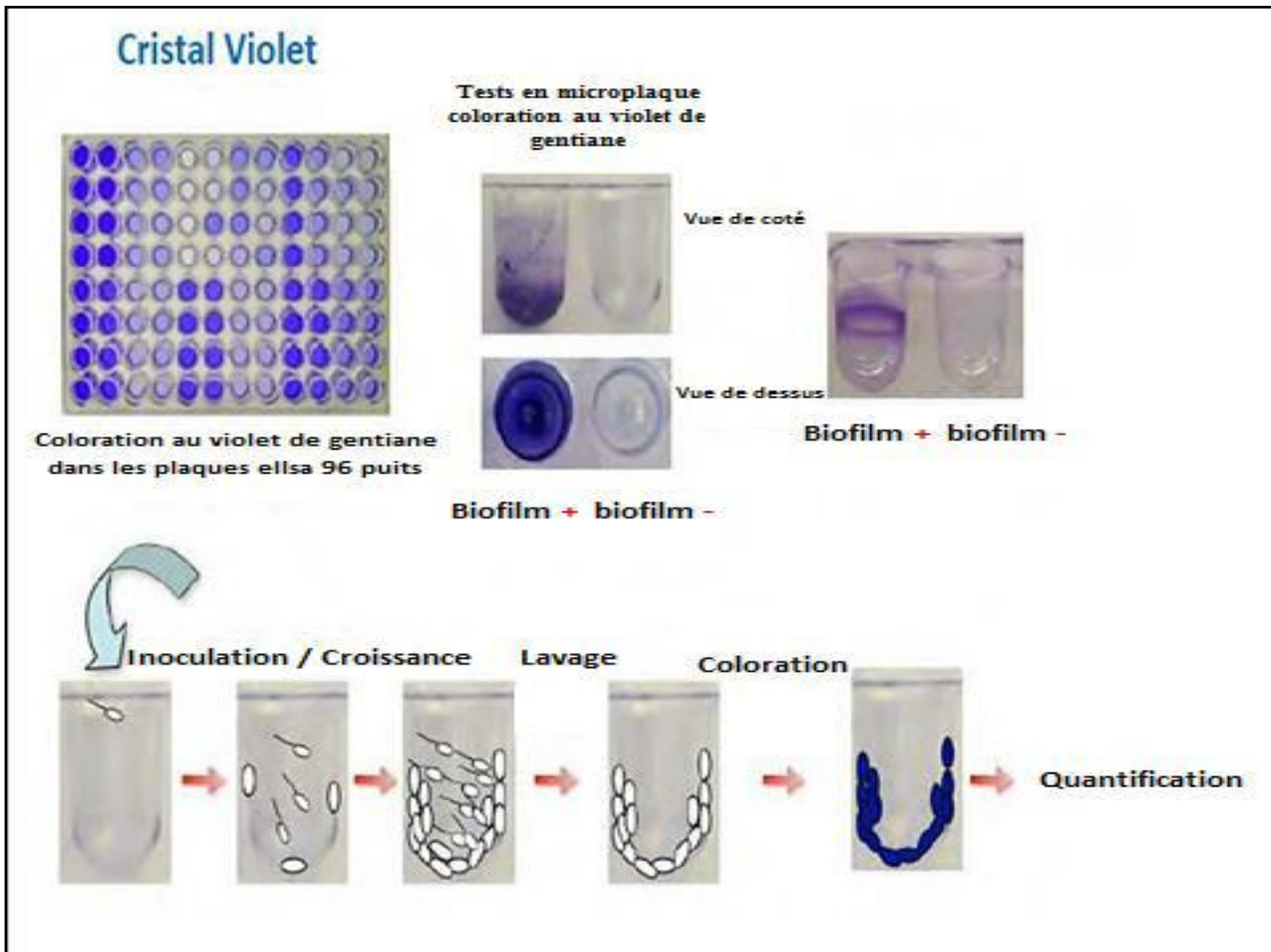


Figure 10 : Formation de biofilm en microplaque (Mathur *et al.*, 2006).

**1.5.1.2. Préparation de la suspension sporale et bactérienne :** La suspension sporale des *Bacillus cereus* est réalisée selon le protocole décrit par Mazas (1995). Une pré-culture est préparée à partir des géloses inclinées. Une fraction de chaque souche de *Bacillus cereus* est ensemencée dans 5ml de bouillon BHIB (Liofilchem, Italy) puis incubée 30°C pendant 24 heures. Une gélose fortifiée est préparée en ajoutant à la gélose nutritive (Conda, Espagne) 50ml/l  $MnSO_4$  et 60mg/l  $CaCl_2$ . À partir de la pré-culture un volume de 0,3ml est ensemencé sur la gélose fortifiée et incubé à 30°C pendant 10 jours. Les tapis formés à la surface de la gélose sont raclés dans 3ml d'eau distillée stérile et sont transférées dans des tubes coniques. Les suspensions sporales sont centrifugées à 6500 tours par minute pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et les spores sont lavées avec l'eau distillée stérile. Une deuxième centrifugation à 6500 tours/min pendant 15 minutes est réalisée. Le surnageant est jeté et le culot est conservé dans le réfrigérateur à 4 °C dans un volume de 3ml d'eau distillée stérile additionnée d'éthanol (50/50 v/v).

Pour les souches de *Staphylococcus aureus*, 5 ml de BHIB (Liofilchem, Italy) est ensemencé à partir des souches conservées sur gélose inclinée et incubé à 37°C/24h.

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

L'ensemencement des microplaques de titration est réalisé comme suit, chaque puit est rempli par 200 $\mu$ l de BHIB (Liofilchem, Italy) à 0,25% glucose et 10 $\mu$ l des cultures bactériennes de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*. Chaque souche est inoculée dans trois puits et testée à deux reprises. Les puits du contrôle sont remplis avec BHIB (Liofilchem, Italy) à 0,25% glucose stérile. L'ensemble des microplaques est incubé à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les cultures sont éliminées. Afin d'exclure les cellules non adhérentes, les puits sont lavés deux fois par le PBS et laissés sécher à l'air libre pendant 15 minutes. Les microplaques sont remplies par 250 $\mu$ l de cristal violet à 1% pendant 15 minutes à température ambiante. Une fois le cristal violet est éliminé, les puits sont rincés plusieurs fois avec le PBS et séchés à l'air libre pendant 15 minutes. Un volume de 200 $\mu$ l d'acide acétique à 33% est ajouté dans les puits et laisser agir 30 minutes. La densité optique à 595nm est mesurée (BioTek, ELx808). Les souches sont classées comme suit (Stepanovic et al., 2000):

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

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

**1.5.2.1. Principe de la technique :** Selon Freeman et al., (1989), la gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de biofilm. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellulaire Adhésion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (Ziebuhr et al., 2001; Nagaveni et al., 2010).

Après 24 heures d'incubation à 37°C les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir à surface rugueuse qui montre la production de slime et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Ziebuhr et al., 2001; Mathur et al., 2006; Afreenich et al., 2011; Nasr et al. 2012; Rewatkar et Wadher, 2013).



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

**1.5.2.3. Protocole :** Selon Freeman *et al.*, (1989), la gélose au Rouge Congo est préparée par l'addition de 37 g/l de bouillon BHIB (Merck, Germany), 50 g/l de saccharose, 10 g/l de l'agar bactériologique, et 0,8g/l de Rouge Congo (Fluka, India). À partir de la suspension sporale et de la suspension bactérienne des boîtes au Rouge Congo sont ensemencées par épuisement et incubées à 37°C pendant 24-48h. Les souches productrices de slime donneront des colonies noires à surfaces rugueuse alors qu'un résultat négatif indiquera des colonies rouges à surface lisse. Les souches de phénotype variable donneront des colonies à centre noir et contour rouge ou à centre rouge et contour noir.

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

**1.5.3.1. Préparation des surfaces :** Des surfaces en acier inoxydable de type AISI 304 et de taille 2.5x1 cm ont été utilisées. Ces surfaces solides sont utilisées pour examiner *in vitro* la capacité de nos souches à former le biofilm. Les lames sont nettoyées et stérilisées selon la méthode décrite par Rossoni et Gaylarde (2000). Elles sont rincées par l'acétone (EMSURE, Germany) pur, puis lavées par immersion dans NaOH à 1% (p/v) à PH = 13.2 pendant 1h. Un rinçage à l'eau distillée stérile et un séchage sont appliqués. Ensuite les lames sont lavées avec l'alcool à 70% (v/v), rincées avec EDS et séchées pendant 2 heures à 60°C. Placées dans une boîte de pétri, les lames sont autoclavées à 121°C pendant 20 minute.

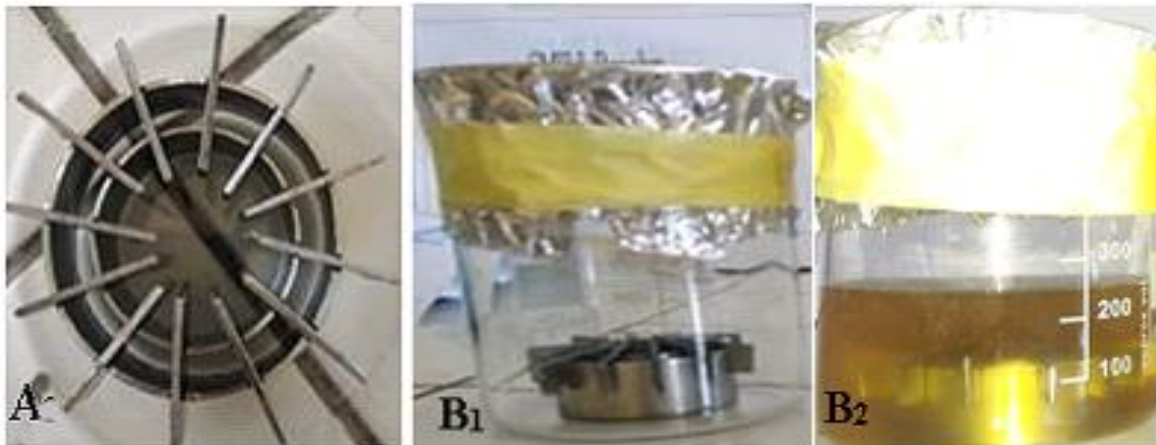
**1.5.3.2. Préparation de la suspension sporale et la suspension bactérienne :** comme décrit précédemment.

**1.5.3.3. Protocole :** Le protocole appliqué est celui décrit par **Paytubi *et al.*, (2014)** avec quelques modifications. Les lames sont placées dans des boîtes de pétri stériles. Un volume de 20 ml de la culture bactérienne est coulé dans les boîtes. L'incubation est faite à 37°C pendant 24, 48 et 72 h. Après chaque période d'incubation les lames sont rincées 3 fois avec PBS pendant 10 secondes pour éliminer les cellules non adhérentes. Les biofilms ainsi formés sont fixés par incubation à 80°C pendant 30 minutes. Les lames sont immergées dans le CV à 1 % (p/v) pendant 15 min pour une évaluation quantitative. Ensuite elles sont rincées avec l'eau et séchées à l'air. Les lames sont placées dans 5 ml de l'acide acétique à 30% avec une agitation vigoureuse pendant 30 minutes. La densité optique est mesurée à 595nm comme étape finale. Les souches sont classées comme suit (**Stepanovic *et al.*, 2000**):

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

## Chapitre 2 : Évolution de l'effet de l'acide acétique et l'acide citrique sur des biofilms à *Staphylococcus aureus* :

**2.1. Préparation des systèmes** : le modèle expérimental utilisé dans cette étude pour la formation des biofilm est inspiré des systèmes utilisés par **Gram et al.,(2007)** et par **Bagge et al., (2001)**. Le système est constitué de deux cercles en acier inoxydable (AISI, 304), dans lesquels 12 coupons de la même matière sont tenus en position verticale et radiale (voir figure). Les lames font 2.5 cm de longueur et 1 cm de largeur et ont une épaisseur de 1mm. L'ensemble du système est nettoyé comme décrit précédemment et placé dans un bécher stérile et couvert par du papier aluminium avant sont autoclavage.



**Figure 11:** (A) : La composition du dispositif d'acier inoxydable: deux cercles sur lesquelles 12 lames du même diamètre disposées verticalement, (B<sub>1</sub>) : Le modèle expérimental (Bécher + Le dispositif d'acier inoxydable) utilisé pour la formation de biofilm mono-espèce *Staphylococcus aureus*, (B<sub>2</sub>) : système Batch qui contient le dispositif expérimental, BHIB stérile (200ml) et la suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* (50ml) avant incubation.

**2.2. Préparation de la suspension bactérienne** : comme décrit précédemment.

### 2.3. Protocole de développement du biofilm mono-espèce à *Staphylococcus aureus* :

Les béchers contenant les systèmes sont remplis par un volume total de 250 ml, à savoir 200 ml de bouillon BHIB stérile et 50 ml la culture bactérienne de *Staphylococcus aureus*. L'incubation de l'ensemble est faite à 37°C pendant 7 jours. Sans renouvellement et sous agitation de 100 rpm.

#### 2.4. Traitement des biofilms :

Les tubes sont remplis par 5ml de l'acide acétique (Haneywell, Germany), acide citrique (SIGMA-ALDRICH, USA) aux concentrations suivantes : 1, 1.5, 2, 2.5 et 3% et 1, 2, 3, 4 et 5%, respectivement. Les lames sont retirées aseptiquement des béchers et rincées avec le PBS. Chaque lame est plongée dans le tube approprié, et laisser agir pendant 5, 10 et 15 minutes. Après les temps de traitement, chaque lame est rincée par le PBS. Les lames du contrôle sont soumises directement au démembrement.

#### 2.5. Démembrement des bactéries attachées sur les lames après les traitements :

Les lames sont transférées dans des tubes contenant 10ml de la solution saline, puis les tubes sont placés dans un bain à Ultrason 100MZ (WiseClean) pendant 2.5 minutes. Ensuite une homogénéisation pendant 3 secondes est assurée par le vortex. L'opération est répétée une autre fois. Une série de dilution décimale allant jusqu'à  $10^{-8}$  est réalisée. Un volume de 100 $\mu$ l à partir de chaque dilution estensemencé sur le milieu PCA et incubé à 37 °C pendant 24h puis passant au dénombrement. Les résultats sont exprimés en ufc/cm<sup>2</sup> selon la formule suivante :

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

- **n**: nombre de colonie compté sur la boite retenue ;
- **d**: taux de dilution ;
- **v** : volume total de la dilution qui a servi au dénombrement
- **S** : surface de la lame délimitée à 5 cm<sup>2</sup>.

Pour les lames témoin, le nombre est noté  $N_0$ , tandis que pour les lames traitées, le nombre est noté  $N_F$ . La réduction logarithmique des cellules de biofilm récupérées à partir de coupons de l'acier inoxydable a été déterminée de la manière suivante :

$$\text{Réduction Log} = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_F$$

- **$N_0$**  : nombre de cellules témoins non traitées ;
- **$N_F$**  : nombre de cellules récupérées après traitement.

**Partie III :**  
**Résultats et Discussion**

## Chapitre 1 : Évaluation de la capacité de formation des biofilms :

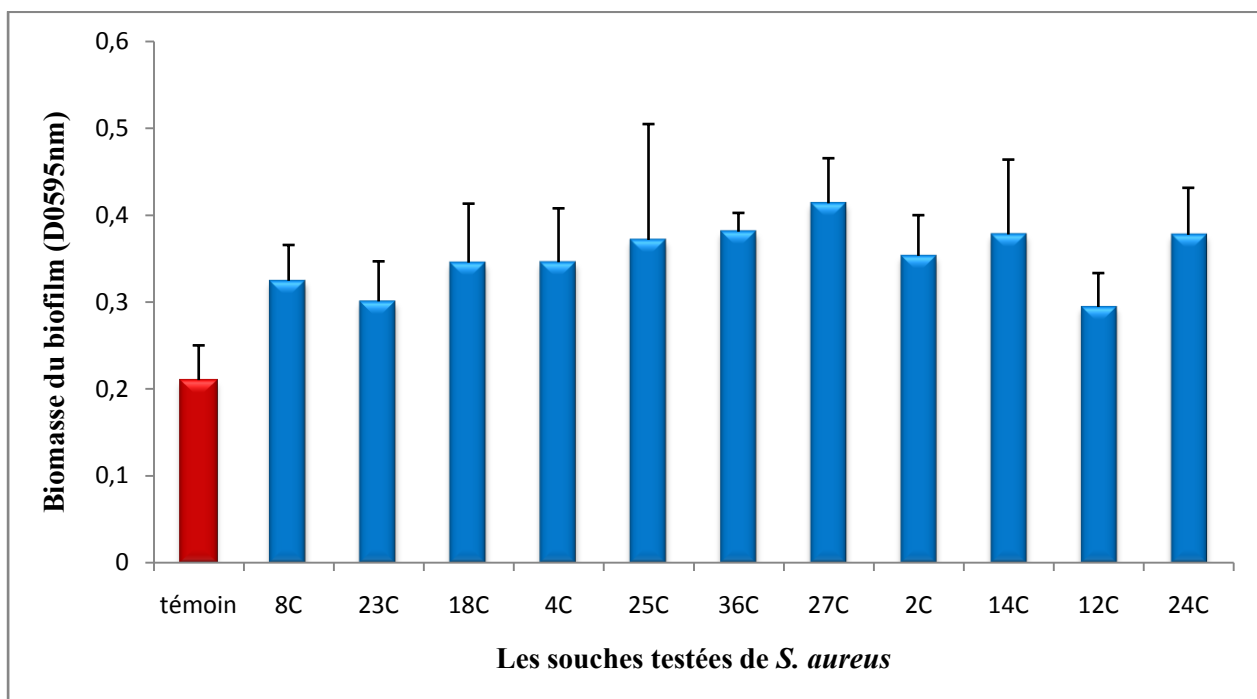
Une quantification de la biomasse du biofilm formé sur les microplaques de titration en PVC et en acier inoxydable est réalisée par un protocole de coloration au Cristal Violet à 1%. La solubilisation du CV est faite par l'acide acétique à 30%. La coloration de la biomasse formée permet une quantification plus précise du biofilm que l'observation visuelle et le tableau 2 ci-dessous a été envisagé les résultats.

### 3.1.1 Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par les microplaques de titration à 96puits en Polychlorure de Vinyle PVC :

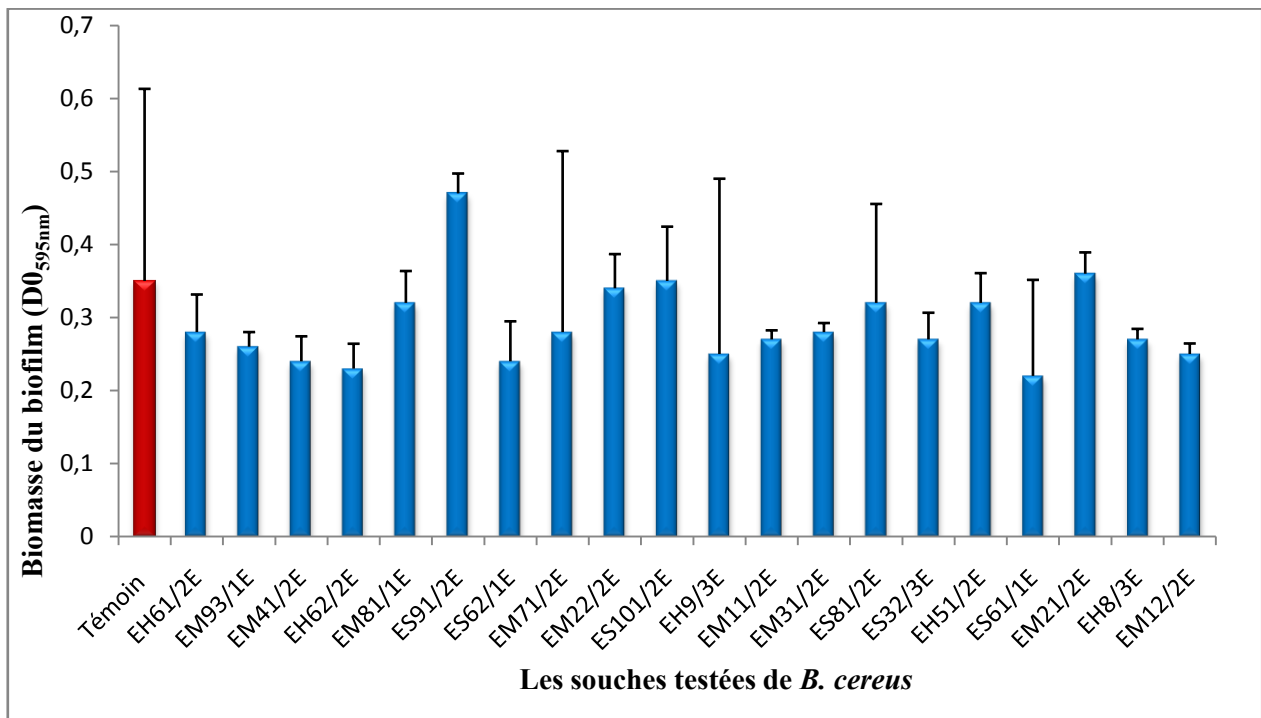
A partir d'un total de 31 souches, 13 souches présentaient une faible capacité de formation de biofilm, dont deux de *Bacillus cereus* et 11 souches de *Staphylococcus aureus*, et 18 souche de *B. cereu* sont classés comme non formatrice de biofilm.

La densité la plus importante est enregistrée chez la souche *S. aureus* (14C) avec une valeur (DO =0,41). Les résultats obtenus sont représentés dans les figures (12,13 et 14) pour *S. aureus* et *B. cereus*, respectivement. La figure 14 représente un exemple de microplaque de titration après coloration

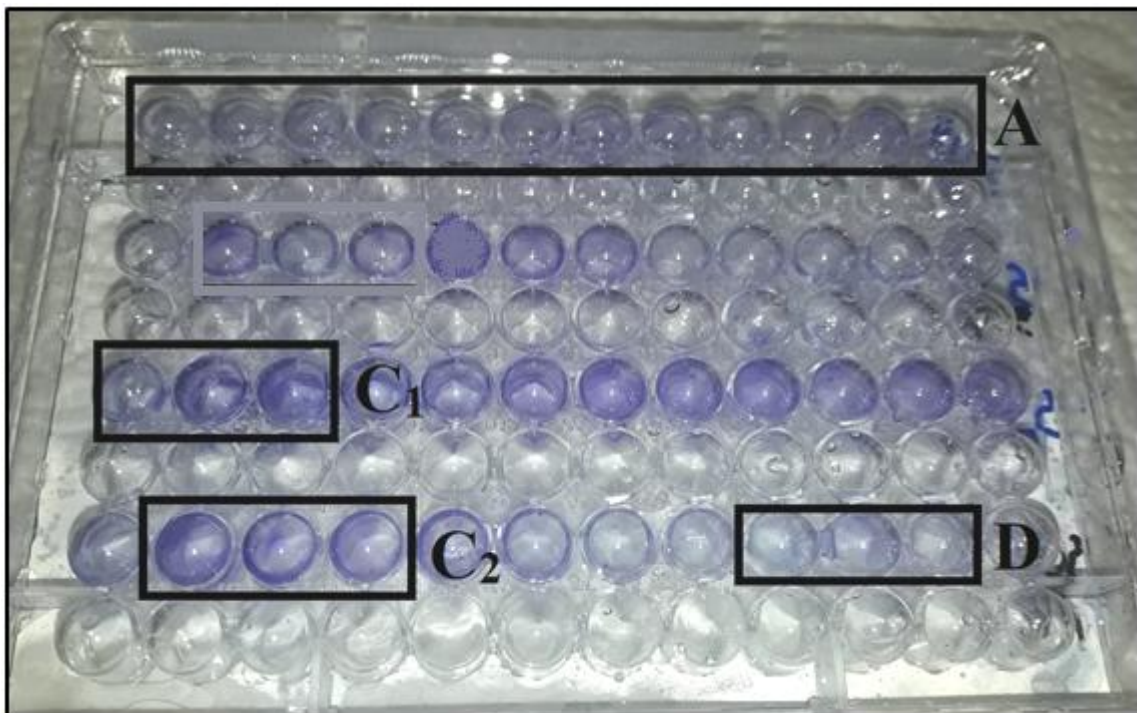
L'ensemble des résultats obtenus est indiqué dans le tableau 2.



**Figure 12 :** Quantification de la formation de biofilm (DO<sub>595nm</sub>) sur des microplaque de titration en PVC après une croissance statique des souches de *Staphylococcus aureus* à 37°C dans le milieu BHIB après 24 d'incubation.



**Figure 13 :** Quantification de la formation de biofilm ( $DO_{595nm}$ ) sur des microplaques de titration en PVC après une croissance statique des souches de *Bacillus cereus* à 37°C dans le milieu BHIB après 24 d'incubation.



**Figure 14 :** Évaluation du taux de la formation du biofilm par *B. cereus* par la révélation au cristal violet dans les plaques de titration au poly chlorure de Vinyle à 96-puits des souches Gram positif ; aspect des puits après coloration des souches. (A) : Control négatif, (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>): Faible capacité, (D) : Non productrices.

**Tableau 2:** Capacité des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen à former le biofilm dans les microplaques de titration en PCV.

Espèces	Négatif (-)	Faible (+)	Modéré (++)	Forte (+++)	Total
<i>Bacillus cereus</i>	18	2	0	0	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	11	0	0	11
<b>Total</b>	18	13	0	0	31

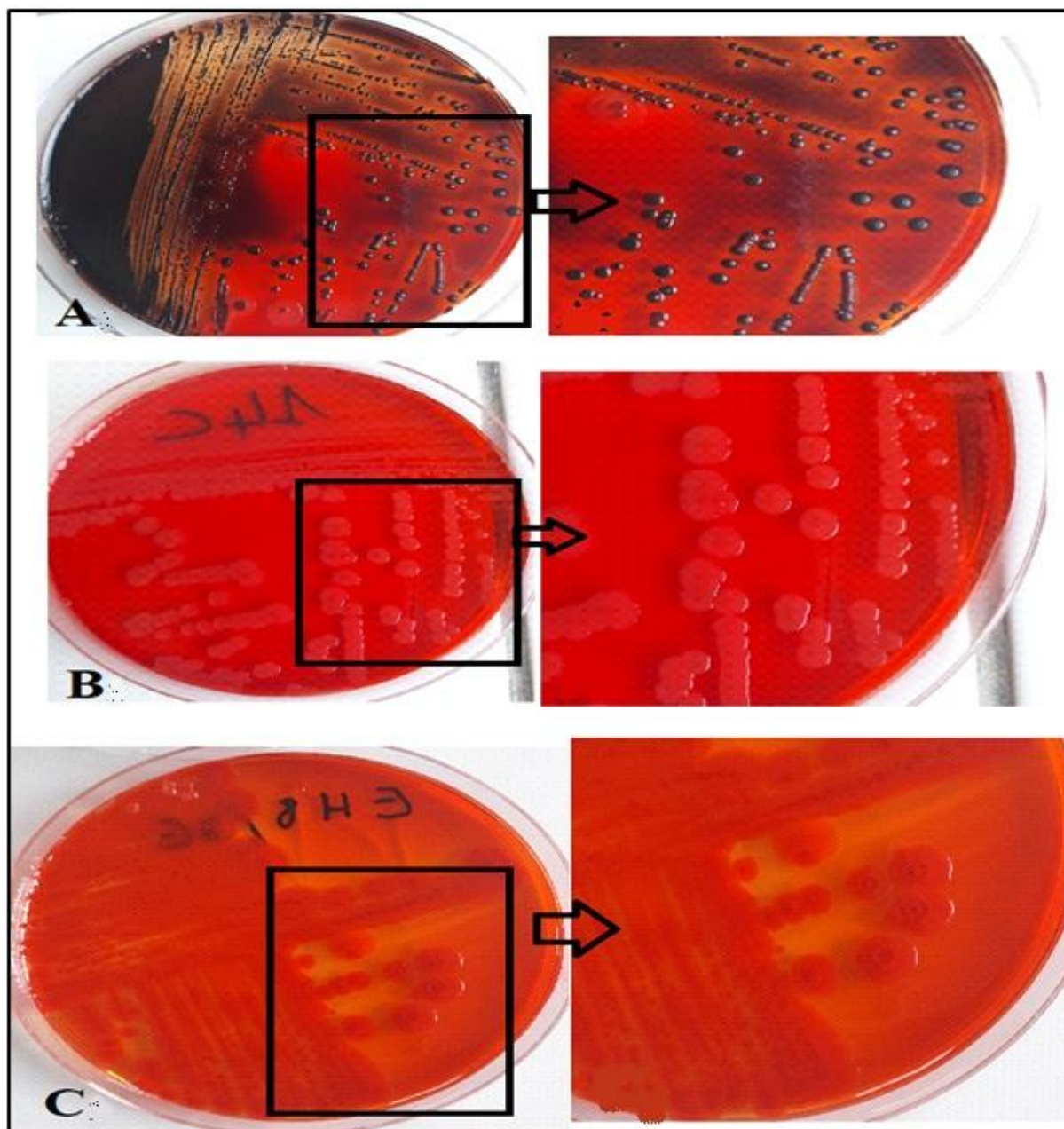
### 3.1.2 Caractérisation phénotypique de la formation de biofilm par la production de slime sur la gélose au Rouge Congo :

Une détection phénotypique a été réalisée sur la gélose au Rouge Congo (ARC). La lecture après les 24 h d'incubation sur le milieu ARC était suffisante pour permettre un résultat définitif de la totalité des souches testées.

A partir des résultats obtenus des 31 souches testées, 27.27% des souches de *S. aureus* sont capable de former des colonies noir sur la gélose au Rouge Congo, alors que 72.72% des souches de *S. aureus* et 100% des souches de *B. cereus* ne l'étaient pas.

La figure (15) et le tableau (3) représentent les résultats obtenus.





**Figure 15 :** (A) RCA-positive souche de *S. aureus* (colonies noires), (B) : RCA- négative souche des *Staphylococcus aureus* (colonies rouges), (C) : RCA- négative souche des *Bacillus cereus* (colonies rouges).

**Tableau 3:** Capacité des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen à produire le slime dans le gélose à rouge congo.

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

### 3.1.3 Évaluation de la capacité à former les biofilms sur les surfaces en acier inoxydable :

Une quantification de la biomasse du biofilm formé sur les surfaces en acier inoxydable est réalisée par un protocole de coloration au Cristal Violet à 1%. La solubilisation du CV est faite par l'acide acétique à 30%. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 16 et 17 pour les souches *B. cereus* et de *S. aureus* sur des lames en acier inoxydable 24, 48 et 72h, respectivement. La coloration de la biomasse formée permet une quantification plus précise du biofilm.

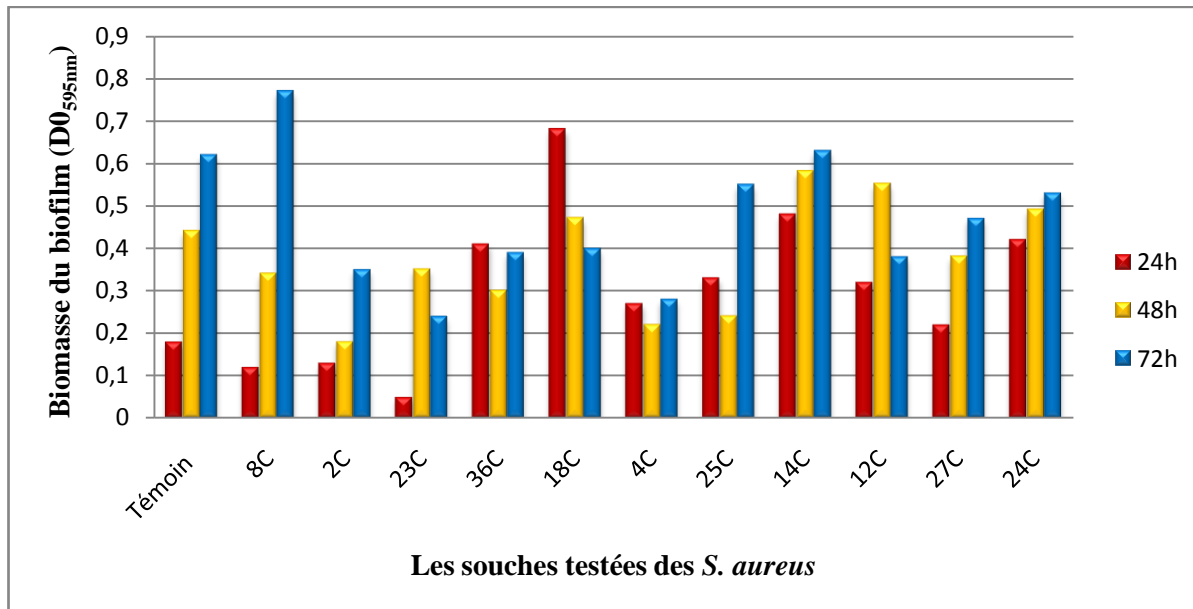
La formation de biofilm par toutes les souches testées (n=31), exprimée par la valeur de la  $DO_{595nm}$  mesurée, est comparée avec celle obtenue par le contrôle négatif (bouillon non inoculé). Les souches sont classées en quatre catégories : non formatrices de biofilm, avec une faible capacité à former le biofilm, avec une capacité modérée et avec une forte capacité à produire le biofilm, selon le tableau suivant :

**Tableau 4:** Classement des souches testées pour leur capacité à former le biofilm selon le temps d'incubation :

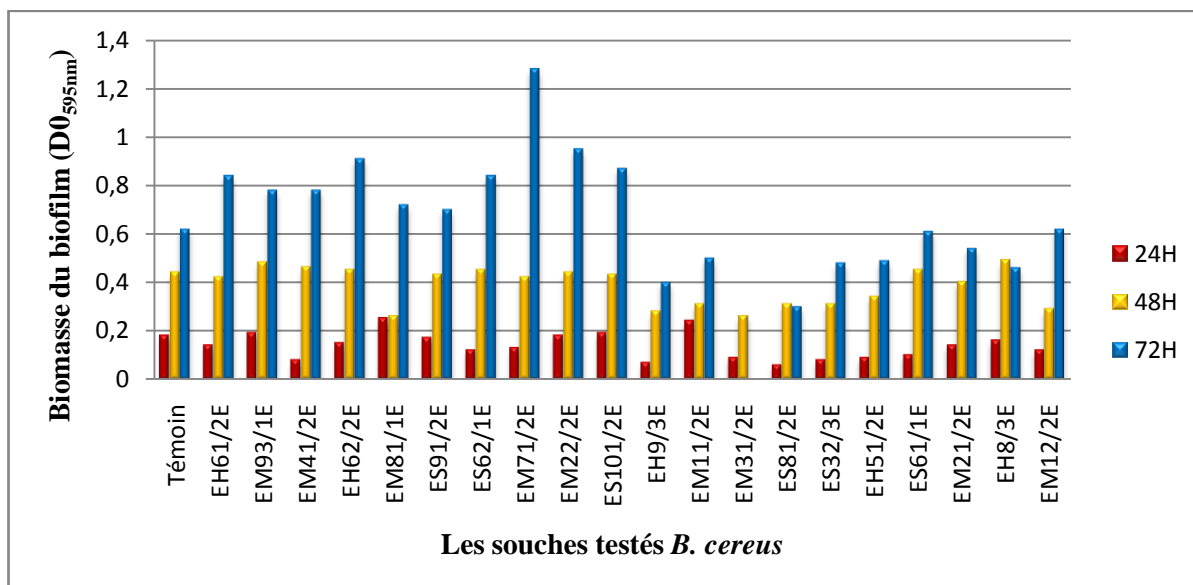
Classement	Durée d'incubation		
	24h	48h	72h
<b>Non formatrice</b>	$DO < 0,12$	$DO < 0,44$	$DO < 0,6$
<b>Faible capacité</b>	$0,12 < DO < 0,5$	$0,44 < DO < 0,8$	$0,6 < DO < 1$
<b>Capacité modérée</b>	$0,5 < DO < 1$	$0,8 < DO < 1,2$	$1 < DO < 1,5$
<b>Forte capacité</b>	$DO > 1$	$DO > 1,2$	$DO > 1,5$

Parmi toutes les souches étudiées aucune souche a une forte capacité de former un biofilm, et que trois souches de *Staphylococcus aureus* qui ont une capacité moyenne à former un biofilm sur les surfaces d'acier après 24h d'incubation.

61,29%, 45,16%, et 54,83% des souches de *B.cereus* et de *S. aureus* sont non formatrices de biofilm pendant les trois temps d'incubation 24h, 48h et 72h respectivement. Concernant souches faiblement formatrice de biofilm on a enregistré 61.29% des souches de *B. cereus* et de *S. aureus* après un temps d'incubation de 48h. Après 72h 41.93% des souches *B. cereus* et de *S. aureus*.



**Figure 16 :** Quantification de la formation de biofilm ( $DO_{595nm}$ ) sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance statique des souches de *Staphylococcus aureus* à 37°C dans le milieu BHIB après 24,48 et 72 h d'incubation.



**Figure 17 :** Quantification de la formation de biofilm ( $DO_{595nm}$ ) sur des surfaces d'acier inoxydable après une croissance statique des souches de *Bacillus cereus* à 37°C dans le milieu BHIB après 24,48 et 72 h d'incubation.

**Discussion :**

La méthodologie envisagée dans notre travail consiste en l'évaluation de la capacité des souches à former le biofilm via les microplaques de titration à 96-puits en PCV, sur la gélose au Rouge Congo et sur des surfaces solides en acier inoxydable puisqu'il s'agit du matériau le plus couramment utilisé dans les équipements de transformation de l'industrie alimentaire.

Les résultats de l'évaluation de la capacité de formation de biofilm ont indiqué que la majorité des souches de *B.cereus* testées étaient non formatrices de biofilm et la totalité des souches de *Staphylococcus aureus* étaient faiblement formatrices de biofilm sur le PVC. Ces résultats sont comparables aux travaux de Houry *et al.*, (2010), Wijman *et al.*, (2007) et Hamon *et al.*, (2001), qui ont montré que les biofilms de *Bacillus* ont été observés uniquement si les cellules ont été incubées dans des conditions relativement statiques. Outre le choix de la composition de plaque à 96 puits et les conditions du milieu et l'origine des souches dans le groupe *B. cereus* ont un rôle crucial dans la production de biofilm, des études ont confirmé que le temps d'adaptation des souches avec le CV à un effet significatif sur la formation de biofilm (Rajamani *et al.*, 2019 ; Auger *et al.*, 2009).

Fernandes *et al.*, (2018) a montré que le temps de contact entre la bactérie et la surface est l'un des paramètres les plus importants de la formation de biofilm. En effet, la formation de biofilm a tendance à être plus élevée à la température optimale de l'espèce.

Selon Stepanovic' *et al.*, (2000; 2007) et Götz (2002), la formation de biofilms chez les staphylocoques est multifactorielle de manière significative. Des souches ont été classées non adhérentes sur la microplaque de titration car des facteurs pouvant influencer la capacité d'adhérence des staphylocoques comprennent le type de surface en verre et en plastique, ainsi que toutes les variations dans les conditions de l'expérience influent principalement sur la formation de biofilm.

D'après Miao *et al.*, (2019) le stade le plus actif dans la formation de biofilm était de 16 heures, moment auquel le biofilm était au stade de l'adhésion avec la prolifération rapide et le métabolisme à l'intérieur, ainsi que l'environnement optimal pour la formation de biofilm de *S. aureus* était de 37°C, pH 7,0, avec une concentration en glucose et en NaCl de 2% et 10% respectivement. Bien que le biofilm ait maintenu sa résistance aux environnements défavorables, les études ont montré que le biofilm de *S. aureus* était sensible à diverses températures, les conditions de pH et de pression osmotique, qui existent couramment dans l'industrie agro-alimentaire. Les travaux de Rode *et al.*, (2007) confirment qu'il est probable que plusieurs mécanismes interviennent dans la formation de biofilm.

Le slime est en fait un composant du biofilm (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les Staphylocoques sont bien reconnus comme étant des bactéries qui peuvent former des biofilms sur les surfaces dans les usines de transformation du lait (Sharma et Anand, 2002 ; Vasudevan *et al.*, 2003). Selon Freeman *et al.*,

(1989), la gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime (Ziebuhr *et al.*, 2001 ; Jain et Agarwal, 2009 ; Nasr *et al.*, 2012).

La production du slime est due à la présence de gènes *ica* dans les bactéries slime-positif (Arciola *et al.*, 2001). Pour les bactéries non productrices du slime des études ont suggéré que le phénotype modifié pourrait être associé à la suppression de la totalité du locus *ica*. Malgré la présence du locus *ica*, la formation de biofilm *in vitro* peut échouer car la formation de biofilm sur des surfaces inertes est très sensible aux conditions de croissance (Vasudevan *et al.*, 2003). Plusieurs auteurs ont signalé que la méthode de rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm *in vitro* de point de vue de conditions environnementales.

Le potentiel de *B. cereus* et *S. aureus* de former des biofilms a été testé sur des coupons en acier inoxydable immergés. Parmi toutes les souches testées lors de cette étude, (19/31) sont faiblement formatrice de biofilm pour un temps d'incubation de 48h, et (13/31) pour 72h alors que pour 24h (09/31). Concernant les souches non formatrice de biofilm pour les trois temps d'incubation (24h, 48h et 72h) les résultats sont respectivement comme suit (19/31), (11/31) (17/31), ces résultats sont comparables avec les travaux de Wijman *et al.*, (2007) qui a travaillé sur la formation de biofilms de *B. cereus* en interface air-liquide.

Dans l'évaluation *in vitro*, il est à noter que les conditions environnementales ont une grande incidence sur les résultats, comme le temps de contact, le pH du milieu, les limitations en oxygène et / ou en nutriments influençant la formation de biofilm de plus le type de surfaces et si elles sont complètement immergée dans le milieu de culture ou pas et sans ou avec agitation (Hamon *et al.*, 2001 ; Rode *et al.*, 2007 ; Wijman *et al.*, 2007 ; Hory *et al.*, 2010 ; Boles *et al.*, 2011 ; Fernandes *et al.*, 2018 ; 2018 Ciccio *et al.*, 2015 ; Miao *et al.*,).

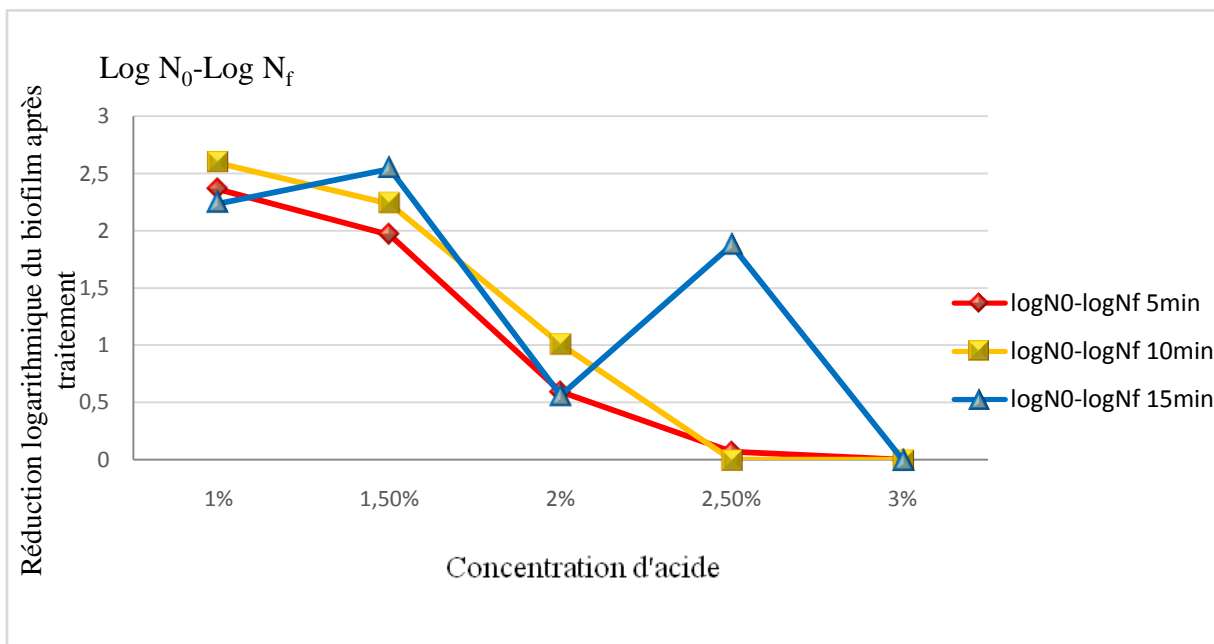
L'analyse des résultats montre que la méthode de coloration au CV a permis de mettre en évidence une formation de biofilm variable chez l'ensemble de souches étudiées en comparaison avec la méthode de RCA qui a permis de détecter la formation de biofilms chez seulement 03 souches. De ce fait et à fin de détecter et de quantifier les biofilms formés *in vitro*, la méthode de RCA semble être moins efficace par contre la méthode de coloration au CV peut être la plus adaptés et la plus fiable (Hou *et al.*, 2012).

## Chapitre 2 : Évolution de l'effet de l'acide acétique et l'acide citrique sur des biofilms à *Staphylococcus aureus* :

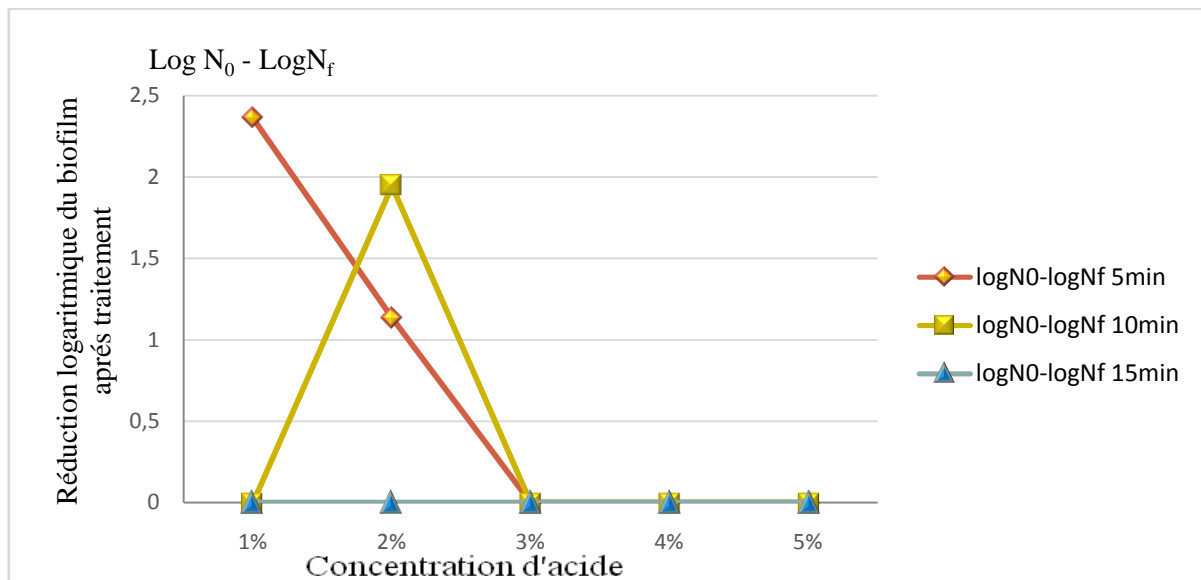
A partir des résultats obtenus dans la première approche la souche 14C de *S. aureus* était sélectionnée pour la deuxième démarche. Le biofilm âgé de 7 jours de *S. aureus* a été traité par des différentes concentrations d'acide acétique et d'acide citrique séparément, les résultats de la réduction par les acides sont représentés dans les figures 18 et 19, respectivement.

La réduction logarithmique la plus élevée par l'acide acétique est enregistrée (**2,59** log) à une concentration de 1% pendant un temps de traitement de 10 minutes, et un résultat proche est obtenu (**2,53** log) après un traitement de 15min à 1,5%.

En ce qui concerne l'utilisation de l'acide citrique à cinq concentrations différentes (1, 2, 3,4 et 5%), la valeur la plus élevée de la réduction logarithmique enregistrée (**2,36** log) est obtenue après un traitement à 1% pendant 5 min. suivi par une réduction logarithmique enregistrée (**1,94** log) à une concentration de 2% à 10 min. de traitement.



**Figure 18 :** Traitement du biofilm à *Staphylococcus aureus* de 7 jours par l'acide acétique à différentes concentrations (1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%) pendant des temps différents (5 minutes, 10 minutes, 15 minutes).



**Figure 19 :** Traitement du biofilm à *Staphylococcus aureus* de 7 jours par l'acide citrique à différentes concentrations (1%, 2%, 3%, 4%, 5%) pendant des temps différents (5 minutes, 10 minutes, 15 minutes).

### Discussion :

Après l'évaluation de capacité de formation de biofilm par différentes techniques, la souche 14C de *Staphylococcus aureus* a été sélectionnée pour la suite du travail.

Des biofilms âgés de 7 jours ont été formés sur des surfaces en acier inoxydable par *Staphylococcus aureus* dans un système clos. Par la suite, ces biofilms ont été soumis aux traitements par l'acide acétique et l'acide citrique à différentes concentrations et pendant des durées de contacts de 5, 10 et 15 minutes.

Selon les résultats obtenus, les biofilms de *S. aureus* formés sur les surfaces d'acier inoxydable ont été réduits par rapport aux coupons témoins non traités, dont l'acide acétique a marqué une réduction logarithmique de **2,59** à la concentration de 1% à 10 min, suivi par une réduction de **2,53** log après traitement à 1,5% pendant 15min.

D'après **Amrutha et al., (2017)** ; **Tsang et al., (2018)**, les bactéries à Gram négatif sont généralement plus sensibles à pH faible que les bactéries à Gram positif. L'effet antibactérien de l'acide acétique était dû à la forme non dissociée de cet acide qui se dissocie pour former de l'acétate, qui se combine avec des protons péri-plasmiques pompés par la chaîne de transport d'électrons et les ramène à travers la membrane en contournant l'ATP synthase transmembranaire, perturbant ainsi la formation d'ATP. La dissociation intracellulaire de l'acide acétique réduit également le pH du cytoplasme ce qui conduit à son tour au déploiement des protéines avec des dommages ultérieurs à la membrane et à l'ADN. L'acide acétique agit contre les microorganismes à Gram positif et négatif. Des études antérieures ont démontré son action inhibitrice et son éradication contre les bactéries dans les états planctoniques et en biofilm (**Tsang et al., 2018**).

Pour *S. aureus* un traitement avec 0,5% d'acide acétique a réduit le nombre de cellules viables d'un biofilm âgé de 3 jours, alors qu'une éradication complète a été obtenue avec 1% d'acide acétique (**Bjarnsholt, 2014**).

Les résultats de l'acide citrique sont comparables aux travaux de **Olaimat et al., (2017)** qui travaillaient sur les souches *Shigellasonnei* et *Shigella flexneri* isolées à partir du Pois chiches. Les réductions logarithmiques les plus élevées de traitement de l'acide citrique sont 2.36 et 1.94 à 1 et 2% pendant 5 et 10min respectivement. Selon **Cai et al., (2019)** ; **Garzoni et Kelley, (2009)**, l'acide citrique peut inhiber de manière significative le taux d'hydratation de la magnésie en suspension aqueuse; Les mesures de conductivité ont montré que l'acide citrique peut être absorbé à la surface des particules de magnésie et former des complexes avec un ligand non identifié. On peut comprendre de ce passage que la présence de l'acide citrique est importante dans la production d'acier c'est-à-dire l'acide citrique est déjà présent dans l'acier inoxydable donc c'est la raison que la réduction du biofilm est stoppée à la concentration de 2% et après cette concentration on a une élimination total du biofilm.

L'utilisation d'un traitement à l'acide citrique pour inhiber les activités métaboliques des bactéries peut être considérée comme une alternative efficace comme nouvelle stratégie de contrôle du biofilm naturel (**Akbas et Kokumer, 2015**).

Plusieurs auteurs ont montré que une large gamme de facteurs peuvent être impliqués dans la détermination de l'activité antimicrobienne des acides organiques, tels que la température, le substrat (milieu), hydrophobicité, le type et la concentration d'acides organiques, les organismes. La réduction du pH dans l'environnement, la perturbation du transport et / ou de la perméabilité de la membrane et l'accumulation d'anions pouvaient également affecter l'activité inhibitrice (**Cai et al.,2019;Tsang et al., 2018** ; **Al-Rousan et al., 2018** ; **Amrutha et al.,2017;Akbas et Kokumer, 2015;Garzoni et Kelley, 2009**).

En effet, les acides acétique et citriques sont des acides faibles qui présentent un équilibre de formes ionisées et non ionisées en solution qui lui permettent de diffuser librement des membranes hydrophobes des bactéries en raison de leur équilibre, contrairement aux acides forts qui se dissocient complètement en solution dans leur forme ionisée; Ainsi que l'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa valeur de pKa et, par conséquent, ils sont plus actifs dans des conditions acides en raison de la présence d'une proportion plus élevée d'acide organique sous forme non dissociée ( **Garzoni et Kelley, 2009** ; **Al-Rousan et al., 2018**).

L'effet des acides organiques sur la motilité des agents pathogènes a également été examiné, ces études ont montré que des concentrations plus élevées d'acides organiques ont tendance à diminuer la



motilité des isolats aussi l'effondrement du gradient de proton résultant du changement de pH, qui est être efficace contre la détection du quorum (**Olaimat *et al.*, 2017**).

En fin, la combinaison des acides acétique et citrique a montré une activité antimicrobienne plus élevée que chaque acide utilisé séparément dans certains cas, cela peut être dû à une réduction du pH. Cette combinaison est très efficace contre *S.aureus* qui était résistant aux traitements acides utilisés (**Amrutha *et al.*, 2017**; **Al-Rousan *et al.*, 2018**).

En général, l'acide acétique présentait une activité inhibitrice supérieure à celle de l'acide citrique à la température ambiante.

# **Conclusion générale**

**Conclusion :**

La viande de volaille, est l'une des viandes les plus consommées au monde entier et en Algérie en particulier, vue son faible prix et sa valeur nutritive. D'autre part, cette viande, crue ou cuite est à risque de contamination par des bactéries car elle est considérée comme un milieu riche en nutriments qui favorise leur croissance. Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur la capacité de former des biofilms par *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* isolées à partir de la viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen, suivi par l'étude de l'effet réductionnel de l'acide acétique et l'acide citrique sur les biofilms formés par *Staphylococcus aureus* sur l'acier inoxydable.

Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* présentent une faible capacité de formation de biofilm sur le PVC avec une valeur de la DO comprise entre **0.41** et **0.29**, tandis que 10% des souches de *Bacillus cereus* ont une faible capacité de former le biofilm. La production du slime était exclusive que pour 3 souches de *S. aureus*. Concernant la production de biofilm sur l'acier inoxydable **54,83%** des souches sont non formatrices de biofilm après 72h.

Le biofilm formé est réduit par **2,59** log et **2,36** log après le traitement d'acide acétique et d'acide citrique, respectivement à une concentration de 1% pendant 10 et 5min, respectivement.

En conclusion, les agents antimicrobiens naturels comme les acides organiques tels que d'acide acétique et l'acide citrique, pourraient constituer des solutions potentielles pour lutter contre les biofilm dans l'industrie alimentaire afin d'éviter toute détérioration organoleptique et / ou une démolition de la valeur nutritive des aliments transformés.

En perspective, il serait intéressant de faire des recherches plus approfondies sur les souches de Staphylocoques, d'étudier les gènes de résistance, de rechercher par des techniques de biologie moléculaires les gènes responsables de la formation de biofilm. Ce qui nous permettra d'assimiler le système de régulation de biofilm 'quorum sensing' pour la lutte contre la formation de ce dernier. D'étudier l'effet des acides acétique et citrique en combinaison sur des biofilms mono-espèce et des biofilms mixtes de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

# **Références bibliographiques**

**A**

---

1. Akbas, M., & Cag, S. (2016). Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. *Food Science and Technology International*, 22(7), 587-597.
2. Akbas, M., & Kokumer, T. (2015). The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(7), 1666-1672.
3. Akbas, M., (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, Badajoz: Formatex*, 383-394.
4. Al Shamsi, M. (2015). Biofilm Production by Food-Transmitted Bacteria and Their Control by Selected Nanoparticles. *These de doctorat, United Arab Emirates University Scholarworks UAEU*
1. Al-Rousan, W., Olaimat, A., Osaili, T., Al-Nabulsi, A, Ajo, R., & Holley, R. (2018). Use of acetic and citric acids to inhibit Escherichia coli O157: H7, Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus in tabbouleh salad. *Food microbiology*, 73, 61-66.
2. Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. (2017). Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial pathogenesis*, 111, 156-162.
3. Arciola, C. R., Collamati, S., Donati, E., & Montanaro, L. (2001). A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagnostic Molecular Pathology*, 10(2), 130-137.
4. Arciola, C., Baldassarri, L., & Montanaro, L. (2001). Presence of ica A and ica D Genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2151-2156.
5. Ardré, M. (2014). Dynamique de formation des biofilms de *Bacillus subtilis* à l'interface eau-air: expériences et modélisation. *Thèse doctorat, Université PARIS-SUD*.
6. Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., & Gohar, M. (2009). Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(20), 6616-6618.

7. Ayari, S., Dussault, D., Hamdi, M., & Lacroix, M. (2016). Growth and toxigenic potential of *Bacillus cereus* during storage temperature abuse in cooked irradiated chicken rice in combination with nisin and carvacrol. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 19-25.
8. Ayari, S., Dussault, D., Jerbi, T., Hamdi, M., & Lacroix, M. (2012). Radiosensitization of *Bacillus cereus* spores in minced meat treated with cinnamaldehyde. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(8), 1173-1176.
9. Ayari, S., Han, J., Vu, K., & Lacroix, M. (2016). Effects of gamma radiation, individually and in combination with bioactive agents, on microbiological and physicochemical properties of ground beef. *Food control*, 64, 173-180.

## B

---

10. Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I., & Gram, L. (2001). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5), 2319-2325.
11. Baselga, R., Albizu, I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., & Amorena, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infection and Immunity*, 61(11), 4857-4862.
12. Bellifa, S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. *Thèse doctorat, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen*.
13. Bendinger, B., Rijnaarts, H. H., 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(11), 3973-3977.
14. Boles, B., & Horswill, A. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology*, 19(9), 449-455.
15. Boudelal, K. Evaluation de la Contamination des Dispositifs Médicaux (Cathéters et Sondes) à l'hôpital de Ain Témouchentj. *Thèse doctorat, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen*.
16. Branda, S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.
17. Branger Alain, Richer Marie-Madeleine, Roustel Sébastien, (2017). Microbiologie et alimentation. Edition Martine poillot, 159.
18. Bressuire-Isoard, C. (2015). Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation: rôle de la protéine morphogénétique CotE chez *Bacillus cereus*. *Thèse doctorat, Université Montpellier*.

19. **Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sørensen, S. J. (2014).** Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?. *Trends in microbiology*, 22(2), 84-91.

## C

20. **Cai, M., Liang, Y., Yin, Y., & Nie, J. (2019).** Effect of citric acid on the hydration process of colloidal silica-bonded magnesia gunning materials. *Ceramics International*, 45(12), 15514-15519.
21. **Chang, Y., Kim, M., & Ryu, S. (2017).** Characterization of a novel endolysin LysSA11 and its utility as a potent biocontrol agent against *Staphylococcus aureus* on food and utensils. *Food microbiology*, 68, 112-120.
22. **Chaves, R., Pradella, F., Turatti, M., Amaro, E., da Silva, A., dos Santos Farias, A., & Khaneghah, A. (2018).** Evaluation of *Staphylococcus spp.* in food and kitchen premises of Campinas, Brazil. *Food control*, 84, 463-470.
23. **Chopra, L., Singh, G., Jena, K., & Sahoo, D. (2015).** Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific reports*, 5, 13412.
24. **Coughlan, L., Cotter, P., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016).** New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1641.
25. **Cramton, S., Gerke, C., Schnell, N., Nichols, W., & Götz, F. (1999).** The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity*, 67(10), 5427-5433.
26. **Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., & Penadés, J. (2001).** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183(9), 2888-2896.

## D

27. **Deng, Y., & Lv, W. (Eds.). (2016).** Biofilms and implantable medical devices: infection and control. *Woodhead Publishing*, 3.
28. **Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A. R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2015).** Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 50, 930-936.
29. **Dromigny Eric (2008).** *Bacillus cereus*. 2-8.
30. **Dupre, J., Johnson, W., Ulanov, A., Li, Z., Wilkinson, B., & Gustafson, J. (2019).** Transcriptional profiling and metabolomic analysis of *Staphylococcus aureus* grown on autoclaved chicken breast. *Food Microbiology*, 82, 46-52.

**F**

31. **Faille, C., BÚnÚzech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., & Slomianny, C. (2014).** Sporulation of *Bacillus spp.* within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food microbiology*, 40, 64-74.
32. **Fernandes, M., de Oliveira, A., Cheriegate, A., & de Abreu Filho, B. (2018).** Bacteria isolated from the bovine gelatin production line: biofilm formation and use of different sanitation procedures to eliminate the biofilms. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12489.
33. **Filloux, A., & Vallet, I. (2003).** Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1), 77-83.
34. **Fish, K., Osborn, A., & Boxall, J. (2017).** Biofilm structures (EPS and bacterial communities) in drinking water distribution systems are conditioned by hydraulics and influence discoloration. *Science of the Total Environment*, 593, 571-580.
35. **Fox, L., Zadoks, R., & Gaskins, C. (2005).** Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*, 107(3-4), 295-299.
36. **Freeman, D., Falkiner, F., & Keane, C. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872-874.
37. **Furukawa, S. (2015).** Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 79(7), 1050-1056.

**G**

38. **Galiè, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E., Villar, C., & Lombó, F. (2018).** Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*, 9, 898.
39. **Götz, F. (2002).** *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular microbiology*, 43(6), 1367-1378.

**H**

40. **Hachiya, J., Rossi, G., Silva, H., Sato, R., Vidal, A., & Amaral, L. (2018).** Bacteria from the *Bacillus cereus* group as contaminants in requeijão curd cheeses and especialidade láctea tipo requeijão. *Arquivos do Instituto Biológico*, 85.
41. **Hall-Stoodley, L., Costerton, J., & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95.
42. **Hamon, M., & Lazazzera, B. (2001).** The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 42(5), 1199-1209.
43. **Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305-311.



44. Hayrapetyan, H., Abee, T., & Groot, M. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control*, 60, 493-499.
45. Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(9), 5624-5631.
46. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156(4), 1009-1018.
47. Hughes, G., & Webber, M. (2017). Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *British journal of pharmacology*, 174(14), 2237-2246.
48. Hussain, M., & Oh, D. (2018). Impact of the isolation source on the biofilm formation characteristics of *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 28(1), 77-86.

## J

49. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M., & Kamil, M. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11.
50. Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T., & Andleeb, S. (2015). Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *RRJMB*, 4, 1-14.

## K

51. KARA TERKI, I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. *Thèse doctorat, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen*.
52. Kirov, S., Castrisios, M., & Shaw, J. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infection and Immunity*, 72(4), 1939-1945.
53. Kroning, I., Iglesias, M., Sehn, C., Gandra, T., Mata, M., & da Silva, W. (2016). *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food microbiology*, 58, 105-111.
54. Kuchma, S. L., Connolly, J. P., & O'toole, G. A. (2005). A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1441-1454.

## L

55. Laouami, S. (2012). *Métabolisme et toxinogénèse de Bacillus cereus: rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex*. *Thèse doctorat, Université d'Avignon*.

56. Li, Q., Li, Y., Tang, Y., Meng, C., Ingmer, H., & Jiao, X. (2019). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* in chicken from retail markets in China. *Food Control*, *96*, 158-164.
57. Lindsay, D., Brözel, V., & Von Holy, A. (2006). Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *Journal of food protection*, *69*(5), 1168-1172.
58. Loison, P. (2013). Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. *Thèse doctorat, Dijon. Université de Bourgogne.*
59. López, A., Minnaard, J., Pérez, P., & Alippi, A. (2015). A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. *Food microbiology*, *46*, 195-199.

**M**

60. [REDACTED], Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., & Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms same, only different. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1054.
61. Martínez-Vasallo, A., Ribot-Enríquez, A., Riverón-Alemán, Y., Remón-Díaz, D., Martínez-García, Y., Jacsens, L., & Uyttendaele, M. (2019). *Staphylococcus aureus* en la cadena de producción de queso fresco artesanal. *Revista de Salud Animal*, *41*(1).
62. Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, *24*(1), 25.
63. Mattei, M., Frunzo, L., D'acunto, B., Pechaud, Y., Pirozzi, F., & Esposito, G. (2018). Continuum and discrete approach in modeling biofilm development and structure: a review. *Journal of mathematical biology*, *76*(4), 945-1003.
64. Mazas, M., Gonzalez, I., Lopez, M., GONZÁLEZ, J., & Sarmiento, R. (1995). Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International journal of food science & technology*, *30*(1), 71-78.
65. Medeiros, A. (2016). Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. *Thèse doctorat., Université Grenoble Alpes.*
66. Miao, J., Lin, S., Soteyome, T., Peters, B., Li, Y., Chen, H., & Shirliff, M. (2019). Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* under Food Heat Processing Conditions: First Report on CML Production within Biofilm. *Scientific reports*, *9*(1), 1312.
67. Miao, L., Zhang, Q., Wang, S., Li, B., Wang, Z., Zhang, S., & Peng, Y. (2018). Characterization of EPS compositions and microbial community in an Anammox SBBR system treating landfill leachate. *Bioresource technology*, *249*, 108-116.

## N

68. Nagaveni, S., Rajeshwari, H., Oli, A., Patil, S., & Chandrakanth, R. (2010). Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscan*, 5(4), 563-566.
69. Nasr S., AbuShady H., Hussein H. (2012). Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. The *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 1110-8630.

## O

70. Olaimat, A., Al-Holy, M., Abu-Ghoush, M., Osaili, T., Al-Nabulsi, A., & Rasco, B. (2017). Inhibition of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in hummus using citric acid and garlic extract. *Journal of food science*, 82(8), 1908-1915.
71. Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S., Carneiro, C., Cavaco, L., Bernardo, F., & Vilela, C. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary microbiology*, 118(1-2), 133-140.
72. Organization mondiale du commerce. (2015). OMC.
73. O'Toole, G., Kaplan, H., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.

## P

74. Papadopoulos, P., Papadopoulos, T., Angelidis, A., Boukouvala, E., Zdragas, A., Papa, A., & Sergelidis, D. (2018). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food microbiology*, 69, 43-50.
75. Paytubi, S., Aznar, S., Madrid, C., Balsalobre, C., Dillon, S., Dorman, C., & Juárez, A. (2014). A novel role for antibiotic resistance plasmids in facilitating *Salmonella* adaptation to non host environments. *Environmental microbiology*, 16(4), 950-962.

## R

76. Rajamani, S., Sandy, R., Kota, K., Lundh, L., Gomba, G., Recabo, K., & Panchal, R. (2019). Robust biofilm assay for quantification and high throughput screening applications. *Journal of microbiological methods*, 159, 179-185.
77. Rewatkar, A., & Wadher, B. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *J Pharm Biol Sci*, 8(5), 36-40.
78. RijuBasu, S., Kundu, S., Rai, C., & Roy, A. (2016). Biofilm formation potentiality of some antibiotic resistant *Bacillus cereus* isolates from fresh raw chhana in Kolkata, India. *Annals of Biological Research*, 7(2), 1-6.

79. Rode, T., Langsrud, S., Holck, A., & Møretrø, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International journal of food microbiology*, 116(3), 372-383.
80. Rodríguez-Calvo, A., Silva-Castro, G., Uad, I., Robledo-Mahón, T., Menéndez, M., González-López, J., & Calvo, C. (2017). A comparative study of adhesion by bacterial isolates of marine origin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 123, 87-95.
81. Rossoni, E., & Gaylarde, C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of food microbiology*, 61(1), 81-85.
82. Rubab, M., Olaimat, A. N., & Oh, D. (2018). Biosensors and Bioelectronics Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 105(January), 49–57.

## S

83. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
84. 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*, 186(21), 7312-7326.
85. Sharma, M., & Anand, S. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19(6), 627-636.
86. Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). Bacillus spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1139-1148.
87. Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Permina, E., & Bremer, P. (2019). Differential gene expression for investigation of the effect of germinants and heat activation to induce germination in *Bacillus cereus* spores. *Food Research International*, 119, 462-468.
88. Spiers, A. J., Bohannon, J., Gehrig, S. M., & Rainey, P. B. (2003). Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular microbiology*, 50(1), 15-27.
89. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.

90. Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G, Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.

**T**

91. Thiran, E., Di Ciccio, P., Graber, H., Zanardi, E., Ianieri, A., & Hummerjohann, J. (2018). Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *Journal of dairy science*, 101(2), 1000-1012.
92. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1), 7-12.
93. Tremblay, Y., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
94. Tsang, S., Gwynne, P., Gallagher, M., & Simpson, A. (2018). The biofilm eradication activity of acetic acid in the management of periprosthetic joint infection. *Bone & Joint Research*, 7(8), 517-523.

**V**

95. Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2003)b. Stratégies nutritionnelles pour réduire les agents pathogènes chez la volaille. In *Comptes Rendus des 5ièmes Journées de la Recherche Avicole*, 141-148.
96. Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., & Ducatelle, R. (2003)a. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *International journal of food microbiology*, 85(3), 237-248.
97. Vasudevan, P., Nair, M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 92(1-2), 179-185.
98. Vasudevan, P., Nair, M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*, 92(1-2), 179-185.
99. Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C., Rees, C., & Waites, W. (2000). Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2), 860-863.

100. Viçosa, G., Moraes, P., Yamazi, A., & Nero, L. (2010). Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus spp.* in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food microbiology*, 27(4), 447-452.

W

101. Wakabayashi, Y., Umeda, K., Yonogi, S., Nakamura, H., Yamamoto, K., Kumeda, Y., & Kawatsu, K. (2018). Staphylococcal food poisoning caused by *Staphylococcus argenteus* harboring staphylococcal enterotoxin genes. *International journal of food microbiology*, 265, 23-29.
102. Wang, H., Wang, H., Bai, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Pathogenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from retailing chicken meat. *LWT*, 90, 152-156.
103. Wang, L., Li, Y., Wang, L., Zhu, M., Zhu, X., Qian, C., & Li, W. (2018). Responses of biofilm microorganisms from moving bed biofilm reactor to antibiotics exposure: Protective role of extracellular polymeric substances. *Bioresource technology*, 254, 268-277.
104. Wijman, J., de Leeuw, P., Moezelaar, R., Zwietering, M., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1481-1488.

Y

105. Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S., & Song, Z. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science*, 3(2), 74.

Z

106. Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., & Li, W. (2010). Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poultry science*, 89(3), 588-593.
107. Ziebuhr, W., Loessner, I., Krimmer, V., & Hacker, J. (2001). [18] Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming staphylococci. *In Methods in enzymology* (336), 195-IN7. Academic Press.
108. Site web 1  
[https://st4.depositphotos.com/1374738/24750/v/1600/depositphotos\\_247507922-stock-illustration-acetic-acid-formula.jpg](https://st4.depositphotos.com/1374738/24750/v/1600/depositphotos_247507922-stock-illustration-acetic-acid-formula.jpg).
109. Site web 2  
<https://slideplayer.fr/slide/507997/2/images/3/L%E2%80%99acide+citrique+est+un+triacide.jpg>

# **Annexes**

**Annexe 1 : Les milieux de cultures****1. Composition du tampon phosphate buffer saline (PBS) :**

NaCl	7,60g
KCl	0,200g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,710g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,245g

Préparation du phosphate buffer saline (PBS) pour 1 litre d'eau distillée, stérilisation par l'autoclave à 121C° pendant 15 min.

**2. Composition de BHIB :**

Protéase-peptone	10,0g/l
Infusion de cervelle de veau	17,5g/l
Infusion de cœur de bœuf	5,0g/l
Glucose	2,0g/l
Chlorure de sodium	5,0g/l
Hydrogénophosphate de sodium	2,5g/l
Ph	7,4

**Préparation :**

37g pour 1 litre d'eau distillé, on sépare dans des tubes d'essai, stérilisation par l'autoclave à 121C° pendant 15 min.

**3. Cristal violet (1%) :**

1 g de cristal violet pour 100ml d'eau distillée.

**4. Préparation d'eau physiologique :**

9g de chlorure de sodium (NaCl) pour 1 litre d'eau distillée, stérilisation par l'autoclave à 121C° pendant 15 min.

**5. Composition de gélose nutritive (GN) :****Préparation :**

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

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



**6. Composition de la gélose nutritive fortifiée :**

Extrait de viande	1,0g/l
Extrait de levure	2,5g/l
Peptone	5,0g/l
Chlorure de sodium	5,0g/l
Agar	15g/l
MnSo <sub>4</sub>	50mg
CaCl <sub>2</sub>	60mg
Ph	7,0

**Préparation :**

28g pour 1 litre d'eau distillé avec l'ajoute de 50mg/l de MnSo<sub>4</sub> et 60mg/l de CaCl<sub>2</sub>, stérilisation par l'autoclave à 121C° pendant 15 min.

**7. Composition de Plate count agar(PCA) :**

Peptone de caséine	5,0g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1,0g
Agar	18g
Ph	7,0

**Préparation :**

23,5g pour 1 litre d'eau distillé, on sépare dans des tubes d'essai, stérilisation par l'autoclave à 121C° pendant 15 min.

**8. Composition du gélose infusion cœur-cervele(BHIA) :**

Mélange de peptone	10,0g
Infusion de coeur de bœuf	10,0g
Infusion de cerveau de veau	7,50g
dextrose	2,0g
phosphate disodique	2,5g
chlorure de sodium	5,0g
Agar Bactériologique	15g
PH	7,4

**Préparation :**

52g Pour 1 litre d'eau distillé, stérilisation par l'autoclave à 121C° pendant 15 min.

**9. Composition du milieu Rouge Congo Agar (RCA):**

BHIB	38 g
Saccharose	20 g
Agar Bactériologique	10 g
Rouge Congo	0.8 g
PH	7,4

**Préparation :**

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

**10. Composition du milieu Baird-Parker :**

Peptone	10,0 g
Extrait de viande de bœuf	4,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Pyruvate de sodium	10,0 g
Glycocolle	12,0 g
Chlorure de lithium	5,0 g
Agar-agar	20,0 g
pH	7,2

**Préparation :**

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

---

**Annexe 2 : Résultats de la capacité des souches à former des biofilms en acier inoxydable**

**Tableau 04 :** Capacité des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen à former le biofilm sur des surfaces des lames en acier inoxydable.

Especes/résultats	Capacité de formation du biofilms											
	Négatif (-)			Faible (+)			Modéré (++)			Forte (+++)		
Temps de trait.	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Témoins	0,18	0,44	0,62	0,18	0,44	0,62	0,18	0,44	0,62	0,18	0,44	0,62
<i>B.cereus</i>	16	06	09	04	13	10	00	00	01	00	00	00
<i>S. aureus</i>	03	05	08	05	06	03	03	00	00	00	00	00
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>09</b>	<b>19</b>	<b>13</b>	<b>03</b>	<b>00</b>	<b>01</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>

### Annexe 3 : Résultats de la capacité des souches à former des biofilms en PVC

**Tableau 05 :** Capacité des souches bactériennes isolées à partir de viande de poulet cru et du Döner Kebab prêt à manger commercialisée dans la région de Tlemcen à former le biofilm par les microplaques de titration en PVC.

Espèces	Capacité de à former biofilm				Total
	Négatif (-)	Faible (+)	Modéré (++)	Forte (+++)	
<b><i>B.cereus</i></b>	18	02	00	00	<b>20</b>
EH61/2 E	+	-	-	-	
EM93/1 E	+	-	-	-	
EM41/2 E	+	-	-	-	
EH62/2 E	+	-	-	-	
EM81/1 E	+	-	-	-	
ES91/2 E	-	+	-	-	
ES62/1 E	+	-	-	-	
EM71/2 E	+	-	-	-	
EM22/2 E	+	-	-	-	
M71/2 E	+	-	-	-	
ES101/2 E	-	+	-	-	
EH9/3 E	+	-	-	-	
EM11/2 E	+	-	-	-	
EM31/2 E	+	-	-	-	
ES81/2 E	+	-	-	-	
ES32/3 E	+	-	-	-	
EH51/2 E	+	-	-	-	
ES61/1 E	+	-	-	-	
EM21/2 E	+	-	-	-	
EH8/3 E	+	-	-	-	
EM12/2 E	+	-	-	-	
EM81/1 E	+	-	-	-	
<b><i>Staph. aureus</i></b>	00	11	00	00	<b>11</b>
8C	-	+	-	-	
25C	-	+	-	-	
12C	-	+	-	-	
2C	-	+	-	-	
23C	-	+	-	-	
36C	-	+	-	-	
18C	-	+	-	-	
4C	-	+	-	-	
14C	-	+	-	-	
27C	-	+	-	-	
24C	-	+	-	-	
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>31</b>

**Annexe 4 : Matériel utilisé**

Tubes à assai, tubes coniques, tubes de biofilms, éprouvettes (100ml, 500ml,1L), erlenmeyer (2L), béchers (200ml, 500ml, 1L), flacons stériles(250ml), pipettes gradués (5ml, 10ml), pipettes pasteur, lames et lamelles en verre, microplaque de titration en PVC, boîtes de pétri, anse de platine, portoirs, coton, ciseaux, spatules, pinces, , bec bunsen, papiers filtre, papiers aluminiums, papiers parafilms.

**Annexe 5 : Appareils utilisés**

Balance de précision, plaque chauffante, autoclave, four pasteur, bain marie, microscope optique, microscope optique, étuves a (37°C, 80°C), vortex, réfrigérateur, bain a ultra son, lecteur microplaques, PSM.

## Résumé :

Dans l'industrie alimentaire, y compris celle de la volaille, la plupart des agents pathogènes et/ou d'altération ont la capacité d'adhérer aux surfaces en contact avec les aliments et par conséquent former des biofilms, tel que les bactéries à Gram positive dont *B. cereus* et *Staphylococcus aureus*.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de formation de biofilms par des souches appartenant à *B. cereus* et *Staphylococcus aureus* isolées de la viande de poulet hachée crue et du Döner Kebab prêt à manger commercialisés dans la région de Tlemcen. L'effet de l'acide acétique et de l'acide citrique sur des biofilms de *Staphylococcus aureus* formés sur des surfaces en acier inoxydable à plusieurs concentration et durées de contact différents.

Les résultats d'évaluation de la formation des biofilms des souches sur le PVC, gélose en rouge congo et sur l'acier inoxydable sont les suivants : 58,06% des souches sont non productrices de biofilms, 41,94% sont des souches productrices de biofilm sur le PVC, que 4 souches appartenant aux *S. aureus* sont productrices du slime sur gélose en rouge congo, ainsi que les résultats montrent que la plupart des souches sont non productrice sur l'acier inoxydable 61,29%, 45,16% et 54,83% pendant des différents temps d'incubation 24,48,72h, respectivement. L'acide acétique a un effet réducteur important(2,59 log) par rapport à l'acide citrique(2,36 log) ;mais en même temps la valeur de la réduction la plus basse est de 0,070 log enregistrée pour l'acide acétique. L'acide citrique a un effet d'élimination total du biofilm plus que réductionnel, contrairement à l'acide acétique.

**Mots clés :** Biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, acide acétique, acide citrique.

## Abstract :

In food industry, including poultry, most pathogenic and or weathering have the ability of adhesion in surfaces that has a contact with food by forming a biofilms, such as *S. aureus* and *B. cereus*.

The main objective of this work is to evaluate the effect of acetic acid and citric acid on a selected strain of *Staphylococcus aureus* from 31 strains isolated from raw chicken meat and Döner Kebab ready to eat commercialized in the region of Tlemcen, including 20 strains of *Bacillus cereus* and 11 are *Staphylococcus aureus*. All 31 strains were evaluated for quantitative and qualitative biofilm formation on titration microplates made of PVC, congo red agar and stainless steel.

The evaluation results of the biofilm formation of the strains on PVC, agar in Congo red and on stainless steel are as follows: 58.06% of strains are non-producing biofilms, 41.94% are strains producing biofilm on PVC, 4 strains belonging to *S. aureus* are producing slime on agar in red congo, as well as the results show that most strains are nonproducer on 61.29%, 45.16% and 54.83% stainless steel during different incubation times 24.48,72h, respectively. The second experimental part shows that acetic acid has a significant reducing effect (2.59 log) relative to citric acid (2.36 log); but the lowest biofilm reduction (0.070 log) is recorded in acetic acid. The citric acid has a total elimination effect of the biofilm more than reduction, unlike acetic acid.

**Key words:** Biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, acetic acid, citric acid.

## المخلص:

في مجال الصناعات الغذائية، بما في ذلك الدواجن، معظم العوامل المسببة للأمراض أو التي تغير الحالة الطبيعية للأغذية لديها القدرة على التثبيت على مساحات متصلة بالأغذية مشكلة البيوفيلم، كالبكتيريا (à Gram positive) التي من بينها *B. cereus* والبكتيريا *S. aureus*.

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو تقييم تأثير حمض الأسيتيك (حمض الخل) وحمض الستريك على سلالة مختارة من المكورات العنقودية الذهبية من 31 سلالة معزولة من لحم الدجاج النيئ و Döner Kebab جاهزة للأكل في منطقة تلمسان، منها 20 سلالة من الباسيلوس سيغيوس و 11 سلالة من المكورات العنقودية الذهبية.

تم تقييم جميع ال 31 سلالة لفحوصات تشكيل بيوفيلم الكمي والنوعي على لوحات المعايرة PVC، لوحات أجار الكونغو الأحمر ولوحات الفولاذ المقاوم للصدأ. نتائج تقييم السلالات لتشكيل البيوفيلم على PVC، لوحات أجار الكونغو الأحمر وعلى الفولاذ المقاوم للصدأ هي كما يلي: 58.06% من السلالات غير المنتجة للبيوفيلم 41.94%، هي سلالات منتجة للبيوفيلم على PVC، 4 سلالات فقط تنتمي إلى *S. aureus*. تنتج السلالم في أجار الكونغو الأحمر، وكذلك أظهرت النتائج أن معظم السلالات غير منتجة بنسبة 61.29% و 45.16% و 54.83% على الفولاذ المقاوم للصدأ خلال أوقات حضانة مختلفة 24.48,72 ساعة على التوالي. وضح الجزء التجريبي الثاني أن حمض الأسيتيك له تأثير تقليل للبيوفيلم كبير (log 2.59) مقارنة بحمض الستريك (log 2.36)؛ ولكن تم تسجيل أدنى تخفيض للبيوفيلم (log 0.070) عند حمض الأسيتيك. حمض الستريك له تأثير القضاء التام على البيوفيلم أكثر من التخفيض، على عكس حمض الخليك.

**الكلمات المفتاحية:** لحم الدجاج، البيوفيلم، المكورات العنقودية الذهبية، الباسيلوس سيغيوس، حمض الأسيتيك، حمض الستريك.