REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Option: Biotechnologie Microbienne

Evaluation de l'inhibition de biofilm des bactéries du lait de vache cru par les huiles essentielles de *Thymus algeriensis*

Présenté par:

BOUKHARI Tassadit

HABAREK Tinhinane

Soutenu publiquement le 15/09/2019 devant le jury composé de:

M^{me} ASMANI K. L.	**UMMTO**	**MCB**	**Présidente du jury**
M^{me} AFIF CHAOUCHE T.	**UMMTO**	**MCB**	**Promotrice**
M^{r} BOUACEM K.	**UMMTO**	**MCB**	**Examinateur**

Année universitaire: 2018/2019

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude, et nos vifs remerciements à ***Mme ASMANI K. L.*** *de nous avoir fait l'honneur de présider notre honorable jury.*

C'est avec un très grand plaisir que nous remercions infiniment notre promotrice ***Mme AFIF CHAOUCHE T.*** *de nous avoir donné la chance de travailler sous sa direction.*

Un grand merci s'adresse également à ***Mr BOUACEM K.*** *pour qui nous témoignons notre reconnaissance d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.*

Enfin, nous remercions ***Mr HOUALI K.*** *et les ingénieurs du laboratoire de microbiologie pour leurs aides et pour leurs encouragements.*

Dédicaces

Nous dédions ce travail à:

-Nos chers parents qui nous ont soutenus durant toutes ces années d'études,

on leurs seraient éternellement reconnaissantes.

-Tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tassadit & Tinhinane

Résumé

La capacité de certains microorganismes à former des biofilms ne cesse d'augmenter ces dernières années. En effet, les biofilms sont définis comme étant un mode de vie qui permet aux bactéries de survivre et de résister dans des environnements hostiles. Par conséquent, cette forme de survie représente un problème majeur pour les différentes industries alimentaires, y compris l'industrie laitière.

L'objectif de la présente étude est la recherche de souches de *Staphylococcus aureus* et celles de *Bacillus cereus* dans du lait de vache cru, leur caractérisation, l'étude de leur capacité à former un biofilm, ainsi que la recherche d'un effet inhibiteur de l'huile essentielle '*Thymus algeriensis'* sur le biofilm formé. Pour cela, 20 échantillons du lait de vache sont prélevés de la région d'Ouadhias et de Tigzirt et sont soumis aux analyses microbiologiques. L'identification préliminaire des bactéries isolées a permis la sélection de 11 souches de *Staphylococcus aureus* et 13 souches de *Bacillus cereus.* Ces souches en question ont montré un grand potentiel pour la formation de biofilm dans les puits d'une microplaque. Quant à l'effet *in vivo* de l'huile essentielle *'Thymus algeriensis'*, une inhibition complète du biofilm formé à été obtenue après 24 h de contact.

Cette étude révèle que le lait de vache récolté nécessite, avant toute utilisation, la mise en œuvre d'un programme de vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène afin d'assurer un produit sain pour le consommateur.

Mots clés: biofilm, lait de vache, *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus,* huile essentielle.

Abstract

The ability of some microorganisms to form biofilms continues to progress these recent years. Indeed, biofilms are defined as a way of life that allows bacteria to survive and resist in hostile environments. Therefore, this form of survival represents a major problem for the various food industries, including the dairy industry.

The objective of this study is the investigation for strains of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw cow's milk, their characterization, the study of their ability to form a biofilm, as well as the search for an inhibitory effect of the essential oil *'Thymus algeriensis*' against the formed biofilm. For this, 20 samples of cow's milk are taken from the Ouadhias region and Tigzirt and are subjected to microbiological analyzes. The identification of isolated bacteria allowed the selection of 11 strains of *Staphylococcus aureus* and 13 strains of *Bacillus cereus*. These strains have shown great potential for biofilm formation in wells of a microplate. As for, the in vivo effect of the essential oil '*Thymus algeriensis'*, complete eradication of the formed biofilm was obtained after 24 hours of contact.

This study reveals that isolated cow's milk requires, before any use, the implementation of a program of popularization of good hygiene practices to ensure a healthy product for the consumer.

Key words: biofilm, cow’s milk, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, essential oil.

Table de matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé, Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Synthèse bibliographique

***I.* Lait de vache cru 2**

*I.*1. Définition 2

*I.*2. Composition du lait de vache cru 2

*I.*3. Qualité organoleptique du lait de vache cru 2

*I.*4. Propriétés physico-chimiques 3

***II.* Germes contaminants du lait dans l'industrie laitière 3**

*II.*1. Flore caractéristique du lait 3

*II.*1.1. Flore indigène (originelle) 4

*II.*1.2. Flore de contamination 4

1.2.1. Germes d'altérations 4

1.2.2. Germes pathogènes 5

*II.*2. Origine de contamination 7

2.1. Contamination au cours du transport 7

2.2. Contamination au cours de la production 7

2.3. Contamination par l'animal 7

2.4. Contamination au cours de la traite 7

2.5. Contamination par des équipements 8

***III.* Biofilms laitiers 8**

*III.*1. Définition du biofilm 8

*III.*2. Etapes de formation du biofilm 9

2.1. Film de conditionnement 10
2.2. Transport des bactéries vers le support 10
2.3. Adhérence réversible et adhérence irréversible 10
2.4. Formation de microcolonies 11
2.5. Croissance et maturation du biofilm 11
*III.*3. Biofilms laitiers 12
3.1. Composition du biofilm laitier 12
3.1.1. Bactéries psychotropes 13
3.1.2. Bactéries mésophiles 13
3.1.3. Bactéries thermophiles 13
***IV.* Les huiles essentielles** 14
*IV.*1. Définition 14
*IV.*2. Composition chimique 14
*IV.*3. Activité biologique 14
3.1. Activité anti-oxydante 14
3.2. Activité antifongique 15
3.3. Activité antimicrobienne 15
3.4. Activité anti-tumorale 15
V. Thymus algeriensis 15
*V.*1. Présentation de la plante 15
*V.*2. Classification 16
*V.*3. Principales molécules présente chez la plante 16
*V.*4. Intérêt et répartition géographique en Algérie 16

Matériel et méthodes

***I.* Matériel 17**
*I.*1. Matériel biologique 17
*I.*2. Matériel non biologique 17
***II.* Méthodes 17**
*II.*1. Echantillonnage 17
1.1. Prélèvements 17

1.2. Techniques de prélèvements 17
II.2. Analyse microbiologique 18
2.1. Traitement des échantillons 18
2.2. Isolement des souches 18
2.3. Identification des souches 18
2.3.1. Caractérisation morphologique des isolats 18
2.3.2. Etude des caractères biochimique 19
2.4. Conservation des souches 20
II.3. Etude de la formation de biofilm dans la microplaque 20
3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 21
3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm 22
3.3. Extraction de l'huile essentielle *T. algeriensis* 22
3.4. Analyse GC-MS des huiles essentielles 22
3.5. Etude statistique des données 22

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des souches 24
2. Examen macroscopique des isolats 25
3. Examen microscopique des isolats 26
4. Identification des *Bacillus cereus* et *Staphylococcus spp* 28
4.1. Identification de *Bacillus cereus* 28
4.2. Identification de *Staphylococcus spp* 29
5. Évaluation de la formation de biofilm 33
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm (CMIB) 36

Conclusion et perspectives 41
Références bibliographiques 42
Annexes

Liste des figures

Figure 01: Bactéries lactiques 5

Figure 02: Exemples de bactéries infectieuses..... 6

Figure 03: Composition du biofilm..... 9

Figure 04: Représentation schématique de la formation de biofilm 10

Figure 05: Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox . 12

Figure 06: *Thymus algeriensis* 15

Figure 07: Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques..... 21

Figure 08: Isolement et purification des souches à partir du lait e vache cru 24

Figure 09: Fréquence d'isolement des bactéries dans les deux régions 24

Figure 10: A/ Aspect de *Bacillus cereus* sous microscope optique. B/ Aspect de *Staphylocoques aureus* sous microscope optique 26

Figure 11: Aspect macroscopique de *Bacillus cereus* sur milieu gélosé de Mossel..... 29

Figure 12: Résultats des tests biochimiques obtenus pour les isolats de *S. aureus* 31

Figure 13: Tests effectués pour l'identification de la souche isolée de la région Ouadhias 32

Figure 14: Quantification de formation du biofilm par deux méthodes (visuelle, lecteur ELISA..... 33

Figure 15: Formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*..... 35

Figure 16: Evaluation de la formation de biofilm des souches isolées après la mesure de l'absorbance par le lecteur ELISA 36

Figure 17: Histogramme représentatif de la CMI et CMIB de *Staphylococcus aureus*..... 37

Figure 18: Histogramme représentatif de la CMI et CMIB de *Bacillus cereus*..... 38

Figure 19: Profil chromatographique des principaux composants de l'huile *T. algeriensis*.... 39

Liste des tableaux

Tableau 01: Composition moyenne du lait de vache 2

Tableau 02: Principales propriétés physico-chimiques du lait 3

Tableau 03 : Principaux composés de *Thymus algeriensis*..... 16

Tableau 04: Caractères culturaux des souches cultivées à 37°C 25

Tableau 05: Aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 10 premiers échantillons..... 27

Tableau 06: Aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 10 derniers échantillons..... 28

Tableau 07: Croissance sur milieu Mossel des souches de *Bacillus cereus* 29

Tableau 08: Résultats des tests biochimiques obtenus pour les isolats des staphylocoques 30

Tableau 09: Résultats obtenus après la mesure de l'absorbance par l'appareil ELISA..... 34

Tableau 10: Effet inhibiteur de *Thymus algeriensis* vis-à-vis les souches de *Staphylococcus aureus* isolées à l'état planctonique et à l'état biofilm..... 37

Tableau 11: Effet inhibiteur de *Thymus algeriensis* vis-à-vis les souches de *Bacillus cereus* isolées à l'état planctonique et à l'état biofilm..... 37

Liste des abréviations

- **TSE: Tryptone-sel-eau**
- **BHIB: Bouillon cœur cervelle**
- **TSB: Bouillon Tryptone Soja**
- **Tampon PBS: Tampon phosphate salin**
- **MSCRAMM: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules**
- **GC-MS: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**
- **CMI: Concentration minimale inhibitrice**
- **CMIB: Concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm**

L'Algérie est le plus grand consommateur du lait et des produits laitiers au niveau maghrébin, avec près de trois milliards de litres par an (Hamiroune et *al*., 2014). L'industrie laitière représente l'une des principales industries alimentaire qui commercialise une large gamme de différents produits laitiers dont le lait de vache. Ce dernier est considéré comme acteur clé de l'industrie agroalimentaire, notamment pour son rôle de fournisseur de protéines animales face aux besoins de consommation et de transformation, ainsi que pour son rôle de créateur d'emplois et de richesse (Mansour, 2015).

De part sa composition et ses qualités nutritionnelles, les microorganismes trouvent dans le lait de vache un excellent substrat nutritif pour leur développement. Par ailleurs, le secteur laitier se heurte souvent au problème de gestion de qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs, d'où la nécessité d'appliquer des méthodes préventives pour garantir un lait de qualité hygiénique et sanitaire satisfaisante (Maïworé et *al*., 2018).

La persistance de nombreuses espèces bactériennes sur les surfaces industrielles est due à la formation de biofilms définis comme étant des microorganismes qui sont trouvés dans un éventail d'écosystèmes en tant que communautés multi-espèces fortement structurées. Largement impliqués dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis et dans la diminution de leurs durées de conservation, les biofilms sont caractérisés par leur résistance aux environnements hostiles, qui les fait échapper aux mesures de contrôle appliquées dans les unités de transformations des aliments (Malek, 2019 ; Palmer et *al*., 2007).

Parmi ces microorganismes, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* qui sont deux pathogènes régulièrement rencontrés, en particulier dans la chaine alimentaire et doués d'une capacité à former les biofilms (Didouh, 2015 ; Bentiba et Bentiba, 2017).

Dans le présent travail, trois objectifs sont visés:

1. Rechercher des souches de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* dans le lait de vache cru issu de la région de Ouadhias et de Tigzirt (au niveau de Tizi Ouzou).
2. Caractériser les souches de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sur leur capacité à former un biofilm.
3. Chercher un effet inhibiteur de l'huile essentielle '*Thymus algeriensis*' sur le biofilm formé.

I. Lait de vache cru

1. Définition

En Algérie, le lait de vache revêt un caractère hautement stratégique puisqu'il occupe une place importante dans le modèle de consommation algérien (Mansour, 2015). En effet, il constitue un aliment de haute qualité nutritive très riche et équilibré, parfaitement adapté aux besoins nutritionnels et physiologiques de tous les âges de la vie. Autrement dit, le lait de vache est à la fois un aliment traditionnel et une boisson d'un grand intérêt nutritionnel, car il représente un aliment de base presque complet et se prête à de nombreuses applications culinaires, industrielles et technologiques (Ghazi et Niar, 2011).

2. Composition du lait de vache cru

La composition du lait varie d'une vache à une autre, car elle est adaptée aux besoins de chacune d'elle. Le lait constitue une source énergétique importante, c'est un fluide très variable et tellement complet qu'il permet de couvrir presque tous les besoins nutritifs (Sissao et *al*., 2015). Ces principaux composants sont introduits dans le tableau suivant:

Tableau 01: Composition moyenne du lait de vache (Si Tayeb, 2018).

Composants	**Teneurs (g/100g)**
Eau	**89.5**
Dérivés azoté	3.44
Protéines	**3.27**
Caséines	2.71
Protéines solubles	**0.56**
Azote non protéique	0.17
Matières grasses	**3.5**
Lipides neutres	3.4
Lipides complexes	**0.05**
Composés liposolubles	0.05
Glucides	**4.8**
Lactose	4.7
Gaz dissous	**5% du volume du lait**
Extrait sec total	12.8

3. Qualité organoleptique du lait de vache cru

L'aspect, l'odeur, la saveur et la texture sont les paramètres organoleptiques qui caractérisent la qualité du lait et qui se dégrade après une durée de stockage. Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière

grasse en β-carotène. Il a une odeur peu marquée et un goût douceâtre légèrement sucré (le lactose à un faible pouvoir sucrant) **(**Rheotest, 2010).

4. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques du lait sont plus ou moins stables, elles dépendent soit de l'ensemble des constitutions caractérisées par leurs densité, soit des substances en solution **(Tableau 2)** (Vignola, 2002).

Tableau 02: Principales propriétés physico-chimiques du lait (Jeantet et *al*., 2008).

Pression osmotique	~ 700,103 Pa
Activité d'eau	~ 0,993
Point d'ébullition	~ 100,15C°
Point de congélation	~ -0.53C
Indice de réfraction	1,3440-1.3485
Masse volumique (à 20C°)	~ 1030 Kg.m-1
Conductivité spécifique	~ 0,0050 ohm-1.cm-1
Force ionique	Force ionique ~ 0,08 Mol
Tension interficiale (20C°)	~ 47-53 N.m-1
Viscosité (lait non homogénéisé)	~ 2 ,0.10 Pa
Diffusité thermique (15-20C°)	~ 1.25.10m2.s-1
Choleur spécifique	~ 3900 J.Kg-1.K-1
pH (à 20C°)	6.6-6.8

II. Germes contaminants du lait dans l'industrie laitière

Le lait de vache constitue un excellent siège pour le développement des microorganismes qui provoquent des transformations nuisibles à la qualité des produits. En effet, la qualité du lait se trouve renforcée lorsque les normes de gestions sont rigoureusement respectées. Bien qu'elle engagent des ressources financières supplémentaires afin que le consommateur reçoive son lait sainement, elles demeurent toutefois un rempart à la prolifération des microorganismes (Maïworé et *al*., 2018).

1. Flore caractéristique du lait

Le lait par sa composition et par les différents parcours qu'il subit avant son utilisation, soit par le consommateur ou bien par le transformateur, il constitue un vecteur de transmission et un milieu propice pour le développement des microorganismes (Ounine et *al*., 2004).

Les microorganismes du lait, selon leurs importances sont répartis en deux grandes classes: la flore indigène ou originelle et la flore de contamination. Cette dernière est divisée en deux sous classes: la flore d'altération et la flore pathogène (Vignola, 2002).

1.1. Flore indigène (originelle)

Le lait contient relativement peu de microorganismes quand il est sécrété de la mamelle d'un animal en bonne santé et dans de bonnes conditions. Il devrait contenir moins de 5000 UFC. Il est protégé par des substances inhibitrices appelées « Lacténines » à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) (Fotou et *al*., 2011).

La flore originelle se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvé à la sortie du pis, qui n'a aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Vignola, 2002).

1.2. Flore de contamination

L'hygiène dans la production, la conservation et la transformation du lait est un aspect critique pour la santé des populations (Sissao et *al*., 2015). Ces conditions exigent un approvisionnement régulier afin de préserver la qualité hygiénique du lait qui est souvent instable et douteuse (Bachtarzi et *al*., 2015).

La flore de contamination se définit comme l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui causera des défauts sensoriels, ce qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse d'un point de vue sanitaire (Vignola, 2002).

1.2.1. Germes d'altération

Ce sont des germes apportés par la contamination, provoquant des défauts sensoriels du goût, d'arôme et d'apparence (la détérioration des produits), sans nécessairement avoir une incidence sur la santé du consommateur, parce que leur présence en grande quantité est visible par l'état du produit (changement d'aspect, odeur indésirable…) (Simonet, 2006). Ils regroupent:

1.2.1.1. Bactéries de type coliforme

Les coliformes sont des Entérobactéries (bacilles Gram-, non sporulés, oxydase- et aérobies ou anaérobies facultatifs), qui comprennent les genres *Citrobacter, Enterobacter et*

Klebsiella (Billon et Sauve, 2009). Leurs présence dans le lait est l'indice d'une contamination fécale qui peut provoquer des intoxications alimentaires (Simonet, 2006).

1.2.1.2. Les Streptocoques lactiques et les Lactobacilles

Les *Streptocoques lactiques* et les *Lactobacilles* sont des bactéries lactiques à Gram+ ayant des formes en coques ou en bâtonnets. Elles ont une grande importance dans l'industrie laitière notamment pour l'attention qu'elles reçoivent dans la fabrication du fromage mais aussi pour leur capacité à acidifier le lait, ce qui provoque par la suite sa coagulation (Kouame, 2013) **(Figure 01).**

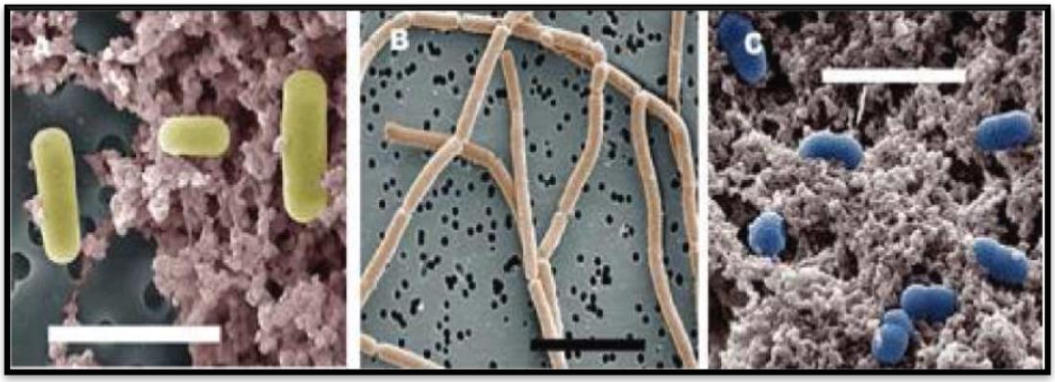


Figure 01: Bactéries lactiques (Prescott et *al*., 2010).

A): *Lactobacillus helveticus*. **(B):** *Lactobacillus delbrueckii*. **(C):** *Lactococcus lactis*

1.2.1.3. Bacillus cereus

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste qui peut être isolé à partir du sol, des végétaux, des tissus animaux et d'aliments. Ce sont des bactéries Gram+, aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles ou immobiles. Leurs températures optimales de croissance sont généralement situées entre 25 °C et 37 °C (Preist et *al*., 2004). Les symptômes provoqués par *Bacillus cereus* lors d'une contamination alimentaire sont manifestés par des troubles du tube digestif dus à l'ingestion de la bactérie (Upasana, 2015).

1.2.2. Germes pathogènes

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade; ou bien d'origine exogène, suite à un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux) (Si Tayeb, 2018). Les germes les plus souvent évoqués sont:

1.2.2.1. Bactéries infectieuses

Ce sont des bactéries qui peuvent causer le dérèglement du système une fois ingérées. Elles doivent être vivantes dans l'aliment lors de sa consommation pour agir et avoir de l'effet. Apparaissent alors divers symptômes connus, tels que la diarrhée, les vomissements, les maux de tête…etc. (Kizi et Makdoud, 2014). Les principaux microorganismes infectieux sont démontrés dans la **figure 02**.

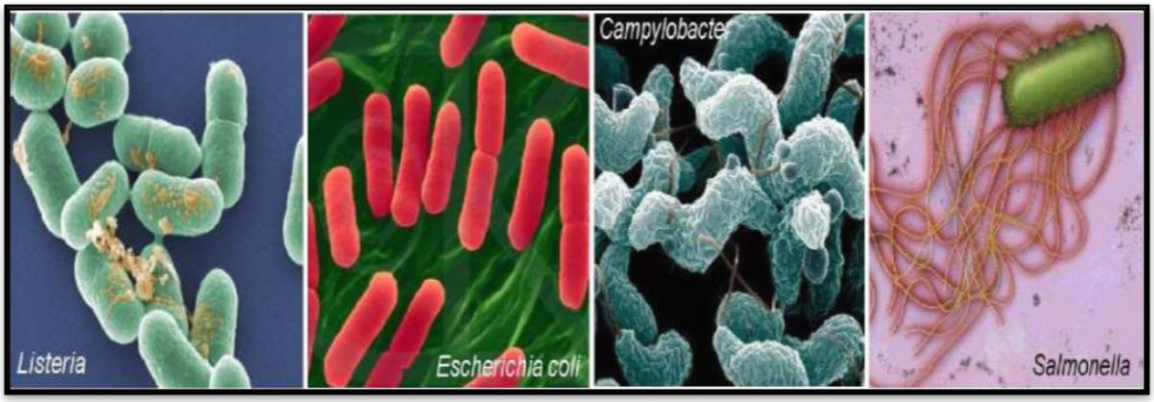


Figure 02: Exemples de bactéries infectieuses (Prescott et *al*., 2010).

1.2.2.2. Bactéries toxinogénes

Ce sont des bactéries qui produisent une toxine au niveau de l'aliment qui est responsable de l'intoxination du consommateur. Parmi les principaux microorganismes toxinogènes ont peut citer comme exemple (Kizi et Makdoud, 2014):

- ***Staphylococcus aureus***

Les Staphylocoques sont des germes ubiquistes que l'on retrouve dans l'air, le sol et les eaux, et ils appartiennent à la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux (Titouche, 2018).

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, non sporulés, regroupés en amas, immobiles et anaérobies facultatifs. La présence des staphylocoques dans les aliments représente un risque pour la santé humaine, puisque certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxiinfection alimentaire qui se manifeste par des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête (Brisabois, 2016).

2. Origine de contamination

L'hygiène dans la production, la conservation et la transformation du lait est un aspect critique que ce soit sur la santé humaine ou sur l'aspect financier (engendrer des pertes financières importantes) (Sissao et *al*., 2015).

2.1. Contamination au cours du transport

Le lait, une fois récolté dans les fermes, il est acheminé vers les unités de transformations par moyen de camions citernes, réfrigérés. Lors de ce transport, un certain nombre de règles légales doit être respecté afin de préserver et de livrer un lait de bonne qualité, notamment par le maintien du lait au froid permettant d'arrêter le développement des microorganismes (Weber, 1985).

2.2. Contamination au cours de la production

Le lait recueilli à la ferme par traite mécanique ou manuelle est soit directement transporté au centre de ramassage où il est réfrigéré, soit stocké dans des réservoirs réfrigérés avant transport dans le cas d'exploitations importantes. Dans ces conditions, la flore microbienne est stabilisée mais elle n'arrive pas à empêcher complètement la croissance de tous les microorganismes (Guiraud et Galzy, 1980).

2.3. Contamination par l'animal

L'animal constitue la principale source de contamination du lait par les bactéries. En général, on distingue deux types de germes: les contagieux vivant sur le pis de la vache et qui se transmettent d'une vache à l'autre et ceux vivant dans l'environnement de la vache comme les fèces, la boue et la litière et qui infectent directement le pis. La propreté des vaches à un impact significatif sur la santé du pis et en particulier sur le taux de mammites environnementales. Le maintien de la propreté du pis et des membres des vaches permet de diminuer la propagation d'agents pathogènes de l'environnement vers le canal du trayon (Levesque, 2004).

2.4. Contamination au cours de la traite

C'est en surface des trayons que l'on retrouve la plus grande diversité de groupes microbiens: une douzaine de groupes microbiens parmi les flores utiles, flores d'altération et pathogène, qui sont systématiquement détectés. Pour un même réservoir, des différences de niveaux et de composition microbienne existent et sont liées à la saison. Ainsi, en été, les

surfaces des trayons abritent des niveaux moindres de tous les groupes microbiens, par contre, dans les lactoducs, en été, on extrait des niveaux plus importants de *Pseudomonas* (germes d'altération) (Weber, 1985).

2.5. Contamination par les équipements

Le niveau et le type de contamination du lait *via* le matériel de traite dépend largement de la procédure de nettoyage appliquée qui est souvent caractérisée par la formation des biofilms laitiers. La formation de ces biofilms sur les équipements peut entrainer de graves problèmes d'hygiène et de pertes économiques dues à la détérioration des aliments (Flint et *al*., 1997).

III. Biofilms laitiers

Chez les humains comme à l'échelle bactérienne, peu importe le degré d'évolution, aucun organisme vivant n'a d'avantage à vivre seul. La formation de biofilm semble être un dispositif universel des microbes. Beaucoup d'espèces microbiennes peuvent coloniser une série de substrats pour vivre en communauté, ce qui leur procure des mécanismes de défense supplémentaires aux stress de leur environnement (Mariani et *al*., 2011 ; Didouh,2015).

Ce mode de vie sessile est très avantageux pour les microorganismes qui y trouvent refuge pour vivre et survivre. Les biofilms microbiens sont reconnus être la source de lourds problèmes économiques et sanitaires. Ils sont responsables de la diminution des rendements et de l'augmentation des coûts de production, dus aux altérations des produits transformés et aux détériorations des appareils et des matériaux (Malek, 2019).

1. Définition du biofilm

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes, imbriquées dans un réseau de substances polymériques extracellulaires et fixées à une surface biotique ou abiotique, où une source de nutriments est disponible. Les bactéries ont de nombreux avantages à vivre en groupe (survivre dans des conditions environnementales hostiles, coopérativité métabolique), plutôt que de demeurer seules, sous la forme planctonique. La présence de ces derniers dans l'industrie laitière et fromagère peut, non seulement, entrainer une dégradation prématurée des équipements et l'altération des propriétés organoleptiques des produits en cours de fabrication, mais également favoriser le développement des toxiinfections alimentaires (Tremblay et *al*., 2014).

Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes. Elles sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Goetz et *al*., 2016). **(Figure 3)**

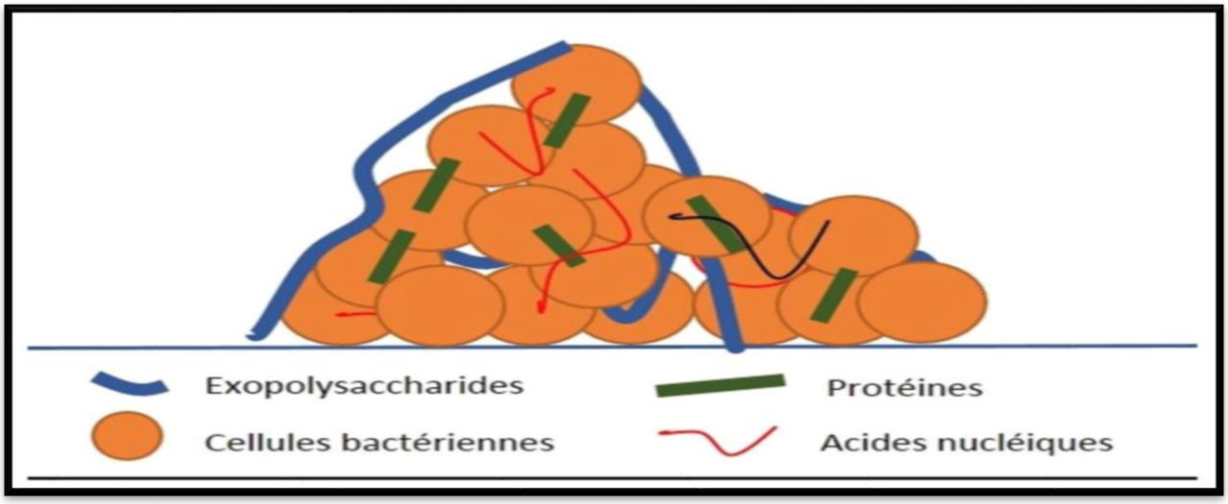


Figure 03: Composition du biofilm (Bentiba et Bentiba, 2017).

2. Etapes de formation de biofilm

La formation de biofilm est un processus complexe qui se fait très rapidement, en quelques heures, en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments. Les structures qui se forment dans les biofilms contiennent des canaux dans lesquels les nutriments peuvent circuler et des cellules présentant des motifs différents d'expression génique et pouvant se développer sur une grande variété de surfaces (les tissus vivants, les équipements de l'industrie agroalimentaire…etc.) (Tremblay et *al*., 2014). Les biofilms sont généralement formés comme il est schématisé dans la **figure 04** (Chamberland, 2018):

- Formation d'une couche de conditionnement;
- Transport et l'adhésion des bactéries;
- Formation des microcolonies;
- Croissance et la maturation;

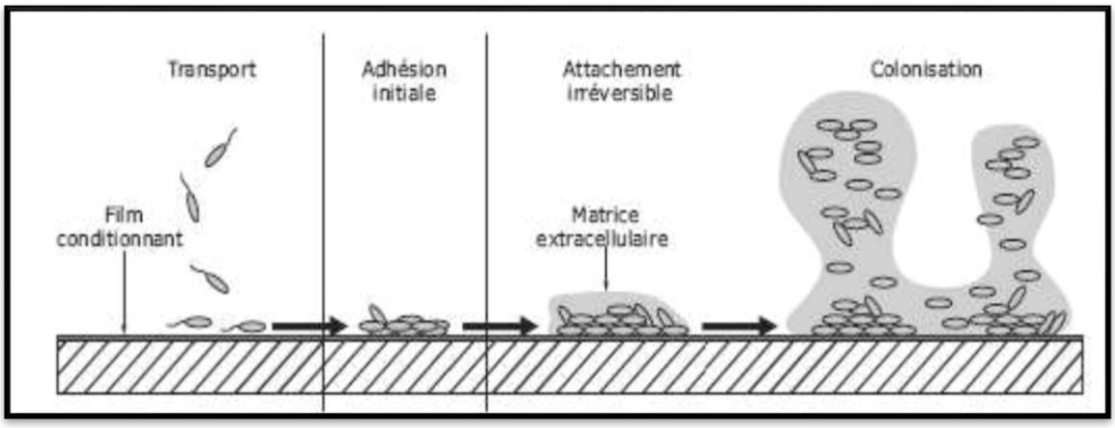


Figure 04: Représentation schématique de la formation de biofilm (Chamberland, 2018)

2.1. Film de conditionnement

L'attachement sur une surface biotique se fera soit directement à la surface, soit indirectement par l'intermédiaire d'un film conditionnant. Ce dernier est composé, sur la surface, d'un mélange complexe de molécules de la matrice de l'hôte (protéines, glycoprotéines et nutriments organiques) qui sont reconnues par les MSCRAMM qui sont ancrées dans la membrane cellulaire de la bactérie (Goetz et *al*., 2016).

Le film de conditionnement peut être constitué par des composés chimiques inorganiques ou organiques ou des composés biologiques de l'environnement. Son rôle n'est pas clairement élucidé, il modifierait les propriétés physicochimiques de surface influençant ainsi l'adhésion bactérienne (In Didouh, 2015).

2.2. Transport des bactéries vers le support

Les bactéries doivent être transportées à proximité du support par un mécanisme actif ou passif, qui dépend de la nature du milieu dans lequel elle évolue (viscosité, force ionique,…etc.) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, mouvement brownien, sédimentation,…etc.) (In Didouh, 2015).

2.3. Adhérence réversible et adhérence irréversible

L'adhésion des microorganismes à une surface inerte ou vivante est un processus complexe qui dépend des caractéristiques physicochimiques du matériel impliqué ainsi que de la surface de la bactérie mise en cause. Cette adhérence a lieu principalement en deux étapes: une adhérence réversible suivie d'une adhérence irréversible. Les interactions initiales

développées entre les cellules bactériennes et la surface sont désignées sous le nom d'adhérence réversible, qui correspondent à des interactions non spécifiques, électrostatiques influencée par la nature de la surface et aussi par des conditions environnementales. La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes **(**Goetz et *al*., 2016; Bentiba et Bentiba, 2017).

2.4. Formation de microcolonies

Une fois que l'attachement des cellules bactériennes à la surface sera définitif, elles vont s'agglutiner, se multiplier et former des microcolonies. Il y aura, alors une étape de colonisation qui consiste en une accumulation plus ou moins intense et rapide par division cellulaire des bactéries adhérées, mais aussi par recrutement continu des bactéries de la phase liquide (Tremblay et *al*., 2014).

2.5. Croissance et maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de microorganismes. Le biofilm atteint un stade mature dès la fin de sa phase exponentielle de croissance, marquée par la multiplication exponentielle des cellules qui ont adhérées aux surfaces et par la construction d'un réseau d'EPS par ces dernières. Le ralentissement observé peut être dû à un simple manque d'espace, ou à un stress environnemental. À ce moment, il y'aura un détachement de bactéries qui se dispersent dans le milieu environnement après un retour à l'état planctonique (In Chamberland, 2018; Didouh, 2015).

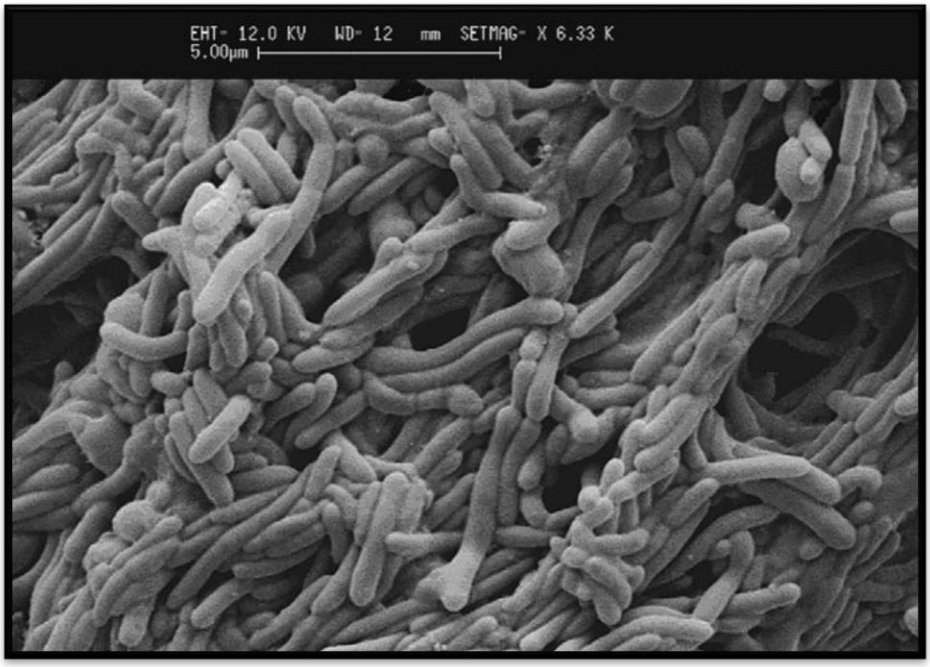


Figure 05: Micrographe d'un biofilm de 6 jours formé par *B.cereus* sur une surface en inox (Simöes et *al*., 2010)

3. Biofilms laitiers

Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire y compris le secteur des produits laitiers sont remises en cause par le problème de biofilms auxquels ils causent de lourds problèmes économiques et sanitaires. Les biofilms sont, en effet, une source de contamination des aliments transformés par des germes indésirables et sont largement impliqués dans la dégradation de la qualité organoleptique et sanitaire des produits finis et la diminution de leur durée de conservation (Malek, 2019).

On peut retrouver deux types de biofilms dans l'industrie laitière. D'abord, les biofilms environnementaux. Ce sont ceux qui se développent lentement sur toutes les surfaces humides (planchers, murs, plafonds). À l'inverse, les biofilms de procédé se développent sur les surfaces internes des équipements. Ils sont généralement peu diversifiés et se développent beaucoup plus rapidement (Chamberland, 2018).

3.1. Composition du biofilm laitier

La formation de biofilm peut avoir lieu dans les différents sites de la chaine de transformation du lait; les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs et des évaporateurs. Les bactéries présentent une prédominance dans les biofilms laitiers mais

des levures, ainsi que des *Archae* peuvent constituer ces biofilms dont la composition dépend fortement de la température de l'environnement dans lequel ils se développent. Il est possible de diviser les bactéries en trois groupes selon leur température optimale de croissance: les psychrotropes, les mésophiles et les thermophiles (Stoica et *al.*, 2018 ; Bokulich et mills, 2013).

3.1.1. Bactéries psychrotropes

Jusqu'à sa transformation, le lait est maintenu à 4 °C pour ralentir sa vitesse de dégradation par les microorganismes. Cette température favorise la croissance des bactéries psychrotrophes telle que les bactéries à Gram négatif appartenant à la classe des γ-Protéobactéries dans laquelle on retrouve *Pseudomonas, Enterobacter, Klebsiella,...* etc (Champagne et *al*., 1994 ; Von Neubeck et *al.*, 2015)

3.1.2. Bactéries mésophiles

Les mésophiles sont des bactéries caractérisées par une température optimale de croissance d'environ 45 °C et une température minimale de 10 °C. Plusieurs bactéries pathogènes sont considérées comme mésophiles: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp, ou *Staphylococcus aureus,...* etc. Certaines bactéries mésophiles sont particulièrement résistantes aux traitements thermiques; ces bactéries sont dites thermorésistantes. C'est le cas des *Streptococcaceae* tels que *Streptococcus thermophilus*, qui résistent à la pasteurisation du lait mais dont la température optimale de croissance se trouve autour de 35 °C (Quigley et *al*., 2013 ; Maher et *al*., 2001).

3.1.3. Bactéries thermophiles

Ce sont des bactéries qui peuvent se développer dans les environnements chauds (entre 45 °C et 70 °C) et qui ne présente pas une abondance dans le lait cru. Peu diversifiées au sein de l'industrie laitière, ces bactéries forment généralement des biofilms mono-espèce.

Étant très résistantes à de nombreux stress, elles survivent tout au long du parcours des fluides laitiers dans l'usine et se développent là où les autres n'ont pas la capacité. De ce fait, elles dominent les surfaces des sorties de ligne de pasteurisation ou celles d'entrée des évaporateurs et des tours de séchage (Mcguiggan et *al.*, 2002; Burgess et *al*., 2010).

IV. Les huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles, HEs, (ou parfois «essences végétales», sont un mélange de composés lipophiles, volatile et souvent liquide, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'hydrodistilation, l'entrainement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (ISO, 1997 ; AFNOR, 2000).

Le terme «HUILE» se rapportant à leurs caractères hydrophobes et visqueux, tandis que le terme « essence » est utilisé pour désigner les molécules odoriférantes contenues dans la plante et aussi le caractère inflammable. Quant au terme «essentiels» se comprenant comme étant la caractéristique principale et typique de la fragrance de ces substances **(**Wang et *al*., 2010 ; Dung et *al*., 2008).

2. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des substances constituées par un mélange complexe de composés volatiles qui se caractérisent essentiellement par des structures et des fonctions chimiques très diverses. Les principaux constituants des huiles essentielles appartiennent à deux groupes de composés distincts selon la voie métabolique empruntée, à savoir les térpénoides (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Benblaid, 2015).

3. Activité biologique

La diversité moléculaire des métabolites constituants les huiles essentielles leur confère de nombreuses activités biologiques (Toure, 2015).

3.1. Activité anti-oxydante

La lutte contre la dégradation oxydative des constituants de nature lipidiques des aliments présente un enjeu considérable pour les industries alimentaires (Jeante et *al*., 2006). De nombreuses huiles, comme les huiles essentielles de cannelle et d'organ présentent une activité anti-oxydante et sont utilisées comme substituts dans la conservation alimentaire (Burt, 2004).

3.2. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles pourraient être employées comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissants la denrée alimentaire (Lis-Balchin, 2002).

3.3. Activité antimicrobienne

Plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines huiles essentielles sur une large palette de microorganismes. Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et d'altération (May et *al*., 2000).

3.4. Activité anti- tumorale

Au cours des dernières décennies, la thérapie anticancéreuse a connu un réel bouleversement et un foisonnement de découvertes fondamentales. Les huiles essentielles (HE) et leurs constituants ont montré des activités anticancéreuses puissantes in vitro et in vivo (Bouyahya et *al*., 2016).

V. Thymus algeriensis

1. Présentation de la plante

C'est une espèce endémique de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye). C'est une plante vivace, ligneuse, formant souvent des coussinets, avec des rameaux serrés, grêles, plus ou moins dressés, recouverts de feuilles opposées, courtement pétiolées (El Ajjouri et *al*., 2010).

Figure 06: *Thymus algeriensis* (Touhami, 2017).

2. Classification (El Ajjouri et *al*., 2010).

Règne	**Plantae**
Sous règne	Tracheobiota
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Astéridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	*Thymus*
Espèce	*Thymus algeriensis*

3. Principales molécules présentes chez la plante

Tableau03: Principaux composés de *Thymus algeriensis* (Amarti et *al*., 2010).

Espèce	**Principaux composés**	**Teneur %**
Thymus algériensis	Camphre α pinène α thujène	27,7 20,5 9,64

4. Intérêt et répartition géographique en Algérie

Thymus algeriensis est une espèce qui se développe largement dans différents bioclimats, en Algérie, elle se trouve dans toutes les régions montagneuses et dans les tells. Le *Thymus algeriensis* est un antispasmodique et stimulant. Ces tisanes réveillent les fonctions digestives, surtout chez les affaiblis et évitent les fermentations de l'estomac et de l'intestin. L'infusion est aussi utile contre toutes les maladies infectieuses, comme la grippe, la pneumonie et les affections de l'appareil respiratoire (Quezel, 1963).

- **Cadre de l'étude**

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de recherche de microbiologie de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, durant une période qui s'étend de la fin du mois d'Avril jusqu'au mois de juin 2019. Il a pour objectif l'isolement et la caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus* isolées du lait de vache cru, l'étude de leur capacité à former un biofilm et aussi la recherche d'un effet inhibiteur d'une huile essentielle sur le biofilm formé.

I. Matériel

1. Matériel biologique

Les souches utilisées dans cette étude sont des bactéries isolées du lait de vache cru de deux régions différentes (Ouadhias et Tigzirt). Au total, treize souches de *Bacillus cereus* et onze souches de *Staphylococcus aureus* ont fait l'objet de formation de biofilm au sein d'une microplaque.

2. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel utilisé dans les différentes manipulations est cité en **Annexe1**.

II. Méthodes

1.Echantillonnage

1.1. Prélèvements

Des prélèvements du lait cru ont été effectués chaque semaine durant une période qui s'étend de la fin du mois d'Avril jusqu'au mois de Juin 2019, dans deux régions différentes: Ouadhias et Tigzirt. Le nombre a porté sur 10 échantillons pour chaque région, conditionnés dans des flacons stériles et directement placés dans une glacière contenant des blocs réfrigérant congelés. Ces échantillons ont été acheminés vers le laboratoire de recherche de microbiologie et immédiatement analysés, pour que l'échantillon soit représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport (Hamiroune et *al*., 2014).

1.2. Techniques de prélèvements

Le prélèvent s'effectue par usage des méthodes traditionnelles, dans un flacon stérile avec un bouchon à vis. Les premiers jets sont éliminés et le flacon est rempli au 2/3 de sa capacité (Guiraud, 2003).

2. Analyses microbiologiques

La vérification de la qualité microbiologique du lait cru est une étape importante qui vise d'une part à conserver les caractéristiques organoleptiques du lait et d'autre part à prévenir les cas d'intoxication alimentaire, liée à la présence des microorganismes pathogènes avant la transmission au consommateur. Cette analyse se porte sur la recherche d'un certain nombre de microorganismes susceptibles d'être présents dans le lait, plus précisément les deux espèces; *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* qui sont deux germes assez fréquents dans la filière laitière (Vignola, 2002).

2.1. Traitement des échantillons

Un écouvillon stérile est trompé dans l'échantillon du lait à analyser afin de racler minutieusement pour assurer une récupération maximale de germes. L'écouvillon chargé est mis dans un tube stérile contenant 5mL de Tryptone-sel-eau (TSE), qui vont être agités pendant au moins une minute au vortex pour détacher les germes. Deux échantillons ont étaient préparés et un traitement thermique de 80°C pendant 10 minutes est appliqué pour l'un des deux (Peng, 2001).

2.2. Isolement et purification des souches

Après avoir préparé les échantillons, les ensemencements se font dans des boites Petri contenant de la gélose nutritive et l'incubation dure de 24 à 48 h à 37°C. La purification des souches a été réalisée par repiquage successif sur gélose nutritive (Peng, 2001).

2.3. Identification des souches

2.3.1. Caractérisation morphologique des isolats

2.3.1.1 Aspect macroscopique des isolats

L'examen macroscopique permet la description des colonies, a savoir: la forme, la taille, la couleur, l'aspect de surface, le contour…etc.

2.3.1.2. Aspect microscopique des isolats

L'examen consiste à vérifier la morphologie, l'arrangement cellulaire et la réponse à la coloration de Gram. C'est une coloration différentielle qui permet de diviser les bactéries en deux grands groupes (Gram positif et Gram négatif), selon leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de leur paroi. Cette technique s'applique comme suit:

- Réalisation d'un frottis, et fixation de ce dernier par la chaleur.
- Coloration au violet de Gentiane en planant la lame dans la solution pendant 1 minute, ensuite le rinçage avec de l'eau distillée.
- Mordançage au lugol en étalant le lugol sur la lame et laisser agir 1 minute, puis rincer avec de l'eau distillée.
- Décoloration à l'alcool par le versement de quelques gouttes sur la lame, laissé agir 30 secondes et le rinçage encore une fois avec de l'eau distillée.
- Contre coloration avec la fushine pendant 1 minute, puis le rinçage délicatement avec de l'eau distillée.
- Séchage de la lame et observation au microscope photonique au grossissement 100 en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion (Gram, 1884).
- Les souches qui étaient en faveur de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*, sont portées sur un milieu gélosé de Mossel et un milieu gélosé de Chapman, incubées à 37°C pendant 24 heures, respectivement (Peng, 2001).

Le milieu Mossel est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement de *B. cereus*. Son principe repose sur l'incapacité de *B. cereus* a fermenté le mannitol (colonies roses). Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par le sulfate de la polymyxine B (Messelhäusser et *al*., 2010).

2.3.2. Etude des caractères biochimiques

2.3.2.1. Test de catalase

La présence de la catalase est mise en évidence en déposant à l'aide d'une anse une quantité suffisante de la colonie sur une lame en verre contenant une goutte d'eau oxygénée. La présence de l'enzyme se traduit, en quelques secondes, par l'apparition de bulles d'air et dégagement gazeux (Gerhardt et *al*., 1994).

2.3.2.2. Test de désoxyribonucléase (ADN ase)

Le test est utilisé pour déterminer la capacité d'un organisme à hydrolyser l'ADN, grâce à une enzyme, l'ADN ase. Cette enzyme est recherchée par la culture des souches à tester sur des boites de Petri contenant de la gélose à ADN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. La mise en évidence de cette enzyme se traduit par la présence d'une zone claire tout autour de la culture bactérienne, après inondation de la boite Petri avec une solution de bleu de toluidine (Enari et *al*., 1998).

2.3.2.3. Test de coagulase

L'identification des *Staphylococcus aureus* se base sur la morphologie coloniale, les caractéristiques biochimiques et l'examen microscopique. Toutefois, la détection de la coagulase est le critère le plus généralisé pour différencier une espèce d'une autre.

L'essai est réaliser par le mélange de 0.5 mL d'une culture de *Staphylococcus aureus* sur bouillon cœur cervelle (BHIB) à un tube stérile contenant le plasma, l'incubation se fait à 37°C pendant une durée maximale de 4 heures. La formation d'un caillot indique la production de coagulase (Dagnra et *al*., 2000).

2.4. Conservation des souches

Les souches obtenues après l'ensemble des analyses, vont faire l'objet d'une conservation à 4 °C dans du TSB (Bouillon Tryptone Soja) additionné du glycérol et aussi dans des tubes de gélose nutritive inclinés (Peng, 2001). .

3. Etude de la formation de biofilm dans la microplaque

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm. Il s'agit notamment de la plaque de culture en Tissue(TCP), la méthode de Tube (TM), et la méthode de Rouge-Congo Agar (ARC) et aussi par la microplaque de titration (Gordon et *al*., 1985).

Dans le présent travail, la formation de biofilm est réalisée dans les puits des microplaques de titration en polystyrène stérile. Une suspension bactérienne est préparée dans l'eau physiologique, ajustée à une DO (densité optique) de 0.08-0.1, et est introduite par la suite dans les puits de la microplaque (50uL), additionnée à 150uL du TSB. La microplaque est incubée pendant 48 heures à 37°C. Le biofilms formées sur la surface des puits subissent les traitements suivants:

- Les plaques sont d'abord vidées avec la micropipette.
- Les puits sont lavés trois fois avec un tampon PBS non stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Laisser sécher 10 à 15 min.
- Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet pendant 15 min, (le cristal violet est une petite molécule qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement).

- L'excès du colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée stérile et les plaques sont laissées à température ambiante pour séchage.
- Avant la mesure de la DO optique au moyen d'un lecteur ELIZA à 590 nm, les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée de méthanol **(**Stepanovic et *al.*, 2000).
- **Lecture de la microplaque**

La quantification de biofilm formé au niveau de la microplaque se fait par moyen de deux méthodes; une méthode directe dites visuelle qui consiste à voir à l'œil nu la formation qui se fait préférentiellement sur les bordures des puits, se caractérisent par l'apparition d'un anneau variable d'une souche à l'autre**(Figure 07)**. Une méthode indirecte qui se porte sur la mesure de la DO à 590 nm au lecteur de microplaque (ELIZA).

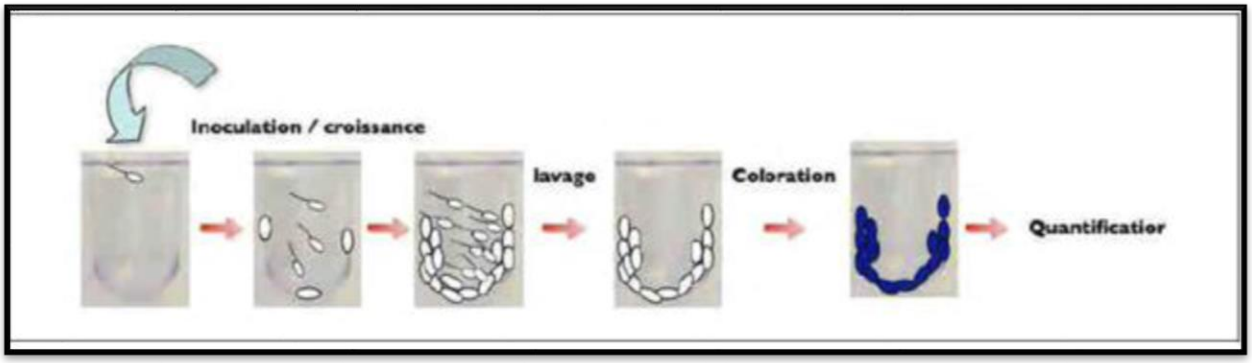


Figure 07: Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques(Laurent, 2011).

3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne. Elle demeure aussi la mesure de référence pour déterminer la sensibilité des bactéries planctoniques à divers agents antimicrobiens. Le test est établi en utilisant une microplaque de titration à 96 puits. Dans un premier temps, les puits sont remplis avec 30uL de la suspension bactérienne ajusté avec trois dilutions de TSB, qui ont été préparé respectivement 70uL, 85uL, 92.5uL additionné aussi avec trois dilutions de l'huile essentielle (*Thymus algeriensis*) 30uL, 15uL, 7.5uL. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h et l'observation se fait par usage visuelle de la formation d'un trouble ou d'un dépôt au niveau des puits (Wiegand et *al.*, 2008).

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm (CMIB)

La CMIB est la plus faible concentration pour laquelle le développement du biofilms n'est pas observé à l'œil nu. Dans un premier temps, des tubes stériles sont remplis avec 5mL de bouillon nutritif, ajusté avec une suspension bactérienne à 10^8 UFC/mL puis incubés à 30°C pendant 24h. Après incubation, une microplaque de 96 puits est remplie avec 100uL d'inoculum préparé et 70uL de BHIB auquel on a fait trois exemplaires. En même temps, trois dilutions de l'huile essentielle sont ajoutées (30uL/15uL/7.5uL), respectivement, puis incubée à 37°C pendant 24h. Ce test a été effectué pour l'ensemble des souches de *S. aureus* et de *B.cereus* récoltées mais chacune à part dans une microplaque, afin d'observer l'effet inhibiteur apporté par l'huile essentielle après formation de biofilm (Nostro et *al.*, 2007).

3.3. Extraction de l'huile essentielle *T. algériensis*

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Pour cela, 100 g de matière fraîche ont été trempés dans un récipient de 1L, puis remplis de 600 mL d'eau distillée, le système de trous a été bouilli pendant 3 heures. Des vapeurs massives d'huiles essentielles ont été condensées en traversant un réfrigérateur et collectées par la suite. Les huiles obtenues ont été déshydratées sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et conservées à 4 ° C à l'abri de la lumière (European–Pharmacopoeia (2005).

3.4. Analyse GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, la période et la zone géographique de la récolte (Salzer, 1977). L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle obtenue a été réalisée par GC-MS. Le dispositif utilisé était le GC Perkin Elmer 600, SM Perkin Elmer 600C, utilisant également une colonne Rtx-VMS (60 m de long, 250 øm de diamètre). Le gaz vecteur était de l'hélium (1 mL / min). On a injecté 0,2mL de l'huile à analyser à l'aide d'une seringue.

3.5. Etude statistique des données

L'étude statistique se définie comme une méthode qui permet l'analyse des données et la présentation des résultats de manière à les rendre compréhensifs et interprétables. Dans

notre étude, une mesure statistique a été mise en place afin de mieux présenter et interpréter les résultats obtenus. Elle consiste en:

- Un test de Khi- deux afin de déterminer l'effet des conditions liées à la région sur le taux d'isolement des souches;

Un histogramme représentatif est réalisé pour les résultats obtenus après la mesure de l'absorbance afin de constater le taux de formation de biofilm par apport au témoin(-).Un histogramme représentatif est réalisé pour l'ensemble des résultats obtenus de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm (CMIB) de chaque souche.

1. Isolement et purification des souches

Après incubation à 37°C pendant 24h sur gélose nutritive, il y'a apparition de différentes formes de colonies à aspects macroscopiques assez variés. Une purification de colonies a été faite par repiquage successif sur gélose nutritive, pour les 20 échantillons étudiés et par la suite sélectionnées selon des critères fixes. **(Figure 08)**

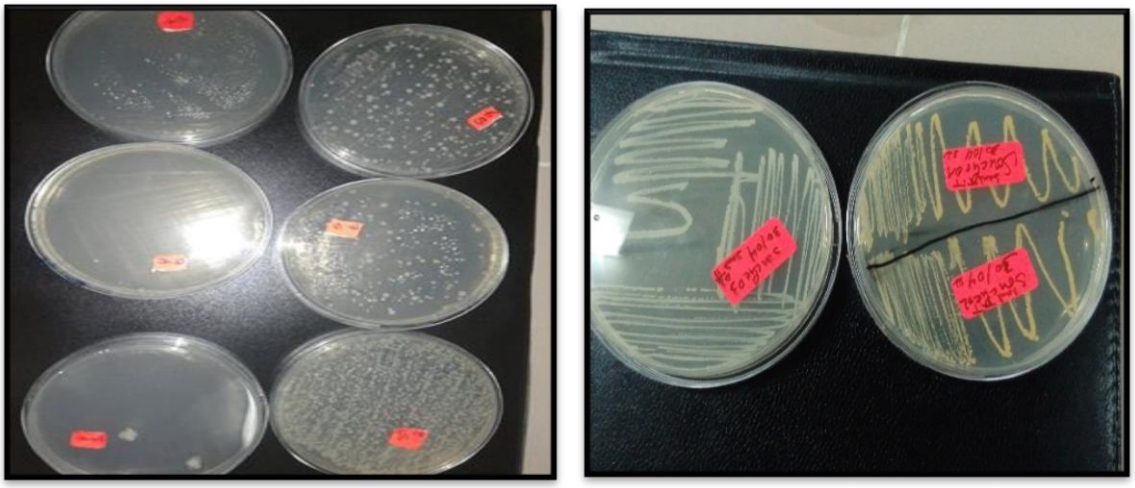


Figure 08: Isolement et purification des souches à partir du lait de vache cru

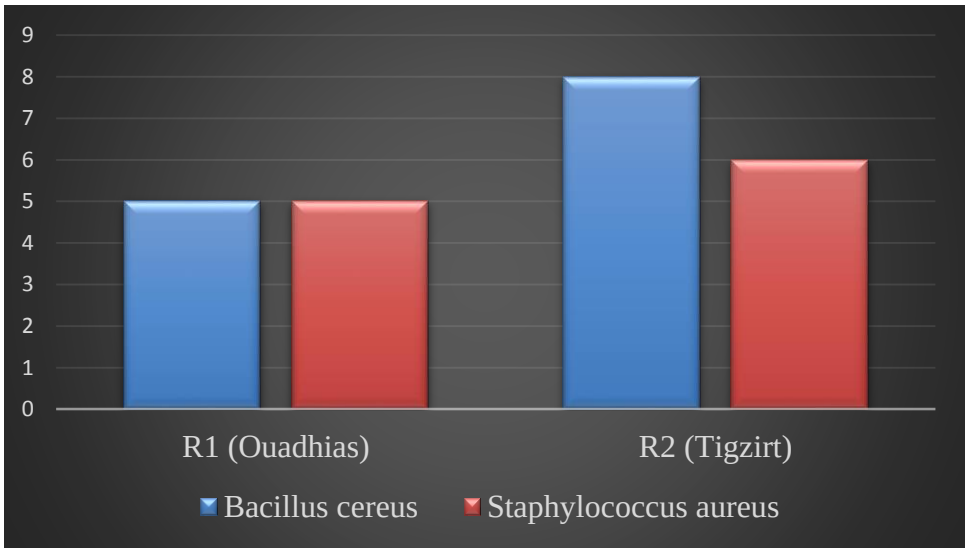


Figure 09: Fréquence d'isolement des bactéries dans les deux régions (Ouadhias, Tigzirt).

Après avoir fait une mesure statistique qui s'intitule: Test de Khi-deux d'indépendance, le résultat a montré que le nombre de bactéries isolées au niveau de la région 01 (Ouadhias) est différent du nombre de bactéries isolées dans la région 02 (Tigzirt), que ce soit pour les Bacilles ou bien pour Staphylocoques**(Figure 09)**. Cela est probablement lié à plusieurs raisons dont:

- Les traitements vétérinaires et le suivi de l'état de santé des vaches;
- Les conditions d'élevage (propreté, aération…etc.);
- Selon que la ferme se trouve en montagne 'Ouadhias' ou en plaine 'Tigzirt'. Ce positionnement conditionne la nourriture des vaches. Sachant que dans la région montagnarde, les vaches restent à l'étable toute l'année, ce qui les diffère des vaches qui pâturent presque chaque jourau niveau de Tigzirt.

2. Caractérisation morphologique des isolats

2.1. Examen macroscopique des isolats

L'observation des caractères culturaux des colonies est le premier examen qui a été effectué après l'incubation des souches à 37°C sur gélose nutritive. Cependant, il y avait peu de diversité dans leur aspect macroscopique. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 04.** Après l'incubation, les souches forment des colonies en bâtonnet, rondes de grande et de petite taille, de surfaces lisses dans les plupart des cas.

Tableau 04: Caractères culturaux des souches cultivées à 37°C.

Aspect / Souches	Forme	Taille	Contour	Surface
S22-S1	Irrégulière	Petite	Irrégulier	Lisse
S4-S8-S9-S10 S11-S18-S21 S23-S'5-S'6 S'10-S'11	Rondes	Moyenne	Irrégulier et régulier	Lisse
S5-S7-S19 S20 -S'9-S'15	Bâtonnet	Grande	Irrégulier et régulier	Lisse
S13-S14-S15 S'1-S'3-S'8	Bâtonnet, parfois sous forme de filament	Petite	Irrégulier et régulier	Lisse et rigoureuse
S6-S12-S16 S17-S'2-S'7 S'12-S'13	Bâtonnet	Petite	Régulier	Lisse

2.2. Examen microscopique des isolats (coloration de Gram)

L'observation de la forme des cellules et de leurs arrangements a été réalisée avec un microscope optique au grossissement (×100),en additionnant l'huile à immersion, voir la **figure 10**

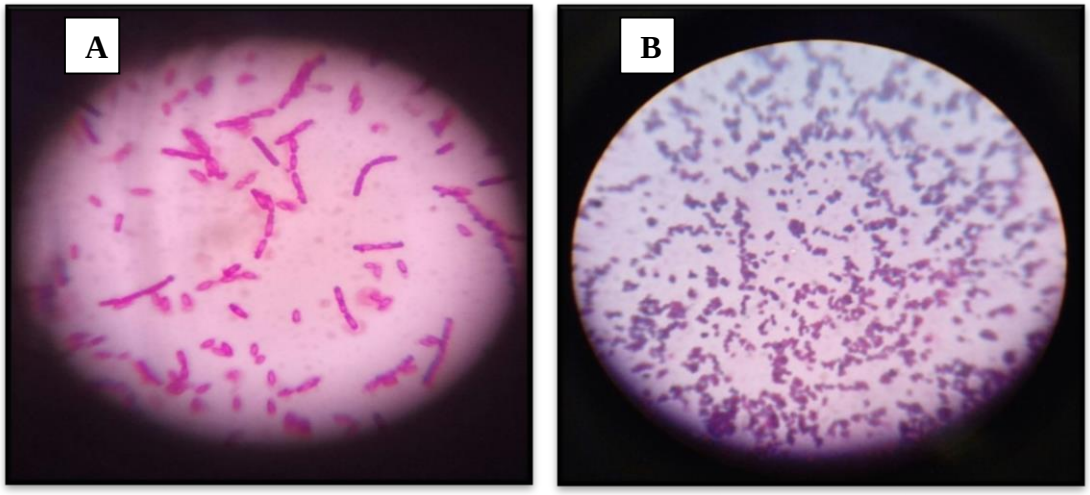


Figure 10:A).Aspect de *Bacillus cereus* sous microscope optique; B). **A**spect de *Staphylococcus aureus* sous microscope optique.

Les résultats obtenus par la coloration de Gram pour l'ensemble des 20 échantillons sont résumés dans les deux tableaux qui suivent: la majorité des bactéries sont des Gram positifs apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. On retrouve une large gamme de bactéries citons par exemple des bacilles ayant une coloration Gram+, des Colibacille ayant une coloration Gram – et aussi des Cocci qui se trouvent en abondance.

Tableau 05: Aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 10 premiers échantillons.

Souches	Gram (+/-)	Forme	Regroupement
S1	+	Cocci	En tétrade
S2	+	Bacille	En paire
S3	+	Bacille	Diplocoque
S4	+	Cocci	En amas
S5	+	Bacille	Chainettes courtes
S6	+	Bacille + spore déformante	Individuel
S7	+	Bacille	Chainette
S8	+	Cocci	En amas
S9	+	Cocci	En amas
S10	+	Cocci	En amas
S11	+	Cocci	En amas
S12	+	Bacille	Individuel
S13	-	Colibacille	Chainette
S14	-	Colibacille	Chainette
S15	-	Colibacille	Chainette
S16	+	Bacille	Individuel
S17	+	Bacille	Individuel et en paire
S18	+	Cocci	En amas
S19	+	Bacille	Chainette
S20	+	Bacille	Chainette
S21	+	Cocci	En amas
S22	-	Cocci	Chainette
S23	+	Cocci	En amas

Tableau06: Aspect microscopique des différentes bactéries isolées à partir des 10 derniers échantillons.

Souches	Gram (+/-)	Forme	Regroupement
S'1	+	Colibacille	Chainette
S'2	+	Bacille	Individuel
S'3	-	Colibacille	Chainette
S'4	+	Bacille sporulé	En paire
S'5	+	Cocci	En amas
S'6	+	Cocci	En amas
S'7	+	bacille	Individuel
S'8	-	Coccobacille	Chainette
S'9	+	Bacille	Chainette
S'10	+	Cocci	En amas
S'11	+	Cocci	En amas
S'12	+	Bacille	Individuel
S'13	+	Bacille	Individuel
S'14	+	Bacille	En paire
S'15	+	Bacille	Chainette

3. Identification de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus spp*

Après l'examen microscopique fait pour l'ensemble des souches isolées on s'est focaliser plus précisément sur la recherche de deux espèces; *B. cereus* et *S. aureus.*

1. Identification de *Bacillus cereus*

La recherche de *B. cereus* a été mise en évidence en favorisant la germination des spores suite à un traitement thermique effectué sur l'ensemble des échantillons. L'identification préliminaire a permis de sélectionner 16 souches de *B. cereus*, qui seront ensuite ensemencées dans un milieu sélectif de Mossel. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant:

Tableau 07: Croissance sur milieu Mossel des souches de *B. cereus*

Souches	S2	S5	S7	S12	S16	S17	S19	S20	S'2	S'4	S'7	S'9	S'12	S'13	S'14	S'15
Milieu Mossel	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

L'aspect morphologique des 13 isolats ayant présentés un résultat positif sur le milieu, s'est décliné en différentes formes après incubation à 37°C pendant 24h à 48h. Un virage de la couleur du milieu vers le rose a également été aperçu comme le démontre la **figure 11**, ce qui confirme que c'est des souches de *B. cereus.*

- De grandes colonies crémeuses plates avec un centre plus opaque.
- De petites colonies rondes blanches, étant régulières.

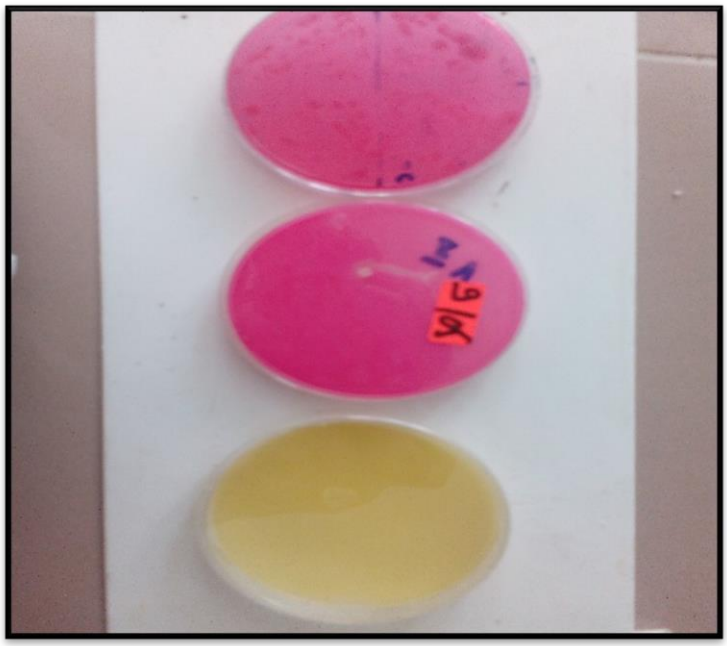


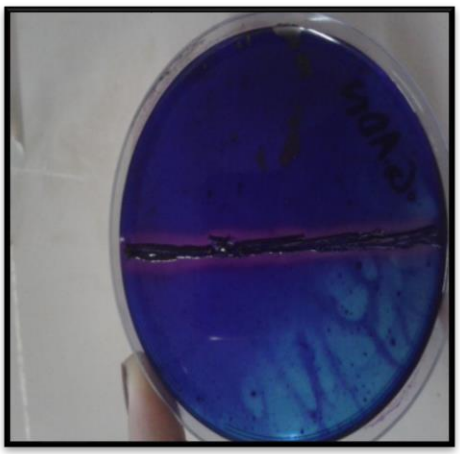
Figure 11: Aspect macroscopique de *Bacillus cereus* sur le milieu gélosé de Mossel

2. Identification de *Staphylococcus spp*

L'étude préliminaire a permis de sélectionner 14 souches du genre Staphylococcus. Après la confirmation du genre avec coloration de Gram et le test de catalase, l'identification est faite par des tests biochimiques (ADN ase et coagulase). L'ensemencement est fait sur le milieu gélosé de Chapman, après incubation pendant 24h, les colonies apparaissent pigmentées (jaune doré) dans l'ensemble de la boite. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant:

Tableau 08: Résultats des tests biochimiques obtenus pour les isolats des staphylocoques

Souches	Catalase	ADN ase	Coagulase	Mannitol
S4	+	+	+	+
S8	+	+	+	+
S9	+	+	+	+
S10	+	+	+	+
S18	+	+	+	+
S21	+	+	+	+
S23	+	+	+	+
S'11	+	+	+	+
S'5	+	+	+	+
S'6	+	+	+	+
S'10	+	+	+	+
S1	+	-	-	-
S11	+	-	-	-
S22	+	-	-	-



ADN ase +

Catalase +

Coagulase +

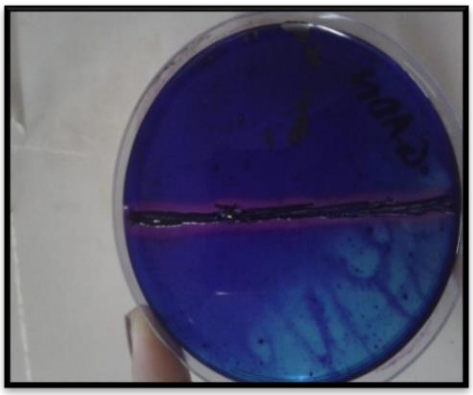
Mannitol+

Figure 12: Résultats des tests biochimiques obtenus pour les isolats de *S.aureus.*

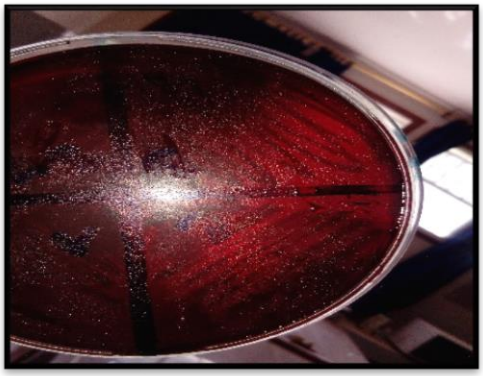
Au regard des résultats obtenus, le taux de contamination du lait par *S. aureus* et *B. cereus* est important et assez variable en fonction du circuit de collecte au niveau des deux régions. Sachant que *B. cereus* est un germe qui se transmet par le mode de végétation des vaches, alors que l'origine de *S. aureus*n'est pas encore définie.

Une souche isolée de la région OUADHIAS présente des caractéristiques phénotypiques et biochimiques (Catalase + et ADN ase +) en faveur d'un Staphylocoque. Elle présente un Mannitol – sur le milieu Chapman.

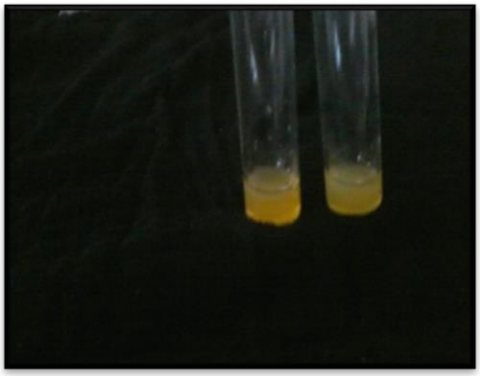
Gélose Chapman



ADN ase +



Gélose au sang



Coagulase -

MEVAG

Figure 13: Tests effectués pour l'indentification de la souche isolée de la région Ouadhias.

Selon l'ensemble des analyses effectuées dans le but d'identification, on peut constater que cette souche est en faveur d'un *Staphylococcus epidirmidis.*

Un travail réalisé en 2017 par Bentiba et Bentiba a consisté sur l'utilisation de 19 souches de *Staphylococcus* spp issu d'une collection de lait de vache au niveau de l'usine Arib –Ain Defla, suivi par un travail fait en 2015 par Didouh, qui a consisté sur l'isolement et l'identification de 155 isolats parmi lesquels, 126 se sont révélés appartenant au groupe *Bacillus cereus*. Ceci confirme donc que la bactérie *B. cereus* est répandue dans le lait de vache cru.

4. Evaluation de la formation de biofilm

11 souches de *S. aureus* et 13 souches de *B. cereus* isolées à partir des 20 échantillons ont été testées pour mettre en évidence leur potentiel de formation du biofilm sur une microplaque de 96 puits.

La méthode utilisée a permis de quantifier le taux de formation du biofilm pour l'ensemble des souches isolées. La couche du biofilm adhérente dans chaque puits est considérée comme positive car on aperçoit un film visible qui borde le fond des puits et la surface de la microplaque.

La formation de biofilm dans la microplaque est analysée d'abord par une simple observation à l'œil nu des puits après une coloration au cristal violet, ensuite à l'aide de l'appareil ELISA où l'absorbance des populations à 590 nm a pu être mesurée **(Figure 14).**

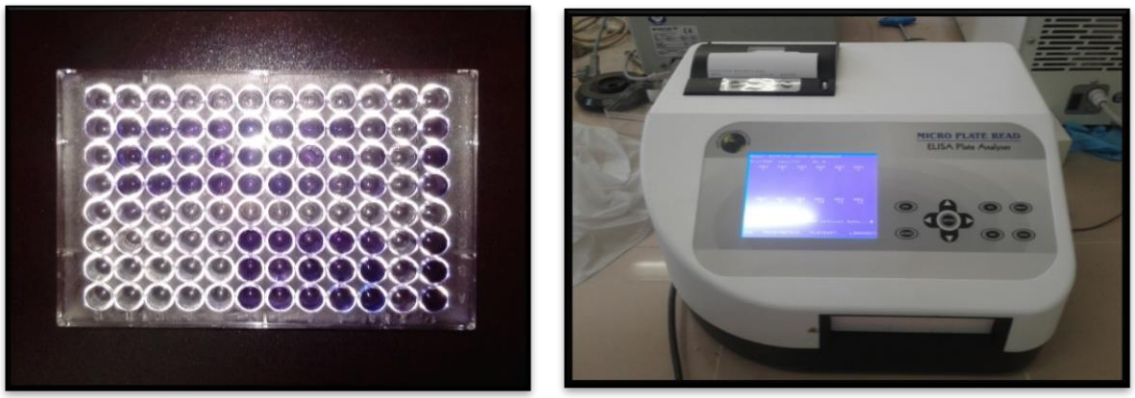


Figure 14: Quantification de formation du biofilm par deux méthodes(visuelle, lecteur ELIZA).

Les résultats obtenus après la mesure de l'absorbance par l'appareil ELISA pour l'ensemble des souches sont introduits dans le tableau suivant:

Tableau 09: Résultats obtenus après la mesure de l'absorbance par l'appareil ELISA.

	Répitition01	Répitition02	Répitition03	Moyenne ± Ecart type
Témoin(-)	0.02	0.01	0.02	**0.016±0.005**
S2	0.789	0.550	0.526	**0.621±0.145**
S5	0.421	0.478	0.353	**0.417±0.062**
S7	0.586	0.245	0.659	**0.496±0.220**
S16	0.249	0.395	0.216	**0.286±0.095**
S20	1.552	1.588	1.735	**1.625±0.096**
S4	1.394	0.705	1.447	**1.182±0.413**
S8	1.803	1.134	0.564	**1.167±0.620**
S9	1.574	1.160	0.991	**1.241±0.299**
S10	1.508	0.904	0.943	**1.118±0.338**
S18	1.284	0.466	1.253	**1.001±0.463**
S21	1.631	1.088	0.809	**1.176±0.418**
S23	1.295	1.102	0.615	**1.004±0.350**
S'2	1.062	1.985	1.818	**1.621±0.491**
S'4	1.83	1.8	1.85	**1.826±0.025**
S'7	1.008	1.978	1.966	**1.650±0.556**
S'9	1.91	1.754	1.857	**1.840±0.079**
S'12	1.906	1.797	1.854	**1.852±0.054**
S'13	1.617	1.625	1.764	**1.668±0.082**
S'14	1.792	1.914	1.749	**1.818±0.08**
S'15	1.568	1.758	1.601	**1.642±0.101**
S'5	2.07	2.051	2.089	**2.07±0.019**
S'6	1.912	2.171	1.803	**1.962±0.189**
S'10	1.274	1.296	1.162	**1.244±0.071**
S'11	2.022	1.969	2.062	**2.017±0.046**

Selon le **tableau 09** on peut constater par rapport aux résultats obtenus que l'ensemble des souches présentes des valeurs d'absorbance (DO) supérieures en comparaison avec celles du témoin(-), que ce soit pour les souches de *S. aureus* ou bien pour *B. cereus.* D'après ces résultats, la technique de microplaque à 96 puits s'avère une bonne méthode pour le dépistage de la formation du biofilm in *vitro*. Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (Racha et *al*., 2012).

Après coloration au cristal violet, une observation à l'œil nu est faite pour la microplaque. On a pu constater la formation d'un film à la surface de la microplaque et au fond des puits, donc on peut déterminer visuellement la formation de biofilm attribué pour chaque souche comme la **figure 15** peut l'illustrer.

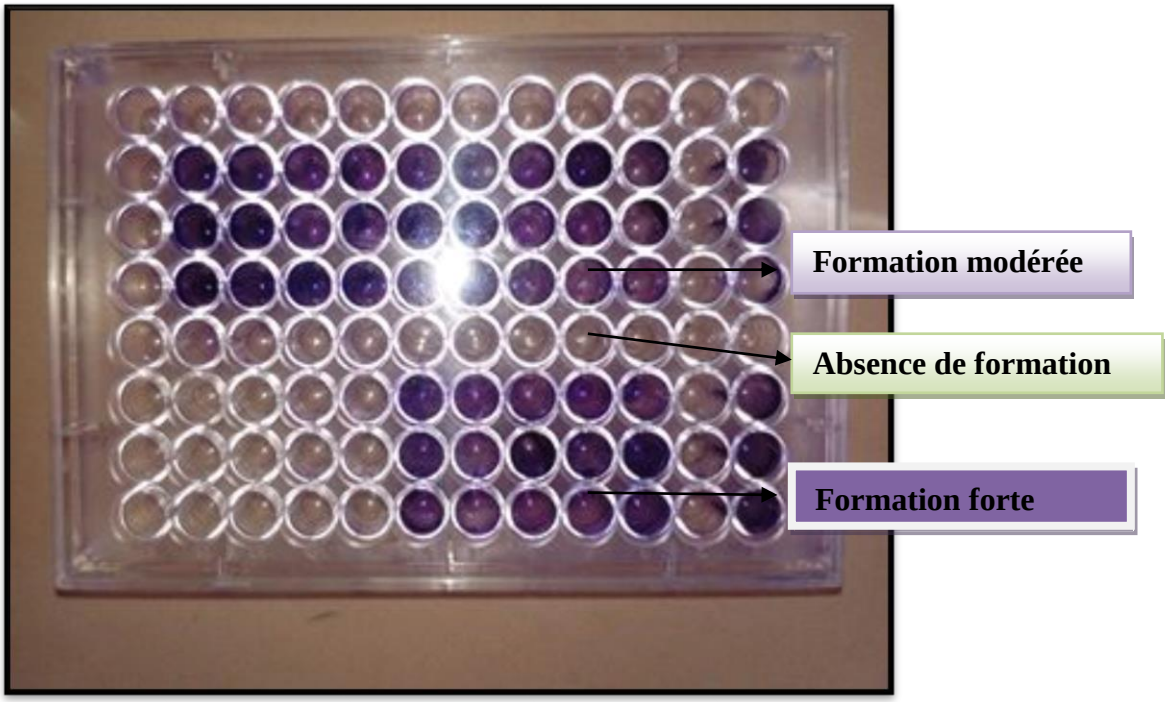


Figure 15: Formation de biofilm par *S. aureus* et *B. cereus*.

Afin d'interpréter et d'évaluer la formation du biofilm par rapport au témoin(-) introduit, un calcul de la moyenne a était fait pour le témoin (-) et pour l'ensemble des souches de *B. cereus* et *S. aureus.* Les valeurs obtenues ont été converties en histogramme sur Excel et les écarts types ont été convertis en barres d'erreurs comme présenter dans la **figure 16.**

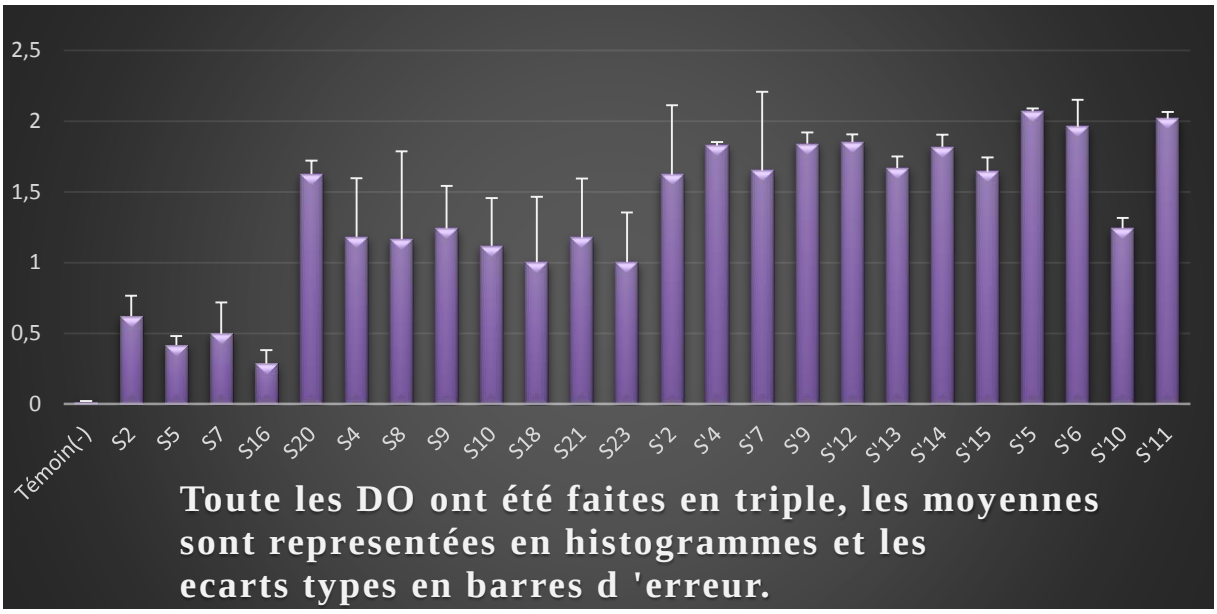


Figure16: Evaluation de la formation de biofilm des souches isolées après la mesure de l'absorbance par l'appareil ELISA

Selon la figure 16, on peut constater que toutes les souches isolées dans les deux régions montrent un potentiel de formation de biofilm au sein de la microplaque par rapport au témoin (-) introduit. On peut déterminer aussi que n'y a pas vraiment une différence significative sur le taux de formation de biofilm des *S. aureus* par apport aux *B. cereus*. La souche S'5 qui est une *S. aureus* présente le meilleur potentiel de formation. On constate aussi que les souches isolées au niveau de la région Ouadhias sont plus formatrices en biofilm, par rapport à celles isolées au niveau de la région Tigzirt. Cette différence revient sur les conditions d'élevages et le positionnement des vaches dans chaque région. Les vaches au niveau de la région montagneuse d'Ouadhias sont plus habituées à résister à des conditions environnementales hostiles.

5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *T. algeriensis* vis-à-vis de l'ensemble des souches isolées à l'état planctonique et à l'état biofilms sont représentés dans les deux tableaux qui suivent:

- ***Staphylococcus aureus***

Tableau 10: Effet inhibiteur de *T. algeriensis* vis-à-vis des souches de *S. aureus* isolées à l'état planctonique et à l'état biofilm.

Souches	S4	S8	S9	S10	S18	S21	S23	S'5	S'6	S'10	S'11
CMI	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
CMIB	0.044	0.044	0.044	0.088	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044

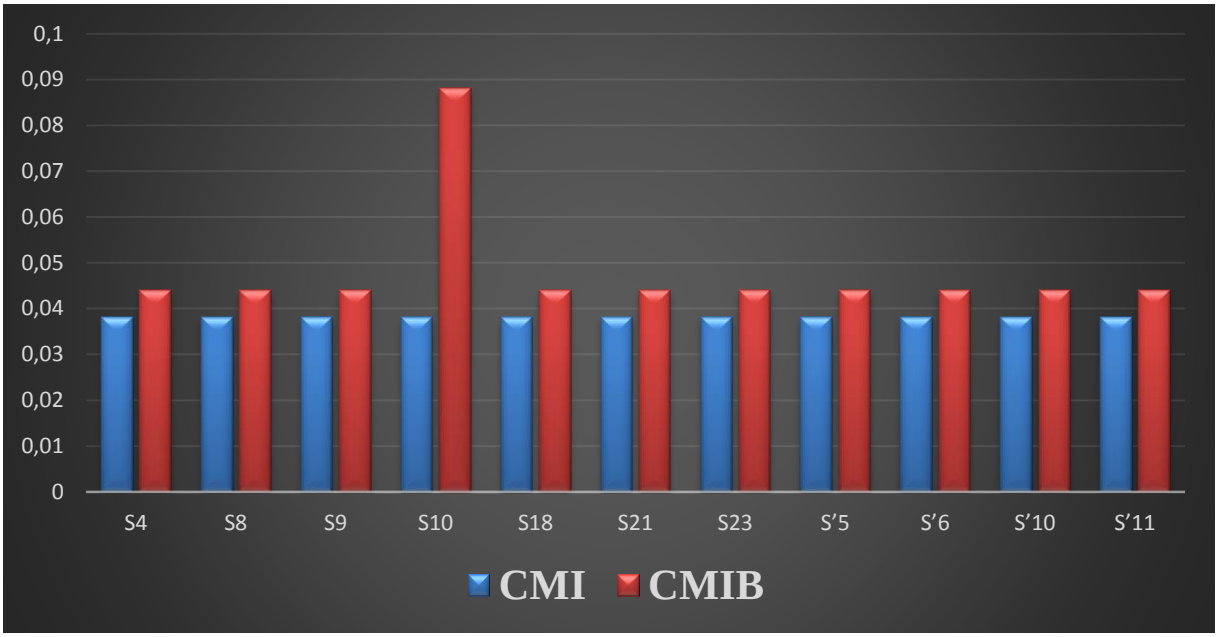


Figure 17: Histogramme représentatif de la CMI et CMIB de *S. aureus*

- ***Bacillus cereus***

Tableau 11: Effet inhibiteur de *T. algeriensis* vis-à-vis des souches de *B. cereus* isolées à l'état planctonique et à l'état biofilm.

Souches	S2	S5	S7	S16	S20	S'2	S'4	S'7	S'9	S'12	S'13	S'14	S'15
CMI	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057
CMIB	0.044	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044

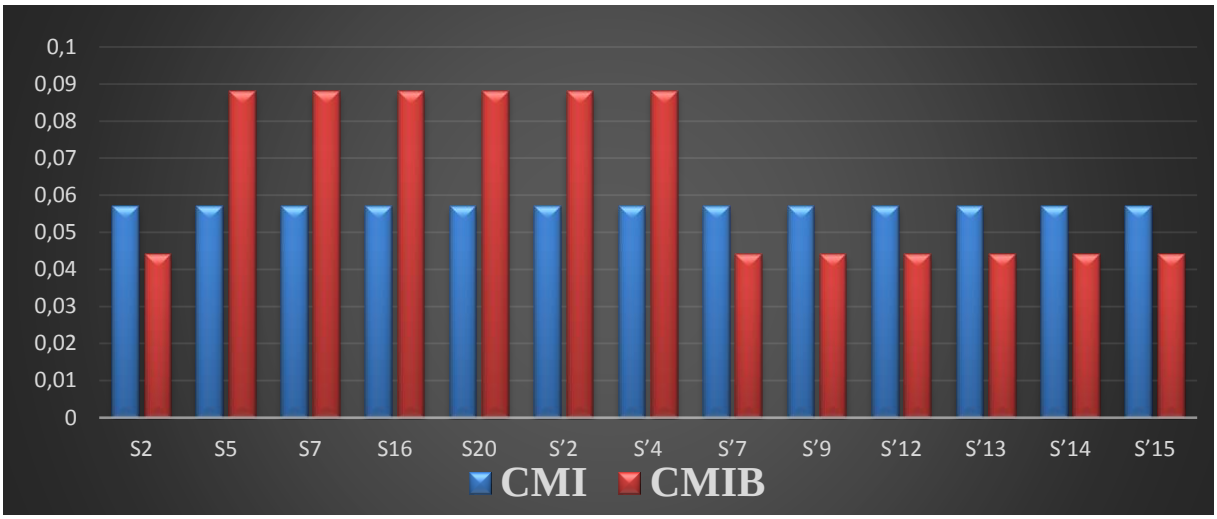


Figure 18: Histogramme représentatif de la CMI et CMIB de *Bacillus cereus.*

La détermination des CMIs est une technique fiable, car elle permet de connaitre la concentration qui inhibe la croissance bactérienne. Selon les résultats obtenus, *T. algeriensis* est active vis-à-vis des souches de *S. aureus* et *B. cereus* à l'état planctonique avec des CMI de l'ordre 0.038 à 0.057%.

L'histogramme représentatif, nous a permis de constater qu'il y'a pas de différence significative entre la sensibilité des souches envers l'huile de *T. algeriensis,* par contre les souches de *S. aureus* présente une CMI plus faible par rapport aux souches de *B. cereus.* Selon Benbelaïd à l'état planctonique l'huile de *T. algeriensis* agit de la même façon vis-à-vis chaque souche de ces deux groupes de bactéries séparément (Benbelaïd et *al.*, 2012).

D'après les résultats ci-dessus, on remarque que les CMIBs sont plus au moins grandes par rapport à celles des CMIs, ce qui traduit la résistance des souches à l'état biofilm par rapport aux souches à l'état planctonique. Comme à l'état planctonique l'huile de *T. algeriensis* est active vis-à-vis des souches de *S. aureus* et *B. cereus* en biofilm, cette l'huile peut inhiber la croissance de ces microorganismes avec des concentrations qui varient entre 0.044 et 0.088% (Sanchez et *al*., 2013).

- **Molécules intervenant dans l'effet inhibiteur exercé par *T. algeriensis*vis-à-vis l'ensemble des souches à l'état planctonique et l'état biofilm.**

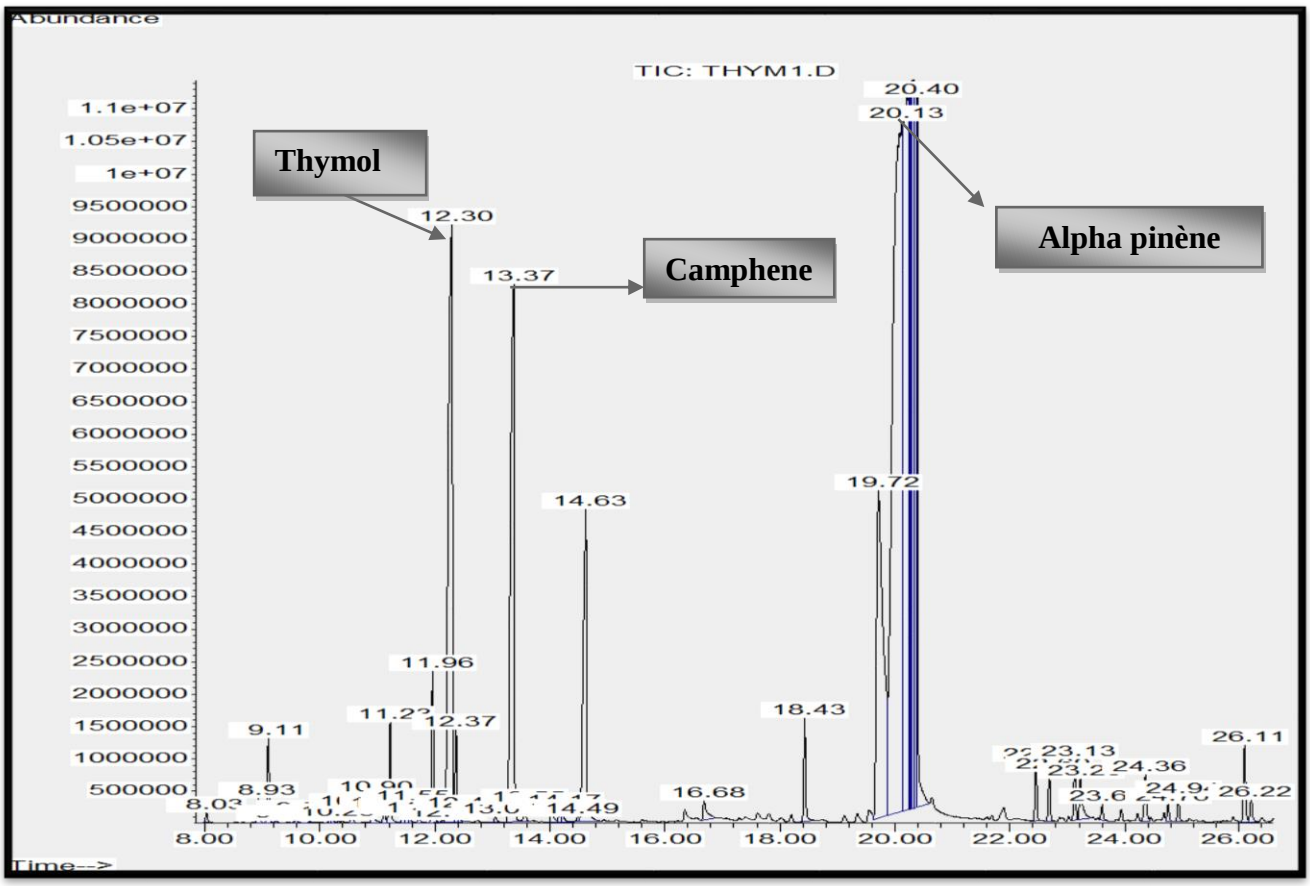


Figure19: Profil chromatographique des principaux composants de l'huile *T. algeriensis*.

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, leurs l'activité semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004):

- Altérations membranaires: les HEs sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraine un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaire des substances nutritives (Burt, 2004).
- inhibitions enzymatiques : les groupements fonctionnels des composés terpéniques (phénoliques et aldéhydiques) des HEs réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique (Giordani et *al.*, 2008).

La principale caractéristique des molécules présente dans les HEs est leurs hydrophobicité. Elle permet leurs solubilisation dans les membranes ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et *al.*, 1994).

Selon la **figure 19**, on peut constater que les trois molécules indiquées sur le profil chromatographique sont les plus abondantes de *T. algeriensis*. On peut dire que l'effet inhibiteur apporter par l'huile sur l'ensemble des souches à l'état planctonique et à l'état biofilm serait lié à la présence de ces molécules et à l'effet qu'elles apportent. Le Thymol par exemple semble capable d'augmenter la perméabilité membranaire. Il entraine une altération de la paroi bactérienne et une agrégation du cytoplasme. Il possède un très large spectre d'activité antimicrobien et qui est naturellement présente dans les essences de la plupart des espèces de thym (Rasooli et *al*., 2006 ; Del Nobil et *al*., 2008).

On peut ajouter aussi, que la plupart des huiles essentielles présente des teneurs élevés en Alpha pinène reconnaissable pour son parfum boisé. Cette molécule est reconnue pour ses propriétés antiseptiques et antiinflammatoires, aussi connu pour son effet inhibiteur quelle exerce vis-à-vis les différentes bactéries par l'altération de leurs paroi (Van Groestijn et Lieu, 2002).

La contamination microbienne des surfaces reste un problème d'actualité dans de nombreux secteurs d'industries agro-alimentaires, notamment dans le secteur de l'industrie laitière. La présence de la flore microbienne constitutive de biofilm dans le lait de vache est préoccupante, du fait que les biofilms sont reconnues être la source de lourds problèmes économiques et sanitaires.

Dans le cadre de cette étude, nous avons pu isoler des souches de *S. aureus* et de *B. cereus* à partir du lait de vache cru issu de deux régions différentes. Les souches sont testées pour voir leur potentiel de formation de biofilm au sein d'une microplaque. Nous nous sommes intéressées aussi à évaluer l'activité antibactérienne et anti-biofilm de l'huile essentielle '*T. algeriensis'* vis-à-vis l'ensemble des souches.

Les résultats obtenus montrent que les souches de *S. aureus* et de *B. cereus* s'avèrent de bons candidats pour la formation de biofilm, tels que montrés par la technique du cristal violet. De plus, un effet inhibiteur est obtenu pour l'ensemble des souches testées à l'état planctonique et à l'état biofilm.

Ainsi, de nouvelles perspectives apparaissent permettant d'élargir notre étude par:

- L'identification moléculaire des isolats;
- L'utilisation de '*T. algeriensis'* comme une nouvelle alternative pour assainir les surfaces utilisées dans les sociétés d'industrie laitière;
- Etude de la concentration minimale éradicatrice du biofilm;
- Elargir le secteur d'échantillonnage et faire un nombre plus élevé sur différentes régions.

A

- **AFNOR. (2000).** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6ième édition. AFNOR, Paris.
- **Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Abdellah F., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouche A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles du *Thymus algeriensis* Boiss et Reut et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 1(14): 141-148.

B

- **Bachtarzi N., Amourache L., Dehkal G. (2015).** Qualité du lait cru destiner à la fabrication d'un fromage à pâte molle type Camembert dans une laiterie de Constantine (Est algérien). International Journal of Innovation and Scientific Research ISSN 2351-8014, 17, 34-42.
- **Benbelaid F. (2015).** Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire. Thèse de doctorat en biologie. Université Abou Bekr Belkaid de TLEMCEN (Algérie), 169 pp.
- **Benbelaïd F., Bendahou M., Khadir A., Abdoune M., Bellahsene C., Zenati F., Bouali W., Abdelouahid D. (2012).** Antimicrobial activity of essential oil of *Lavandula multifida* L. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 2(2): 244–247.
- **Bentiba K., Bentiba L. (2017).** Evaluation de la capacité des souches de *Staphylococcus spp* à former des biofilms dans l'industrie laitière. Mémoire de master en analyses biochimique. Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, 72pp.
- **Billon P., Sauve O. (2009).** Traite des vaches laitières. 3ème édition, France, 555 p. biologiques et physico-chimiques. Volume 1. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, 95–151.
- **Boukhelifa H. (2017).** Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* isolées de sondes urinaires. Mémoire de MASTER en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 64pp.
- **Bokulich N.A., Mills D.A. (2013).** Facility-Specific "House" Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheese making Plants. Applied and Environmental Microbiology, 17(79), 5214-5223.

- **Bouyahya A., Abrini J., Bakri Y., Dakka N. (2016).** Essential Oils as Anticancer Agents: News on Mode of action. Lavoisier SAS.
- **Brisabois A., Lafarge V., Thorel M. F. (2016).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Revue scientifique et technique. Off. int. Epiz, 16 (1): 452-471.
- **Burgess S.A., Lindsay D., Flint S.H. (2010).** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology, 144: 215-225.
- **Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

$\mathcal{C}$

- **Champagne C.P., Laing R.R., Roy D., Mafu A.A., Griffiths M.W. (1994).** Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34: 1-30.
- **Clamerland J. (2018)**. Etude des biofilms dans les systèmes de filtration en industrie laitière: mécanisme de formation ,caractérisation stratégies de contrôle .Thèse de doctorat en science et technologie des aliments. Université LAVAL (Canada), 104pp.

$\mathcal{D}$

- **Dagnra A.Y., Faye-Ketté H., Hounkpati A., David M., Dosso M. (2000).** Évaluation de deux tests d'identification de *Staphylococcus aureus*. Médecine et maladies infectieuses, 30: 533-9.
- **Del Nobile M.A., Conte A., Incoronato A.L., Penza O. (2008).** Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. Journal of Food engineering, 89 (1), 57-63.
- **Didouh N. (2015).** Caractérisations de spores de *Bacillus cereus* isolés d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilms et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfections. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen (Algérie), 99 pp.
- **Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C. (2008).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology, 46: 3632-3639.

$\mathcal{E}$

- **El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili M. R., Farah A. (2010).** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Contre les champignons de pourriture du bois. Acta Botanica Gallica, 157(2), 285-294.
- **Enari M., Sakahira H., Yakoyama H., Okaya K., Iwamatsu A., Nagata. (1998).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, 391 (6662), 43-50.
- European–Pharmacopoeia (2005). Sainte Ruffine, Maissoneuve.

$\mathcal{F}$

- **Flint S. H., Bremer P. J., Brooks J. D. (1997)**. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control, Biofouling. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 11:1, 81-97.
- **Fotou K., Tzora A., Bezirtzogloue. (2011).** Isolation of microbial pathogens of subclinical, mastitis from raw sheeps milk of Epirus (Grecce) and their role in its hygiene. Anaerobe, 17: 315-319.

$\mathcal{G}$

- **Gerhardt P., Murray R .G. E., Wood W. A., Kring N. R. (1994).** Methods for general and Molecular Bacteriology. American society for Microbiology, Washington, D.C: 791.
- **Ghazi N., Niar A. (2011).** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans différents élevages de la wilaya de Tiaret (Algérie). Tropicultura, 29 (4): 193-196.
- **Giordani R., Hadef Y., Kaloustian J. (2008).** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia 79: 199-203.
- **Goetz C., Dufour S., Aechambault M., Mlouin F., Jacques M. (2016).** Importance et contrôle de biofilms formés par les Staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière. Médecine vétérinaire, 167, 7-8, 215-229.
- **Gordon D., Christensen G., Simpson W. (1985).** Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue b Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. Journal of Clinical Microbiology, 20 (6): 996-1006.

- **Gram C. (1884).** On the isolated coloring of the Schizomycetes in cut and dry preparations.
- **Guiraud J. P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition Dunod. Paris, 136-139.
- **Guiraud J., Galzy P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition l'usine, 119 pp.

H

- **Hamiroune M., Berber A., Boubekeur S. (2014)**. Qualité bactériologique du lait cru de vaches locales et améliorées vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique. Annales de Médecine Vétérinaire, 158: 137-144.

I

- ISO, 1997. Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2p. **Jacob M., Pellecuer J., Tomei R. (1979).** Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. Rivista Italiana E.P.P.O.S. 11: pp. 26-30.

J

- **Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. (2006).** Science des aliments, stabilisation biologique et physico-chimique. Volume 1. Edition *Tec.* & *Doc*., Lavoisier, pp. 95–151.
- **Jeantet R., Croguennee T., Mahaut M., Schuck P., Brule G. (2008)**. Les produits laitiers. 2éme Édition, Tec et Doc, Lavoisier, 17-185.

K

- **Kalemba D., Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10: 813-829.
- **Kizi N., Makdoud S. (2014).** Analyse physico-chimique et microbiologiques du lait cru collecté au niveau de deux régions Akbou et Sidi Aich (Bejaia). Mémoire d'ingénieur d'Etat en Génie Biologique. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 61pp.
- **Kouma S.S.M. (2013).** Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre Bifidubactérium isolées de

la chaine de production du lait local à Aidjan .Thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Nangui Aragoua.125pp.

L

- **Laurent F. (2011).** Biofilm bactérien. Université de Médecine de Lyon. http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011mai/descmai2011-biofilm-laurent.pdf.
- **Levesque P. (2004).** La traite des vaches laitières Etape par étape vers la qualité Guide pratique. Edition Educagri, Québec.
- **Lis-Balchin M., Lavender L. (2002).** The genus Lavadula. London & New York: Taylor and Francis, pp 268.

M

- **Maher M.M., Jordan K.N., Upton M.E., Coffey A. (2001).** Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. Journal of Applied Microbiology, 90: 201-207.
- **Maïworé J., Baane M. P., Montet D. (2018).** Influence des conditions de la traite sur les qualités physico-chimiques et microbiologiques du lait cru collecté à Maroua, Cameroun. Afrique SCIENCE, 14 (4): 235-248.
- **Malek F. (2019).** Bactéries sporulées et biofilm: un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. Canadian Journal of Microbiology, 65 :1-16.
- **Mansour L. M. (2015).** Etude de l'influence des pratiques d'élevage sur la qualité du lait: effet de l'alimentation. Thèse de doctorat en science agronomie. Université Ferhat Abbas Setif1, 123 pp.
- **Mariani C., Oulahal N., BRIANDET R. (2011).** Inhibition of Listeria monocytogenes by resident biofilms present on wooden shelives used for cheese ripening. Food control, (22):1357-1362.
- **May J., Chan C. H., King A., William L., French G. L. (2000).** Time–kill studies of tea tree oils on clinical isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 45, 639-643.
- **Mcguiggan J.T.M., Mccleery D.R., Hannan A., Gilmour A. (2002).** Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: Factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. International Journal of Dairy Technology, 55: 100-107.

- **Messelhäusser U., Kämpf P., Fricker M., Ehling-Schulz M., Zucker R., Wagner B., Busch U., Höller C. (2010).** Prevalence of Emetic Bacillus cereus in Different Ice Creamsin Bavaria. Journal of food protection, 73 (2): 395-399.

N

- **Nostro A., Sudano Roccaro A., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C., Cioni P.L., Procopio F., Blanco A.R. (2007).** Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Journal of Medical Microbiology, 56(4): 519–523.

O

- **Ounine K., Rhoutaisse A., El Haloui N.E. (2004).** Caractérisation bactériologique du lait cru produit dans les étables de la région du Gharb. ALAWAMIA, 1(2) : 109-110.

P

- **Palmer J., Flint S., Brooks J. (2007)**. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34: 577–588.
- **Peng J. S., Tsai W. C., Chou C. C. (2001)**. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. International Journal of Food Microbiology. 65: 105–111.
- **Prescott L.M., Harley J., Klein D.A. (2010).** Microbiologie 2ème édition. De Boeck, paris, p. 979.
- **Priest F. G., Barker M., Maiden M. C. J. (2004).** Population structure and Evolution of the ical *Bacilllus cereus* group. Journal of Bacterriologie, 23 (186): 7959-7970.

Q

- **Quezel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Centre national de la recherche scientifique, Paris.
- **Quigley L., Sullivan O.O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D. (2013).** The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews, 37: 664-698.

ℛ

- **Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–274.

- **Rasooli I., Rezaei M.B., Allameh A**. **(2006)**. Ultra structural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes.* International Journal of Reumatic Diseases, 10: 236-241.
- **Rheotest M, (2010).** Produit alimentaires et aromatisants, Rhéomètre RHEOTEST® RN et viscosimètre à capillaire RHEOTEST® LK http://www.rheoest.de/dowload/nahrungs.fr.pdf**.**

𝒮

- **Salzer U.J. (1977).** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-acritical review. C.R.C *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. **9**: 345-373.
- **Sanchez C.J., Mende K., Beckius M.L., Akers K.S., Romano D.R., Wenke J.C., Murray C.K. (2013).** Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC infectious diseases 13(1): 47.
- **Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B**. **(1994)**. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biological Chemistry, 269: 8022-8028.
- **Si Tayeb S. (2018).** Etude de la qualité hygiénique et microbiologique du lait cru de vache de la ferme de Hassi Mameche. Master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie), 77pp.
- **Simonet R. (2006).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait dans la filière artisanale au Sénégal. Thèse de doctorat d'état vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop de DEKAR, 164pp.
- **Simöes M., Simöes L.C., Vieira M.J. (2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Science and Technology. 43:573–583.
- **Sissao M., Millog V., Ouedraogo G.A. (2015).** Composition chimique et qualité bactériologique des laits cru et pasteurisé au Burkina. Faso. Afrique science, 11(1) :142-154.

- **Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovi M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods. 40: 175-179.
- **Stoica I.M., Vitzilaiou E., Van Den Berg F. (2018).** Biofouling on RO-membranes used for water recovery in the dairy industry. Journal of water process Engineering, 24: 1-10.

$\mathcal{T}$

- **Titouche Y. (2018).** Risque de contamination microbienne du lait cru produit dans la Wilaya de Tizi Ouzou: Caractérisation phénotypique et génotypique de *Staphyloccocus aureus.* Thèse de doctorat en science biologique. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 114pp.
- **Touhami A.** (2017). Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Thèse de doctorat en chimie organique. Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie), 173pp.
- **Toure D. (2015).** Etudes chimiques et biologiques des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de COTE D'IVOIRE. Thèse de doctorat d'état biologie humaine tropicale. Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY, 153 pp.
- **Tremblay Y.D.N., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofims bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. The Canadian journal of Veterinary Rechearch, 78 : 100-116.

$\mathcal{U}$

- **Upasana H. (2015).** Enterotoxigenic *bacillus cereus* and *bacillus thuringieusis* Spores in U.S Retail Spices. Mémoire de master en science alimentaire. Université Masschusells in partial fulfilement, 55pp.

$\mathcal{V}$

- **Van Groenestijn J., Lieu J. (2002).** Removal of alpha-pinene from gases using biofilters containing fungi. Atmospheric Environment, 36(35): 5501-5508.
- **Vignola C. (2002).** Science et Technologie du lait: Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada, 3-75.

- **Von Neubeck M., Baur C., Krewinkel M., Stoeckel M., Kranz B., Stressler T., Fischer L., Hinrichs J., Scherer S.,Wenning M., (2015).** Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. International Journal of Food Microbiology, 211: 57-65.

W

- **Wang H. F., Yih K. H., Huang K. F. (2010).** Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 18, №1, pp. 24-33.
- **Weber F. (1985).** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. Collection FAO Alimentation et nutrition n°47.
- **Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. (2008).** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols. 3(2): 163–175.

Annexe 1

Matériel non biologique

- Autoclave (WEBECO Allemagne)
- Etuve (BINDER Allemagne)
- Bain marie (MEMMERT Allemagne)
- Agitateur chauffant a barreau magnétique (GARHARDT Allemagne)
- Balance (KERN 770 Allemagne)
- Réfrigérateur (ENIEM Algérie)
- Microscope photonique
- Bec bunsen
- Boites Petri
- Pipettes Pasteur
- Erlenmeyer
- Flacons en verre
- Tubes à essai en verre
- Microplaque de 96 puits
- Anse
- Méthanol
- Lames en verre
- Vortex
- Gélose nutritive
- Tryptone-sel-eau (TSE)
- Milieu gélosé de Mossel
- Milieu gélosé de Chapman
- Eau oxygénée
- Solution de bleu de toluidine
- Bouillon cœur cervelle (BHIB)
- Le plasma
- TSB (Bouillon Tryptone Soja)
- Eau physiologique
- Tampon PBS
- Le cristal violet
- L'eau distillée
- Glycérol