

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Efficacité d'un traitement enzymatique dans la lutte contre les biofilms bactériens

Cas d'une unité de production de glaces située à Alger

Présenté par : CHEYMA ZEGHLACHE.

Soutenu le : 13 septembre 2019

Devant le jury composé de :

Président :	BOUABDALLA R.	Maître de conférences classe B
Promoteur :	AZZAG N.	Maître de conférences classe A
Co-promoteur :	BOUHAMED R.	Maître de conférences classe B
Examineur :	HAMDI T.	Professeur
Examineur :	ZOUAMBI B.	Maître assistant classe A

Liste des tableaux

- **Tableau 01** : Facteurs impliqués dans l'érosion (BOURION, 2000).....13
- **Tableau 02** : Moyens d'assainissement mis en place aux différentes étapes de production (PRIMA GLACES, 2012).....25
- **Tableau 03** : Matériel pour l'application du traitement enzymatique et les prélèvements.....28
- **Tableau 04** : Désignation des circuits.....31
- **Tableau 05** : Suivi des prélèvements.....33
- **Tableau 06** : Types de biodétecteurs BART (MANUEL DBI, 2004).....35
- **Tableau 07** : Modifications possibles dans le cas du SLYM BART (MANUEL DBI, 2004).....36
- **Tableau 08** : Bactéries responsables de la modification de l'aspect du milieu BART (MANUEL DBI, 2004).....36
- **Tableau 09** : Relation entre le Time Lag et le population bactérienne (MANUEL DBI, 2004).....37
- **Tableau 10** : Relation entre le Time Lag et l'agressivité des bactéries (MANUEL DBI, 2004).....39
- **Tableau 11** : Actions à mener selon le résultats de SLYM BART obtenu (MANUEL DBI, 2004).....40
- **Tableau 12** : Echelle de lecture de l'agressivité et de la population bactérienne par jour (WANYLAB).....41
- **Tableau 13** : Résultats des analyses obtenus par SLYME BART exprimés en UFC/ml (WANYLAB).....41
- **Tableau 14** : Résultats des analyses obtenus par SLYME BART exprimés selon l'agressivité.....42
- **Tableau 15** : Observations et conclusions tirés des résultats de l'analyse par SLYM BART.....44
- **Tableau 16** : Matériel de laboratoire.....45
- **Tableau 17** : Milieux de culture, réactifs et solutions.....45
- **Tableau 18** : Lecture des milieux de culture et des tests d'identification biochimique.....52
- **Tableau 19** : Résultats des échantillons analysés par la méthode conventionnelle....54

- **Tableau 20** : Résultats de l'isolement.....56
- **Tableau 21** : Résultats de l'identification biochimique.....57
- **Tableau 22** : Synthèse des résultats de l'identification biochimique.....58
- **Tableau 23** : comparaison entre les résultats obtenus par les deux méthodes
d'analyse.....59
- **Tableau 24** : Comparaison entre la méthode d'analyse BART et la méthode
conventionnelle.....60

Liste des figures

- **Figure 1** : Forme planctonique (DELORME, 2012).....06
- **Figure 2** : Forme sessile (CARR).....06
- **Figure 3** : Etapes du développement d'un biofilm (MUELLER *et al.*, 1992).....11
- **Figure 04** : Etapes de la production de glaces (PRIMA GLACES, 2012).....24
- **Figure 05** : Traitement enzymatique et ATP métrie (XIAOBOLIU, 2014).....26
- **Figure 06** : Matériel pour appliquer le traitement enzymatique (photo personnelle)..28
- **Figure 07** : Plan d'un circuit type (Schéma personnel).....29
- **Figure 08** : Répartition des circuits.....30
- **Figure 09** : Protocole du traitement (photo personnelle).....32
- **Figure 10** : Tube de prélèvement SLIM B.A.R.T. (photo personnelle).....32
- **Figure 11** : Tube de prélèvement stérile (photo personnelle).....33
- **Figure 12** : Méthode d'utilisation du SLYME BART (Manuel HACH, 2016).....34
- **Figure 13** : Lecture du SLYME BART (Manual DBI, 2004).....35
- **Figure 14** : Gamme de biodétecteur BART (fr.hach.com).....38
- **Figure 15** : Principe du BART (MANUEL DBI, 2004).....38
- **Figure 16** : Aspect du SLYME BART après incubation (MANUEL HACH, 2016)..40
- **Figure 17** : Taux des échantillons contaminés à chaque étape du traitement analysés par SLYM BART.....43
- **Figure 18** : Protocole d'identification des bactéries (Diagramme personnel).....46
- **Figure 19** : Enrichissement des prélèvements sur BHIB (photo personnelle).....47
- **Figure 20** : Coloration de Gram.....47
- **Figure 21** : Lecture des lames de coloration Gram au microscope optique *100 (photo personnelle).....47
- **Figure 22** : Gram + (photo personnelle).....48
- **Figure 23** : Gram – (photo personnelle).....48
- **Figure 24** : Ensemencement sur milieux de culture (photo personnelle).....48
- **Figure 25** : Test de la nitrate réductase (photo personnelle).....49
- **Figure 26** : Test TSI (photo personnelle).....50
- **Figure 27** : Test de l'oxydase (photo personnelle).....50
- **Figure 28** : Test de la catalase (photo personnelle).....50
- **Figure 29** : Galerie Api E20 et les réactifs nécessaires (photo personnelle).....51

- **Figure 30** : Milieu d'ensemencement accompagnant la galerie Api Staph (photo personnelle).....51
- **Figure 31** : Incubation des galeries Api et des milieux de culture (photo personnelle).....52
- **Figure 32** : Manuel d'utilisation des galeries Api (photo personnelle).....54
- **Figure 33** : Taux d'échantillons contaminés à chaque étape analysés par la méthode conventionnelle.....55
- **Figure 34** : 2 tests d'identification biochimique sur galerie Api pour un échantillon polymicrobien (photo personnelle).....56
- **Figure 35** : Taux de bactéries identifiées par étape et par espèce.....58

Liste des abréviations

- **A** : absence.
- **Ag** : agressif.
- **BART** : biological activity reaction test.
- **BHIB** : brain heart infusion broth.
- **BPH** : bonnes pratiques d'hygiène.
- **FTU** : formazine turbidity unit.
- **GN** : gélose nutritive.
- **HACCP** : hazard analysis critical control point.
- **I** : identification.
- **ISO** : International Organization for Standardization.
- **M** : modéré.
- **N** : nitrate.
- **P** : presence.
- **PAg** : pas agressif.
- **T** : temps.
- **TSI** : triple sugar iron.
- **UFC** : unité formant colonie.
- **VP** : Voges-Proskauer.
- **DS** : dense slime.
- **SR** : slime ring .
- **CP** : cloudy plates..
- **CL** : cloudy growth
- **BL** : blackened liquid.
- **PB** : pale blue glow..
- **GY** : greenish yellow glow
- **TH** : thread like.
- **IRB** : iron related bacteria.

- **SRB** : sulfat reducing bacteria.
- **HAB** : heterotrophic aerobic bacteria.
- **DN** : denitrifying bacteria.
- **FLOR** :fluorescing pseudomonas.
- **APB** : acid producing bacteria.
- **BOD** : biochemical oxygen demand.

Remerciements

Réaliser ce travail a été source d'une grande joie et d'une profonde satisfaction personnelle. Puisque d'un côté, le sujet m'intéressait et suscitait ma curiosité. Mais aussi pour ce qu'il représente à mes yeux, c'est-à-dire la consécration de toutes mes années d'étude, enfant et adulte. C'est pourquoi je tiens à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à son accomplissement.

Tout d'abord je loue Dieu pour m'avoir guidé jusqu'à ce jour sous sa grâce et sa miséricorde.

« Et dit : Seigneur fait moi croître en science »

Sourat Taha, verset 113

Je remercie mes chers et tendres parents pour leur soutien, leur présence et tout ce qu'ils ont fait pour moi. Ce sont des parents inestimables, les meilleurs du monde.

Je remercie mes deux promotrices, Mme Azzag et Mme Bouhamed pour avoir cru en ce projet, de m'avoir fait confiance et d'avoir été disponibles en toutes circonstances.

Je remercie Mme Benameur d'avoir partagé avec moi son expérience de terrain, de m'avoir accordé de son temps et de son attention.

Je remercie Mme Bouabdallah d'avoir accepté de présider le jury de soutenance, ainsi que Mr. Hamdi et Mr. Zouambi d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également mes petits frères et sœurs, Rokaya, Arslane, Yazid et Hadjer ainsi qu'Elias pour m'avoir épaulé et encouragé. Votre présence a été très précieuse. Elle a égayé mes jours de labeur.

Un grand merci à toute ma famille, à mes amis, mes enseignants, et à toute personne qui, un jour, m'a appris quelque chose, m'a conseillé ou guidé.

Sommaire

Introduction

<u>Chapitre I : Partie bibliographique</u>	5
<u>I.1. Historique</u>	5
<u>II.2. Mode de vie des bactéries</u>	6
<u>I.3. Définition du biofilm</u>	6
<u>I.4. Caractéristiques des biofilms</u>	7
<u>I.4.1. Nature et constituants</u>	7
<u>I.4.2. Aspect et localisation</u>	8
<u>I.4.3. Propriétés du biofilm</u>	9
<u>I.4.4. Formation</u>	11
<u>I.4.4.1. Etapes de la formation</u>	11
<u>I.4.4.2. Facteurs influençant la formation</u>	13
<u>I.5. Effets des biofilms</u>	15
<u>I.5.1. Effets positifs</u>	15
<u>I.5.2. Effets négatifs</u>	16
<u>I.6. Moyens de détection et de diagnostic d'un biofilm</u>	18
<u>I.6.1. Moyens quantitatifs</u>	18
<u>I.6.2. Moyens qualitatifs</u>	19
<u>I.6.3. Méthode de modélisation</u>	19
<u>I.7. Lutte contre les biofilms</u>	19
<u>I.7.1. Prévention</u>	20
<u>I.7.2. Elimination du biofilm</u>	20
<u>I.7.2.1. Nettoyage</u>	20
<u>I.7.2.2. Désinfection</u>	21
<u>I.8. Résistance</u>	21
<u>Chapitre II : Partie expérimentale</u>	23
<u>Application et évaluation de l'efficacité du traitement enzymatique dans une unité de production de glaces</u>	23
<u>II.1. Lieu et durée de l'étude</u>	23
<u>II.2. Présentation des sociétés concernées</u>	23
<u>II.2.1 Société cliente</u>	23
<u>II.2.1.1 Présentation</u>	23
<u>II.2.1.2 Moyens de lutte contre le biofilm déployés par la société</u>	24
<u>II.2.1.3 Historique de la société cliente avec le traitement enzymatique</u>	25
<u>II.2.2 Société prestataire</u>	26
<u>II.2.3. Laboratoire d'analyse microbiologique externe</u>	26

<u>II.3. Traitement enzymatique</u>	27
<u>II.3.1. Présentation du traitement</u>	27
<u>II.3.1.1. Intérêt</u>	27
<u>II.3.1.2. Principe</u>	27
<u>II.3.1.3. Composants</u>	27
<u>II.3.1.4. Mode d'action</u>	27
<u>II.3.1.5. Conditions d'utilisation</u>	27
<u>II.3.2. Matériel</u>	28
<u>II.3.3 Méthodes</u>	29
<u>II.3.4. Echantillonnage</u>	32
<u>II.4. Evaluation de l'efficacité du traitement</u>	34
<u>II.4.1. Biodétecteurs B.A.R.T.</u>	34
<u>II.4.1.1. Matériel et méthodes</u>	34
<u>II.4.1.2. Présentation</u>	37
<u>II.4.1.3. Résultats</u>	41
<u>II.4.3. Moyens d'analyse conventionnelle</u>	45
<u>II.4.3.1. Matériel et méthode</u>	45
<u>II.4.3.1.1. Matériel</u>	45
<u>II.4.3.1.2. Méthode</u>	46
<u>II.4.3.2. Résultats :</u>	54
<u>II.4.3. Comparaison entre les résultats des deux méthodes</u>	59
<u>II.5. Discussion</u>	61
<u>II.5.1. Méthode BART</u>	61
<u>II.5.2. Bulletin d'analyse du laboratoire externe</u>	62
<u>II.5.3. Méthode d'analyse conventionnelle</u>	62
Conclusion et recommandations	63
Perspectives	64
Bibliographie	65
Résumé et mots clés	

INTRODUCTION

Introduction

L'importance de l'hygiène et de la sécurité des aliments prend de plus en plus d'ampleur dans le monde ces dernières décennies, tant, que le nombre de référentiels sur le sujet s'est rapidement amplifié, nous avons les normes ISO, BRC, IFS et beaucoup d'autres. Toutes convergent vers un but commun : Assurer la sécurité et la salubrité des denrées alimentaires. Elles partagent également le même point de départ, le HACCP (BOUTOU, 2008). Cette méthode créée en 1960 et intégrée au Codex Alimentarius en 1993, a servi par la suite à ériger des normes internationales et aider les gouvernements de chaque pays à définir ses lois et règlements dans le domaine de la sécurité des aliments (FAO). C'est ainsi qu'en 2009, la législation Algérienne en matière de sécurité alimentaire prévoit que les entreprises doivent obligatoirement suivre les principes de l'HACCP du Codex Alimentarius et mettre en place les mesures de surveillance et de contrôle qui s'imposent (MINISTERE DU COMMERCE, 2009). Ce système basé sur l'analyse des risques et la maîtrise des dangers tend à garantir au consommateur un produit sûr à tous les niveaux, y compris microbiologique. Pourtant quel que soit la fréquence ou le procédé de nettoyage utilisé, il est impossible d'éliminer totalement le danger que représentent les bactéries dans les unités de production. Et ce, pour la simple raison que le contact de l'eau avec n'importe quel support crée un film qui attire les bactéries puis les enferme dedans, leur assurant une protection parfaite contre les agressions extérieures, ce qui rend leur élimination très difficile. C'est ce qu'on appelle un biofilm ([HENDERSON](#), 2016).

Malgré la vigueur des moyens de nettoyage et la vigilance des unités de production, le biofilm est naturellement conçu pour résister aux facteurs de stress tels, les détergents et les désinfectants. Il relargue de façon périodique des parties de lui-même dans l'environnement qui l'entoure, causant au passage un risque potentiel de contamination de la denrée alimentaire produite, et de ce fait un risque pour le consommateur (BOURION, 2000). Ce risque est continuellement surveillé dans les laboratoires de microbiologie alimentaire car en plus d'être un enjeu de santé publique, il cause des pertes économiques importantes aux industries qu'il contamine, et ce en terme de destruction des produits non conformes, au nettoyage renforcé, à la mobilisation des employés etc. Pour toutes ces raisons, le biofilm représente une menace qu'il est important d'éliminer, mais comment ?

En industrie agro-alimentaire, des systèmes d'élimination et de réduction des bactéries sont placés tout au long des procédés de fabrication pour assurer la sécurité et la salubrité des produits. Toutefois leur efficacité reste limitée en raison de la résistance que montrent les biofilms face aux différents traitements existants, et qui se traduit par une rémanence constante. Pour y remédier, une nouvelle méthode basée sur les enzymes a fait son entrée sur le marché algérien.

Afin d'apprécier l'efficacité de cette méthode, nous avons récupéré des échantillons prélevés au cours de son application dans une unité de production de glaces et nous les avons analysé par deux méthodes différentes, à l'aide des biodétecteurs BART au niveau d'un laboratoire externe, et avec les méthodes d'analyse conventionnelles au sein des laboratoires de l'école nationale vétérinaire.

Ce présent travail est divisé en deux parties :

- Une partie bibliographique faisant état des données concernant la formation et les caractéristiques du biofilm.
- Une partie expérimentale regroupant les différentes étapes du traitement enzymatique utilisé, et de son évaluation.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Partie bibliographique

I.1. Historique

- L'existence des biofilms a été mise en évidence dès 1684 par Antonie Van Leeuwenhoek lorsqu'il observe la présence de microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire et en fait un rapport où il qualifie le nombre de ces micro-organismes de si élevé qu'il dépasserait celui des gens dans un royaume.
- En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement.
- En 1969, Jones, travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, confirme non seulement les agrégats mono ou poly microbiens, mais aussi l'existence d'une matrice poly osidique.
- En 1973, Characklis démontre que des dépôts microbiens au sein de conduits d'eau de systèmes industriels apparaissent tenaces et résistants aux désinfectants.
- Ce n'est qu'en 1975 que le terme "biofilm" a été utilisé pour la première fois dans une publication de Mack WN *et al.* .
- Enfin, en 1978, Costerton, met en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales ou animales. Elles sont appelées biofilms.
- En 1990, la fondation nationale des sciences aux USA a érigé le centre d'ingénierie des biofilms, nommé CBE à l'université de BOZEMAN. Aujourd'hui, des centres de recherches sont un peu partout dans le monde : au Danemark, à Singapour, en Angleterre, en France en Allemagne et en Australie. Par ailleurs des avancées importantes ont été réalisées dans ce domaine, servant autant à la médecine, à l'industrie qu'à l'écologie.

II.2. Mode de vie des bactéries

La bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire). L'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries.

Dans la nature, deux modes de vie de bactéries existent : la forme végétative et la forme sporulée. Dans la forme végétative, on retrouve la forme libre ; dite planctonique (Figure 1) et la forme sessile nommée biofilm; la plus répandue dans la nature (Figure 2) . Les bactéries libres ne représenteraient ainsi que 0,5% de la population bactérienne totale (DELORME,2012).



Figure 1 : Forme planctonique
(DELORME,2012).

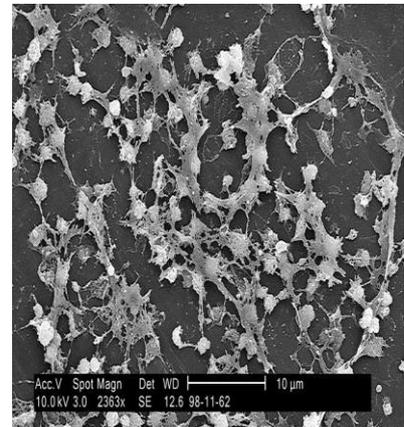


Figure 2 : Forme sessile
(DELORME,2012).

I.3. Définition du biofilm

Les biofilms sont des micro-organismes constitués principalement de bactéries enrobées d'une matrice polymérique et attachées à une surface, cette matrice forme plus de 90% de la masse du biofilm. Souvent vivant en symbiose et communiquant entre eux par des signaux qu'ils émettent, cet état leur confère des avantages et des propriétés biologiques spécifiques. Toutefois, d'autres micro-organismes tels les champignons et les algues peuvent s'insérer au sein du biofilm (BOURION, 2000 ; HENDERSON, 2016).

I.4. Caractéristiques des biofilms

I.4.1. Nature et constituants

▪ Micro-organismes

Le biofilm est un ensemble de micro-organismes dans une matrice. Il peut être homogène s'il est constitué d'une seule et même espèce de micro-organismes, chose très rare dans la nature, ou bien hétérogène, on y retrouve le poly-microbien, seul ou associé à des champignons, algues, mycètes ou à des protozoaires. Par ailleurs, le concept de biofilms viraux commence à émerger (SANSONETTI, 2009).

Les espèces les mieux étudiées chez les bactéries à gram négatif sont : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*. Pour les bactéries à gram positif, on retrouve : *Staphylococcus aureus*. Ces bactéries commensales ou pathogènes sont facilement manipulables et ont permis de faire énormément de progrès scientifiques (ROUX et CHIGO, 2006).

De multiples bactéries y compris des souches chlororésistantes de propriétés et de caractéristiques très différentes capables de produire des biofilms ont été cultivées et testées sur des substrats lisses, tels que l'inox ou le verre ou bien antiadhésifs comme le téflon.

▪ Matrice polymérique

La matrice polymérique englobe les micro-organismes, elle est composée d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. On peut également y trouver de l'ADN, de l'ARN et des lipides. Ainsi que différentes molécules intervenant dans la communication entre micro-organismes et avec les surfaces. Elle assure la cohésion et la protection, piège les petites particules circulantes, fournit des nutriments dissous et élimine les déchets (SUTHERLAND, 2001).

▪ Cas spécifiques

On retrouve dans certains biofilms des composants dans la matrice que l'on ne retrouve pas systématiquement dans tous les biofilms, ceci est dû à la composante de la population bactérienne présente dans celui-ci. Par exemple, chez *Staphylococcus epidermidis*, un polysaccharide a été identifié comme étant responsable de l'adhésion intercellulaire et la constitution de micro-colonies dans les phases finales de la formation du biofilm. Tandis que

pour *Pseudomonas aeruginosa*, il a été démontré que la synthèse d'alignate est stimulée chez des souches non muqueuses en réponse à un changement d'environnement perçu comme source de stress (élévation de l'osmolarité, déshydratation ou privation nutritionnelle). En ce qui concerne le sérovar de *Salmonelle typhimurium* -souche43895OR, et les souches les plus résistantes de *E.coli* (ex. : *E.coli* 43895OR) elles produisent toutes les deux des colonies bactériennes solidement consolidées par une matrice extra cellulaire contenant des fibres de type curli, que ce soit en culture sur de l'agar-agar, ou sur un substrat très lisse. Toutefois, contrairement à *E.coli*, les Salmonelles semblent aussi capable de produire de la cellulose pour consolider leur biofilm, ce qui prouve que la composition de la matrice est propre à la population microbienne qui le compose (MACK *et al.*, 1996 ; BOURION, 2010).

I.4.2. Aspect et localisation

En microscopie, le biofilm donne l'aspect d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux ; véritables « canaux », ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation. Ainsi, le biofilm n'est pas un milieu homogène, mais un environnement structuré qui présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales (LAWRENCE *et al.*, 1991).

Le biofilm peut être si fin qu'il en est invisible, ou au contraire être très épais selon les conditions environnementales. Les biofilms visibles à l'œil nu ont l'aspect d'un dépôt allant du blanc au gris ou de couleur crème sur les surfaces de contact avec le lait. Ils donnent aussi un aspect terne aux surfaces en acier inoxydable en leur faisant perdre leur lustre habituel.

Toute surface peut servir de support aux biofilms : acier inoxydable, aluminium, verre, matériaux de nylon, pièces en caoutchouc et joints en téflon. Les soudures mal polies dans les canalisations, les joints d'étanchéité rétrécis et les surfaces qui sont éraflées, fissurées ou granuleuses peuvent également favoriser le développement de biofilms. D'une manière générale, les matériaux de type polymères et caoutchouc sont plus fortement colonisés que l'acier inoxydable (KEOWN, 2003).

Pour le système d'eau potable, le cuivre est préconisé car il est moins colonisé par les bactéries telles qu'*Aeromonas hydrophila* et *Legionella pneumophila* ((Rogers *et al.*, 1994).

Toutefois les surfaces sur lesquels se forment les biofilms ne sont pas toujours solides. En effet, on a observé la formation de communautés à l'interface air-liquide, gel ou bien mucus ainsi que

l'adhérence à des surfaces animées, tel des muqueuses aux défenses altérées (FERGUSON et STOLZ,2005)

I.4.3. Propriétés du biofilm

Les propriétés cellulaires entre le mode de vie des bactéries en biofilm et en suspens change en raison de plusieurs facteurs complexes, l'un des plus importants étant la structure même du biofilm dont l'hétérogénéité et la matrice jouent un rôle important.

▪ Mécanismes homéostatiques

L'hétérogénéité du biofilm donne naissance à une architecture formée de zones denses (amas cellulaires) séparées d'espaces diffus, formant des canaux qui permettent aux liquides et nutriments de circuler et d'atteindre les bactéries fixées le plus en profondeur (KORBER *et al.*, 1994, MASSOL-DEYA, 1995).

Ce phénomène de diffusion est tout de même limité par la matrice de tel sorte qu'il crée des gradients physico-chimiques de concentrations diverses au travers du biofilm et ce d'autant que le biofilm est âgé. Parmi ces gradients de concentration il y'a celui des nutriments et de l'oxygène, présents en plus grande quantité dans les parties superficielles du biofilm et près des canaux. Suffisamment pour que les bactéries à ce niveau aient un métabolisme actif, contrairement à celles du fond qui sont dans un état quiescent qui se traduit par un faible taux de croissance et une taille plus réduite (MARSHALL, 1992).

Partant du même principe, les bactéries s'installent au sein du biofilm selon leur type de respiration, de gradient de pH et des besoins en métabolites secondaires.

Cette hétérogénéité physico-chimique permet la coexistence organisée d'espèces bactériennes aux propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires. Il en résulte une architecture spécifique à chaque biofilm et l'apparition de plusieurs phénotypes d'une même espèce bactérienne. Il est cependant important de noter que ce comportement change en permanence selon la croissance de l'épaisseur du biofilm (ANWAR et COSTERTON, 1992 ; BROWN et GILBERT, 1993).

▪ Interactions microbiennes

La seconde propriété découlant de l'hétérogénéité du biofilm sont les interactions bactériennes. La présence de différentes bactéries dans un même biofilm affecte le taux de croissance de

certaines d'entre elles, ainsi les bactéries les plus dominantes sont celles qui ont un fort taux de croissance. Les autres croissent lentement mais ne disparaissent jamais totalement. Comme c'est le cas de *Listeria monocytogenes*, qui en présence de flore compétitive se maintient à une proportion de seulement 1% (JEONG et FRANK, 1994).

Afin de préserver la survie du biofilm les bactéries tendent à avoir des interactions synergiques. Par exemple, les souches les plus adhésives peuvent promouvoir l'adhésion de celles qui le sont moins. On peut citer dans ce contexte le cas de *Xanthomonas maltophilia* et *Pseudomonas fluorescens* qui facilitent l'attachement de *Aeromonas hydrophil*, *Pseudomonas fragi* pour *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* pour *Listeria innocua* et *Klebsia pneumonia* pour *Salmonella enteritidis* (BOURION et CERF, 1996)

D'autres interactions intéressantes existent, telle l'expression d'une nouvelle voie métabolique de la part de *Pseudomonas putida* en présence d'*Acinetobacter sp.* Chose qui n'est pas observable en culture pure, ou encore le transfert de matériel génétique y compris par la conjugaison à l'aide de plasmides, qui permet l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques ou des fonctions d'adhésions. Enfin les processus de communication inter-cellulaires qui implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signal appelées des auto- inducteurs (AI). Chez les bactéries à Gram négatif, l'auto-inducteur est une homosérine lactone, alors que chez les bactéries à Gram positif, c'est un oligopeptide appelé phéromone. Un troisième mécanisme, décrit chez un grand nombre d'espèces, assure la communication entre des bactéries d'espèces différentes. Le Quorum-sensing permet aux bactéries d'adopter un comportement spécifique à la vie en communauté. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du Quorum sensing dans la formation des biofilms. Les mutants chez qui cette molécule est absente donnent des biofilms minces et uniformes. C'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* par exemple (DAVIES *et al.*, 1998)

- **Avantages conférés par l'état fixé**

L'autre propriété citée, est l'avantage conféré par l'état fixé ou dus à la matrice. En effet, les fibres de polymères ne servent pas seulement à renforcer la fixation des cellules mais également à fixer les nutriments par leurs charges négatives. La rumeur selon laquelle ils serviraient eux même à la nutrition est un mythe, car leurs voies d'anabolisme et de catabolisme ne sont pas forcément réversibles (SUTHERLUND, 1996).

Ils servent aussi à fixer l'eau pour protéger de la dessiccation et à combiner les capacités enzymatiques des différentes espèces du biofilm et donc à dégrader des composés qui ne pourraient l'être par aucune des bactéries isolée. Et enfin, surtout à protéger les micro-

organismes des agressions extérieures, UV, pH, osmolarité, bactériophages, agents antibactériens, désinfectants. Et les rends résistant à des concentrations d'antibiotiques 10 à 1000 fois supérieures que pour des bactéries planctoniques. Ainsi que l'inactivation ou l'inefficacité de certains biocides face au métabolisme peu actif des bactéries(ROUX et CHIGO, 2003).

I.4.4. Formation

A partir de la définition, il parait évident que la formation d'un biofilm nécessite la présence d'un support, d'une solution de molécules organiques ou minérale et de la présence de bactéries.

Elle peut se résumer en 5 étapes tel que décrit dans la figure 3, qui sont la formation du film conditionnant, le transport des micro-organismes, leur adhésion, la colonisation du support et l'évolution du biofilm (détachement de matière et dépôt de particules). Auquel se surajoute différents facteurs pour moduler cette formation.

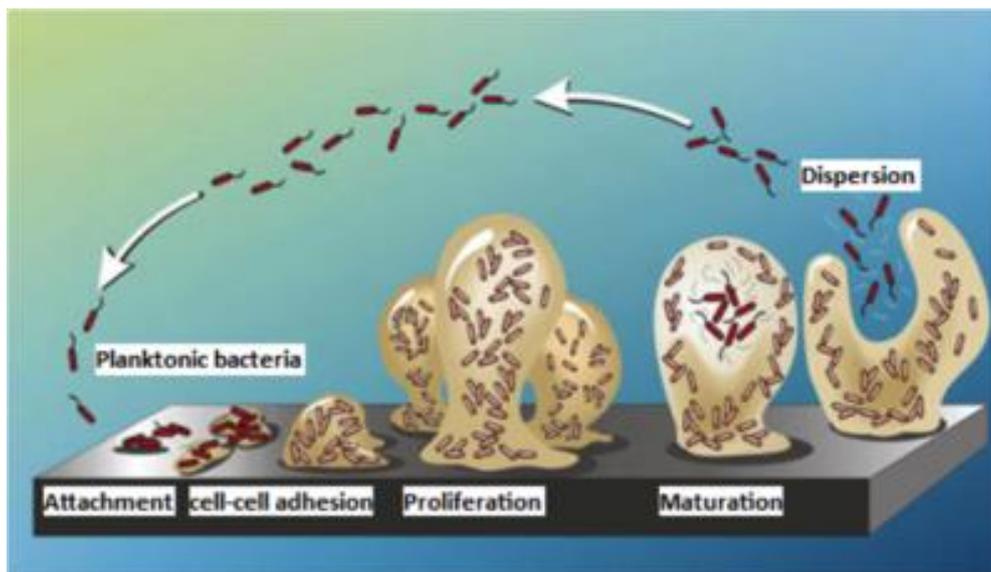


Figure 3 : Etapes du développement d'un biofilm (MUELLER *et al.*, 1992).

I.4.4.1. Etapes de la formation

a- Formation du film conditionnant

Un film conditionnant est l'absorption spontanée de molécules organiques ou non par une surface mise en contact avec elles. Dans l'industrie agro-alimentaire, ces molécules peuvent tout aussi être des particules de résidus alimentaires que des produits de nettoyage et de désinfection.

L'installation de ce film provoque un changement dans la charge électrostatique et l'énergie libre de la surface, déterminant ainsi l'adhésion des micro-organismes par la suite (BOURION, 2000)

b- Transport des micro-organismes

Quatre mécanismes sont essentiellement décrits concernant le transport des micro-organismes jusqu'à la surface. Trois d'entre eux dépendent du liquide de suspension dans lequel elles s'y trouvent et un, propre à leur conformation.

La sédimentation, la diffusion et la convection lorsque le fluide est au repos, et les mouvements browniens lorsqu'il est en turbulence. Ainsi que le mouvement flagellaire ou ciliaire des micro-organismes, guidé ou non par chimiotactisme (BOURION, 2000).

Remarque : Le mouvement brownien, est une description mathématique du mouvement aléatoire d'une « grosse » particule immergée dans un fluide et qui n'est soumise à aucune autre interaction que des chocs avec les « petites » molécules du fluide environnant (BROWN, 1927).

c- Adhésion

L'adhésion définit la mise en contact du micro-organisme avec la surface considérée. Elle se déroule en deux phases :

- Elle est d'abord réversible, rapide et aspécifique, c'est ce qu'on appelle l'étape *d'adsorption*.
- Ensuite, après un temps de latence durant lequel il y'a production de polymères extracellulaires par les micro-organismes il y'a installation de la seconde étape qu'est l'*attachement* irréversible.

▪ Explication du phénomène

Il est connu selon la théorie DLVO (Derjaguine, Landau, Verway et Overback) que lorsque deux corps portent des charges électrostatiques de même signes il y'a répulsion entre eux, et attraction lorsque ces charges sont de signes opposés. C'est ce qu'on appelle des *interactions électrostatiques*. Il existe également les interactions dites *électrodynamiques* dues aux mouvements des molécules.

La résultante de ces deux interactions et la distance entre le support et le micro-organisme ainsi que la taille des molécules participant dans le processus, définissent le type d'adhésion installée (réversible ou non). C'est pourquoi, dans un premier temps les bactéries (molécules de grandes

tailles, supérieure à 1µm) seront emprisonnées dans le minimum secondaire, zone d'énergie se situant entre 6 et 8 nm du support et de faible attraction (qui dit faible attraction dit adhésion réversible).

Après la production des filaments de polymères extracellulaires (molécules de petits diamètres capables de s'installer dans la zone du minimum primaire qui se situe à moins de 2 nm) elles conduisent à une forte attraction dont résulte une adhésion irréversible (VALDEZ, 2000).

d. Colonisation

Cette phase dépend principalement du métabolisme microbien et se déroule donc lentement par rapport à la phase d'adhésion. Elle correspond à la multiplication des microorganismes. Alors que des bactéries peuvent adhérer à une surface en quelques minutes il est généralement reconnu qu'un biofilm se forme en plusieurs heures ou plusieurs jours (BOURION, 2000).

Il y'a production de la matrice polymérique (des polysaccharides) qui permet la formation de micro-colonies.

A. Evolution

L'évolution du biofilm consiste à atteindre un équilibre entre le taux d'accumulation et de détachement de matière du biofilm.

Le détachement est causé par trois principaux facteurs : l'abrasion, qui correspond à une perte de biomasse induite par la collision répétée de particules supports tel dans les filtres à sable. L'érosion, perte continue de la partie supérieure du à plusieurs facteurs (développés dans le tableau ci-dessous) et le dépouillement, phénomène beaucoup plus important que les deux autres, consiste en un détachement de portions entières de biofilms. Parmi les causes : formation de bulles de gaz et présence de chélateurs de calcium (lors de dépouillement induit).

Le tableau 01 présente les facteurs impliqués dans l'érosion.

Tableau 01 : Facteurs impliqués dans l'érosion (BOURION, 2000).

	Facteurs favorisants	Facteurs limitants
Perte de biomasse par érosion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forces de cisaillement ▪ Epaisseur du biofilm 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Limitation en oxygène (rigidité)

- | | | |
|--|---|--|
| | <ul style="list-style-type: none">▪ Limitation en substrat carboné tel le calcium | |
|--|---|--|

I.4.4.2. Facteurs influençant la formation

Différents facteurs, aussi bien externes qu'internes modulent la formation du biofilm de telle sorte qu'ils affectent au moins une des étapes de la formation. Trois sources de facteurs existent, essentiellement : les micro-organismes, le support d'adhésion et le milieu d'immersion.

- **Facteurs liés aux micro-organismes**

La mobilité propre des micro-organismes. La possession de cils ou de flagelles peut favoriser le contact avec la surface, car cette dernière comporte une concentration élevée en nutriments.

La nature des polymères qu'ils produisent conditionnent l'adhésion aux substrats, y compris dans la phase irréversible de l'adhésion.

L'Age de la culture influe également sur l'adhésion, mais selon la nature des micro-organismes considérés. *Pseudomonas aeruginosa* par exemple est plus adhérente en phase exponentielle, pendant que *Pseudomonas marina* l'est plus en phase stationnaire. Quoique pour la plus part des bactéries, la phase exponentielle est la plus favorable.

Il semblerait qu'un faible taux de croissance initiale permettrait mieux aux bactéries de croître et se maintenir grâce à la notion de compétitivité. C'est néanmoins ce qui a été observé par les expérimentations de Camper *et al.* où des coliformes cultivés dans un milieu pauvre en nutriments, et donc avec un faible taux de croissance persistent pendant plus de 8 semaines, tandis que dans de meilleures conditions avec un taux de croissance dédoublé, ils disparaissent au bout d'une semaine seulement (BOURION, 2000).

- **Facteurs liés au support d'adhésion**

Les propriétés physico chimiques, c'est-à-dire la charge et l'hydrophilie ou l'hydrophobie du support jouent un rôle important dans l'adhésion et la colonisation du support. Ceci peut être dû à la nature du matériau utilisé ou tout simplement à l'activité de l'atelier de fabrication.

L'adhésion de *Listeria monocytogenes* est par exemple, largement dépendante de la nature des protéines disponibles.

Le film conditionnant modifie les propriétés physico chimiques des surfaces quelles qu'elles soient. Ainsi, des surfaces ayant des propriétés physico chimiques initialement très différentes, adoptent après absorption de matières organiques diverses (jus de viande, eau de mer) des caractères très similaires : une charge négative et un caractère hydrophile, idéal à la formation d'un biofilm.

La rugosité des surfaces influence également l'adhésion bactérienne, ainsi les aspérités et les anfractuosités augmentent la superficie de contact avec les bactéries et les protègent des forces de cisaillement. S'y rajoute le facteur de la topographie et la taille et la morphologie de ces bactéries.

Enfin, certains supports agissent en nutriment, tel les plastiques et les élastomères, le propylène, l'éthylène propylène et le latex (BOURION, 2000).

- **Facteurs liés au milieu d'immersion**

L'acidité du pH joue un grand rôle, car la colonisation est maximale lorsque le pH est optimal pour leur métabolisme.

Idem pour la température, sauf qu'en plus de la colonisation, la température accroît également la force d'adhésion et l'architecture du biofilm. Ainsi, à 28°C d'incubation *Aeromonas hydrophila* forme un biofilm complexe riche en exo polymère, à 4°C, l'adhésion est faible et éparse et il y'a peu de polymères extra cellulaires. A 42°C, il n'y a plus d'adhésion.

La richesse du milieu en nutriments mène à une plus grande adhésion en un laps de temps relativement court, sauf que la force d'adhésion et la formation de polymères extra cellulaire s'en trouvent réduites. Le biofilm se développe donc mieux dans un milieu pauvre.

La présence des cations favorisent l'adhésion. Leur absence ou leur piégeage par des complexant comme l'EDTA ou l'EGTA peut empêcher l'adhésion ou entrainer le détachement du biofilm (BOURION, 2000).

Les concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques inhibent l'adhésion. Cela est par exemple observé chez des sujets traités pour des infections urinaires à la nitroxoline, ou l'adhésion de souches uro-pathogènes d'*E.Coli* sont inhibées à la fois sur support cellulaire et sur sonde urinaire.

Le régime d'écoulement du fluide conditionne la formation du biofilm. Un écoulement turbulent est souvent plus favorable. Lors du transport des bactéries il facilite le contact avec la surface (augmente l'impact) et une fois établi, il participe au renouvellement du biofilm et sa stabilité en favorisant le transport des nutriments et des microorganismes. Il influence également l'architecture du biofilm, apparition de rides dans le sens du fluide et de lambeaux flottants ou des amas de cellules séparées d'espaces peu denses en régime laminaire (BOURION, 2000).

Enfin le surfactant produit par certaines bactéries peut inhiber la croissance d'autres et recouvrir des surfaces 1000 fois plus grandes que la sienne. C'est le cas de Streptocoques bénins qui inhibent les levures Candida sur silicone.

I.5. Effets des biofilms

I.5.1. Effets positifs

Les biofilms sont un moyen de survie et un réservoir d'espèces microbiennes, leur permettant d'être protégés des agressions (matrice polymérique), de vivre dans un milieu défavorable (pauvre en nutriment) et de garantir un équilibre écologique.

Ils sont généralement inoffensifs et ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. La coopération métabolique établie au sein du biofilm permet de réaliser ces réactions qui requièrent l'action concertée de bactéries ayant différentes capacités métaboliques.

Les bactéries sont de plus en plus sollicitées dans les biotechnologies y compris pour les réactions de fermentation, dans le traitement des eaux usées et les décharges, pour dépolluer des sites contaminés et enfin, pour mobiliser les métaux lourds d'un sol ou d'un déchet (ROUX et CHIGO, 2003).

I.5.2. Effets négatifs

– Domaine médicale

Les biofilms bactériens sont à l'origine de beaucoup d'infections et de complications en santé humaine et animale. En milieu hospitalier, ils sont responsables d'infections nosocomiales. Qui touchent particulièrement les immunodéprimés. Ces biofilms peuvent être composés de souches

commensales ou du dépôt d'un biofilm se trouvant sur la surface d'un matériel médical contaminé (LEBEAUX et CHIGO, 2012).

La plaque dentaire formée sur les dents est un exemple très fréquent, où les espèces bactériennes se succèdent et les enzymes responsables de caries se concentrent. Le brossage reste de loin la meilleure solution contre ce phénomène. Également, il a été estimé que plus de 50 pour cents des patients nécessitant une cathérisation urétrales subissent une infection à la vessie deux semaines plus tard et que peu d'antibiotiques se sont avérés réellement efficaces, car ils développent des résistances aux antibiotiques. Souvent il faut retirer la prothèse (DELORME, 2012).

Le dernier exemple à citer dans ce contexte sont les lentilles de contact sur lesquelles il y'a prolifération des biofilms, ainsi que dans leur solution de stockage. Ce qui induit des inflammations et des irritations oculaires (DELORME, 2012).

Néanmoins, il a été mis en évidence que les signaux environnementaux réguleraient, de manière opposée, les capacités des bactéries à former un biofilm ou à être virulentes. Au cours de la phase planctonique d'infection, les bactéries libèrent des facteurs de virulence et altèrent les tissus de l'hôte. Une fois dans un environnement adapté, les bactéries pourraient s'implanter et persister sur une surface via le biofilm. Les études menées en ce sens suggèrent que le biofilm joue un rôle dans la persistance des bactéries dans un environnement donné et non directement dans le mécanisme infectieux ou la virulence des souches (ROUX et CHIGO, 2006).

Il faut également savoir que la matrice du biofilm le protège considérablement du système immunitaire de l'hôte, sa taille freine le processus de phagocytose. Elle résiste aux enzymes libérés par les cellules immunitaires, et elle empêche la reconnaissance antigénique des micro-organismes par les anticorps (LEBEAUX et CHIGO, 2012).

– Santé publique

Le problème se pose au niveau des systèmes de distribution de l'eau potable et de l'air conditionné. Contaminés par des biofilms de *Pseudomonas aeruginus*, *Aeromonas hydrophila* et *Legionella pneumophila* pour l'eau et des Legionelles pour l'air.

Les traitements permettent de diminuer relativement les bactéries planctoniques mais pas les biofilms sur les parois, ce qui peut mener à une ré contamination périodique par détachement de matière (ROUX et CHIGO, 2006).

– L'industrie

D'une manière générale, toute industrie ayant des procédés en contact avec l'eau souffre de l'encrassement microbiologique. Ce dernier mène ou à une surconsommation énergétique ou à une diminution de l'efficacité des procédés.

Ils diminuent par exemple la capacité de transfert de chaleur au sein des échangeurs thermiques. Diminuent la capacité de pompage dans les canalisations, y augmentent la résistance à l'écoulement, en plus de diminuer de leur le diamètre utile et bloquent les membranes filtrantes.

Sur les coques des navires, ils entraînent une sur consommation du fuel et une réduction de la vitesse. Et sur les surfaces métalliques, ils provoquent la corrosion allant jusqu'à percer des plaques de 1.6 cm d'épaisseur en moins de six mois.

Dans l'industrie pétrolière, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable.

Quant à l'industrie du papier, les grandes quantités d'eau utilisées lui valent plusieurs problèmes : coloration de la pâte par des pigments microbiens, raccourcissent les fibres de cellulose, contamination par les spores, bio corrosion, colmatage des filtres, production de gaz nauséabondes, toxiques, voir même explosifs (BOURION, 2000).

– Industrie agro-alimentaire

La contamination par les biofilm touche tout type d'industrie agro-alimentaire. En minoterie lors du lavage de grain par salmonelle. En malterie est sucrerie par *Leuconostec*. Dans les ateliers de produits laitiers, sur le verre et l'acier inoxydable par *Pseudomonas fragi* et *Staphylococcus aureus* ainsi que *Listeria monocytogenes* y compris en présence de flore compétitive à 10°C.

Des études de quantification des bactéries fixées sur des surfaces d'atelier de différentes activités ont été réalisés, les résultats ont montré des scores de 3.10^3 cellules par cm^2 pour le poisson, 4.10^7 pour la pomme de terre, et 10^7 pour les produits carnés.

La présence d'eau, de recoins difficiles à nettoyer et les nutriments à profusion font que l'industrie agro-alimentaire regroupe toutes les conditions favorables à la formation de biofilms et rend leur élimination très difficile (BOURION, 2000).

I.6. Moyens de détection et de diagnostic d'un biofilm

Les moyens de détection des biofilms sont tant bien utilisés en science pour mieux comprendre les biofilms, qu'en industrie pour évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage. L'idéal serait d'avoir un moyen rapide, fiable et sensible. Tous les moyens ne le sont pas mais ils présentent des caractéristiques variées très utiles selon le besoin (BOURION, 2000).

Ils sont groupés en deux catégories, les quantitatifs et les qualitatifs.

I.6.1. Moyens quantitatifs

Leur rôle est de détecter et d'énumérer les micro-organismes vivant sur une surface donnée, on trouve :

- Le comptage direct sur milieu de culture : c'est un moyen aisé mais très imprécis car les germes viables non cultivables issues du stress que subit le biofilm ne sont pas détectables sur gélose ce qui rends le résultat très imprécis.
- Le comptage indirect : il se fait par dosage de l'ATP ou à travers les mesures respiratoires. La difficulté réside dans la méthode de prélèvement (gélose de contact, écouvillon, brosse etc...) qui bien souvent ne récupère que la partie supérieure du biofilm.
- La microscopie : on retrouve autant le microscope à épi fluorescence pour le dénombrement que le microscope électronique à balayage qui permet de visualiser la structure du biofilm. Ou encore la méthode ELISA, qui est une méthode immunologique rapide, très spécifique et largement répandue (MEDEIROS, 2016).

I.6.2. Moyens qualitatifs

Ils permettent de mesurer l'activité physiologique des bactéries dans le biofilm.

- Microélectrodes : mesurent les gradients de divers éléments chimiques pour qualifier l'hétérogénéité spatiale des biofilms ou leur activité biochimique.
- Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier : méthode non destructive qui caractérise l'activité biochimique.

- PCR : isolement direct des séquences ARNr des populations naturelles du biofilm pour la caractérisation des sous populations. L'inconvénient de cette méthode est l'amplification des fragments d'acide nucléique.
- Gène Lux de bioluminescence : intégration du gène via un plasmide dans un grand nombre d'espèces microbiennes. Permet d'étudier les effets de l'environnement sur la viabilité et l'état physiologique des bactéries au sein du biofilm cependant il ne donne pas toujours des chiffres fiables.
- Microscopie confocale à balayage laser : donne une image en 3D et permet de localiser un échantillon précis du biofilm (une espèce donnée par exemple). Cette méthode est souvent couplée à celle des sondes chimiques.

I.6.3. Méthode de modélisation

Consiste en la création d'un biofilm ou de son repiquage en vitro pour suivre son évolution.

- Modèle statique : idéale pour les biofilms récents, se fait sur micro plaques multi puits avec l'analyse des mutants.
- Modèle dynamique : dédié aux biofilms matures. Se fait par l'inoculation des bactéries à protéines fluorescentes dans des chambres à flux, suivis d'une lecture 3d au microscope confocal à laser (MEDEIROS, 2016).

I.7. Lutte contre les biofilms

Afin de lutter contre les biofilms il faut axer sur la prévention dans le but d'éviter ou de minimiser la formation de ce dernier. Ensuite sur son élimination en mettant en place successivement le nettoyage et la désinfection.

I.7.1. Prévention

Pour prévenir la formation du biofilm il est possible d'agir à trois niveaux différents. D'abord, choisir le bon matériau pour ses équipements, qui soit de préférence lisse et résistant à l'usure après des traitements de nettoyage abrasifs, tel l'acier inoxydable.

Ensuite, respecter les critères de conception, de fabrication et d'installation hygiénique des équipements et suivre quelques recommandations. Comme éviter les zones non drainables, les bras morts, les mauvaises soudures, les joints, les raccords et les angles morts. Et préférer

le cintrage de tuyaux, la soudure en TIG. Ne pas mésestimer les pentes de vidange, les courbes convenables pour faciliter le nettoyage et les pompes en verticales vidangeable sans démontage.

Enfin, il est possible de traiter les surfaces pour empêcher l'adhésion des micro-organismes grâce aux copolymères ou aux revêtements et peintures contenant des substances antimicrobiennes mais l'efficacité de ces méthodes reste limitée et incertaine (BOURION, 2000).

I.7.2. Elimination du biofilm

Pour éliminer le biofilm il faut au préalable nettoyer la surface en question, c'est-à-dire éliminer les salissures puis désinfecter. Et ce pour deux raisons essentiellement : la plupart des désinfectants sont inactivés par la présence de matière organique, et les micro-organismes sont beaucoup plus sensibles aux désinfectants une fois qu'ils ont été détachés des surfaces auxquelles ils adhéraient.

I.7.2.1. Nettoyage

Le nettoyage est l'opération qui consiste à éliminer les salissures en utilisant divers moyens. Le détergence qui est l'action physico-chimique consiste à détacher les salissures de leurs substrats et de les mettre en solution ou en suspens. A cela s'ajoute l'action chimique des agents alcalins ou séquestrant, l'action biochimique des enzymes et enfin l'action mécanique, le temps d'action et la température.

Souvent les produits de nettoyage contiennent un composé alcalin pour agir sur la matière organique ou acide pour les dépôts minéraux, des tensio-actifs, des séquestrant et des chélatants, des antimoussants et des inhibiteurs de corrosion.

Les plus efficaces sont les alcalins chlorés à une concentration de 4% (98% des bactéries décrochés), suivi de près par les alcalins seuls (90%) et loin derrière par les acides qui ont une efficacité similaire à celle de l'eau chaude (environ 40%).

Concernant l'action mécanique il est conseillé d'avoir un jet d'eau de 17 bars à une distance de 12-25 cm pendant 3sc. et l'utilisation de détergent quel que soit son pH n'améliore pas l'efficacité du nettoyage et n'as qu'un effet bactéricide.

Quant au nettoyage en place, l'action mécanique des solutions est considérée comme étant turbulentes à partir de 1ms-1 (BOURION, 2000).

I.7.2.2. Désinfection

La désinfection est l'opération permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes ou virus indésirables de façon momentanée.

Trois types de traitements existent essentiellement : la sensibilisation, en utilisant la soude caustique et l'acide péracétique. La désinfection sur site ou continue, ou un catalyseur augmente l'activité des désinfectants antioxydants. Ou l'utilisation des surfactants ioniques avec les acides organiques car ils potentialisent leur pénétration.

Lors de la désinfection il faut prendre en considération les facteurs pouvant influencer l'efficacité de ces traitements :

- La résistance des biofilms est beaucoup plus élevée que celle des bactéries en suspens, exemple : un biofilm de *Listeria monocytogenes* résiste 20 minutes au chlorure de benzalkonium contre 30 secondes pour les bactéries en suspens.
- La matière du support et sa rugosité affecte la facilité du traitement. Par exemple : le caoutchouc et le téflon nécessitent 5 à 10 fois plus de désinfectants que l'acier inoxydable.
- L'âge du biofilm peut le rendre très résistant, jusqu'à cent fois plus résistant.

Et la présence d'eau reste le facteur numéro un du développement du biofilm, c'est pourquoi il est important de minimiser son utilisation autant que possible (BOURION, 2000).

I.8. Résistance

Malgré toutes les méthodes et moyens mis en place, le biofilm ne disparaît jamais totalement et sa résistance reste un problème incomplètement compris et qui lui confère une rémanence perpétuelle.

Les hypothèses qui tentent d'expliquer ce phénomène se basent sur les propriétés du biofilm, tel la présence de la matrice polysaccharidique qui lui confère une protection contre les agents antimicrobiens en les empêchant de pénétrer ou en les piégeant et les détoxifiant grâce à des enzymes ou à un effet ionique. Il y'a également le changement physiologique des bactéries, par le ralentissement de leur métabolisme et donc la baisse de la perméabilité de leur membrane ou la production de protéines de stress qui leur confèrent une résistance au stress nutritionnel, aux antibiotiques ou à tout autre facteur de stress (BOURION, 2000).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre II : Partie expérimentale

Application et évaluation de l'efficacité du traitement enzymatique dans une unité de production de glaces

Objectifs

Les objectifs de la partie expérimentale au laboratoire tendent à répondre aux questions suivantes : y'a-t-il un biofilm dans tous les circuits ? Quels sont les bactéries qui les colonisent ? Le traitement a-t-il permis leur élimination et la désinfection des circuits a-t-elle été efficace ?

La comparaison des résultats des deux méthodes permet de savoir si l'une valide les résultats de l'autre, et s'il est préférable pour un industriel d'opter pour une méthode plutôt qu'une autre ?

II.1. Lieu et durée de l'étude

La présente étude a été effectuée durant la période allant du mois de Avril 2018 jusqu'au mois de Avril 2019. Tous les prélèvements (eau de rinçage) ont été récoltés à partir d'une unité de production de crème glacée (société cliente) puis analysés avant et après traitement enzymatique, non seulement au sein de la société cliente, mais aussi au niveau du laboratoire de microbiologie clinique de l'ENSV. Par ailleurs, d'autres échantillons ont été prélevés au même moment que les nôtres par une société prestataire, et ce afin d'être analysés par un laboratoire externe.

II.2. Présentation des sociétés concernées

II.2.1 Société cliente

II.2.1.1 Présentation

La société cliente est une entreprise agro-alimentaire qui produit des glaces au lait, des glaces à l'eau et des sorbets. Elle se situe à Beb Ezzouar à Alger et compte entre 300 et 400 employés. Elle a fait le choix de l'étude car il s'agit du lieu de formations précédentes en contrôle qualité sécurité et analyses microbiologiques alimentaires. Durant les 10 dernières années la société a été certifiée HACCP, ISO 9001 et ISO 22000.

Les glaces sont un produit riche en lipides, protéines et glucides, et nécessitent une température de stockage de -18°C en chambre négative. C'est donc un milieu favorable à la multiplication bactérienne en cas de rupture de la chaîne du froid.

Le circuit de production passe par 4 étapes essentielles (Figure 04), il commence par la cuisson où les matières premières sont mélangées, cuites puis pasteurisées à 79°C. Ce mix repose ensuite à des températures basses de 6-7°C, c'est la maturation. Il est par la suite conditionné et stocké à -18°C dans des chambres froides négatives pour être transporté dans des camions frigorifiques.

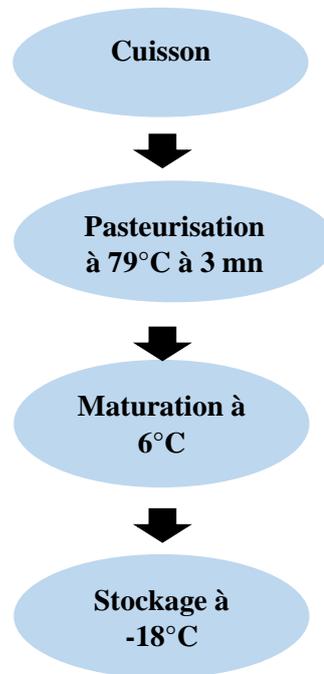


Figure 04 : Etapes de la production de glaces (PRIMA GLACES, 2012).

II.2.1.2 Moyens de lutte contre le biofilm déployés par la société

a. Mesures de prévention

Tout au long de ce circuit, des moyens de préventions et d'assainissement sont mis en place. Et ce, selon les besoins, risques et dangers de chaque étape comme présenté dans le tableau 02 :

Tableau 02 : Moyens d’assainissement mis en place aux différentes étapes de production (PRIMA GLACES, 2012).

Etapes de production	Mesures prises	But
Préparation du mix	Pasteurisation à 79°C pendant 3 minutes	Eliminer la plupart des bactéries (essentiellement psychrotrophes et mésophiles)
Maturation	Réfrigération aux environs de 6°C	Empêcher la multiplication bactérienne (thermophiles et mésophiles)
Conditionnement	Passage par le tunnel de congélation -18°C	Arrêt de toute activité enzymatique et bactérienne

En parallèle de ces mesures d’assainissements, des mesures préventives telles l’utilisation de l’acier inoxydable, la veille à l’hygiène des locaux, du personnel et des moyens de production (chaines de cuisson, cuves de maturation, machines de soutirages et autres) sont quotidiennement menées par les équipes de production et sont supervisées par le responsable de production et le contrôleur qualité sécurité. Enfin, des examens bactériologiques sont réalisés pour chaque lot afin d’assurer au consommateur un produit sain et sur.

b. Mesures d’élimination

Parmi les différents moyens d’élimination possibles, la société a opté pour le nettoyage en place avec boules pivotantes pour assurer la turbulence des solutions et l’action mécanique par le jet d’eau à la distance, pression et temps optimums.

Pour la désinfection, c’est le principe de sensibilisation qui est appliqué de façon répétitive et quotidienne (acide et soude).

II.2.1.3 Historique de la société cliente avec le traitement enzymatique

En 2014 et en collaboration avec une société allemande, l’unité de production de glaces mets en évidence la présence de biofilm dans ses circuits grâce à une méthode quantitative par comptage indirect, l’ATPmètrie. Suite à ce diagnostic deux traitements à base d’enzymes ont

été appliqué, l'un en 2014, l'autre en 2016. En 2018, elle décide de relancer le traitement mais en collaboration avec une société algérienne cette fois-ci. (Figure 05).

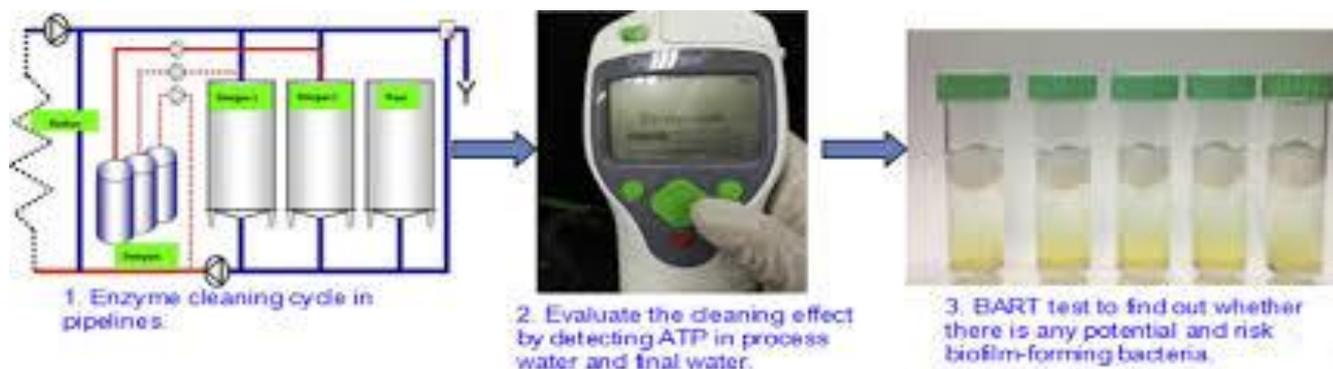


Figure 05 : Traitement enzymatique et ATPmétrie (XIAOBOLI, 2014).

II.2.2 Société prestataire

Le prestataire propose à ses clients des solutions intégrales d'hygiène professionnelles dans les domaines de la santé humaine, animale, dans l'industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique et les collectivités. Ils fournissent l'accompagnement, l'expertise, des audits et des solutions aux problèmes de contamination et de la maîtrise de la qualité et de la sécurité rencontrés par leurs clients. Parmi les services qu'ils proposent en industrie agro-alimentaire, il y'a la mise en place des bonnes pratiques d'hygiène (BPH), la mise en place, conduite et optimisation de l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), La mise en place, conduite et validation d'un plan de nettoyage et désinfection, *etc.* Par souci de transparence, les prélèvements destinés à des analyses bactériologiques sont confiées à des sous-traitants chargés de les examiner..

II.2.3. Laboratoire d'analyse microbiologique externe

Il s'agit d'une société de services, dotée entre autres d'un laboratoire d'essais et d'étalonnage et d'un établissement privé de formation professionnelle. Il propose son expertise dans quatre domaines d'activités : Le contrôle qualité des matières premières, produits semi finis et des produits finis et eaux, l'étalonnage et la qualification des équipements de mesure, la formation dans les domaines de la qualité, Hygiène, sécurité et environnement et les procédés industriels, et l'assistance technique.

Les échantillons prélevés au cours du traitement sont confiés à ce laboratoire pour être analysés dans le but de valider l'efficacité de ce dernier.

II.3. Traitement enzymatique

II.3.1. Présentation du traitement

C'est un traitement composé de plusieurs solutions, essentiellement des enzymes. Il s'adresse aux professionnels de l'industrie agro-alimentaire dans le but d'éliminer le biofilm des unités de production. Il se présente sous forme liquide, chaque constituant conditionnée individuellement car chacun s'applique à une concentration et à une température différente.

II.3.1.1. Intérêt

Cette méthode a deux intérêts, elle traite et prévient l'apparition des biofilms à la fois.

II.3.1.2. Principe

Le traitement enzymatique est appliqué aux entreprises qui suspectent la présence de biofilms dans leurs unités de production, tout au long du traitement des échantillons d'eau de rinçage sont récupérés puis acheminés vers un laboratoire de microbiologie qui définit la présence effective de biofilm ou non et de son élimination.

II.3.1.3. Composants

Le traitement se compose de plusieurs solutions, la solution 1 contient les enzymes protéolytiques et glycolytiques et un stabilisant, la solution 2 contient des séquestrants, dispersants, tensio-actifs et une base, la solution 3 est de la soude caustique et la solution 4 est de l'acide péracétique.

II.3.1.4. Mode d'action

Le mode d'action du traitement repose sur la fragilisation du biofilm par les enzymes qui vont désagréger la matrice polymérique et exposer les bactéries qui y étaient protégées. Cette action est suivie par le versement de la soude caustique afin d'éliminer la matière organique libérée puis par une désinfection et un rinçage abandon. Le biofilm est ainsi détruit et les bactéries éliminées.

II.3.1.5. Conditions d'utilisation

Pour un rendement optimal, il est important d'utiliser les enzymes dans une température et à un pH adéquat. Le circuit d'utilisation doit être fermé et propre de tout résidus et le suivi des normes de sécurité doit être respecté. Le traitement peut être renouveler chaque 6 à 24 mois selon les besoins de la société.

II.3.2. Matériel

Avant de commencer le traitement il est important de se munir du matériel suivant :

Tableau 03 : Matériel pour l'application du traitement enzymatique et les prélèvements.

	Matériel	Solutions
Traitement enzymatique	<ul style="list-style-type: none">• Thermomètre.• pH mètre.• Bécher de 1 litre.• Bécher de 250 ml.• Feutre indélébile.• Calculatrice.	<ul style="list-style-type: none">• Eau distillée.
Prélèvements	<ul style="list-style-type: none">• Tubes de prélèvement stériles.• Tubes Slim B.A.R.T.	<ul style="list-style-type: none">• Alcool.



Figure 06 : Matériel pour appliquer le traitement enzymatique (photo personnelle).

II.3.3 Méthodes

a. Répartition et désignation des circuits

Afin d'assurer l'efficacité du traitement il est primordial de respecter le temps d'action. Et ce, en mettant en place un circuit fermé qui fait tourner les solutions en continu et assure une durée de contact précise avec la surface à traiter. Pour des raisons techniques le circuit type utilisé est composé d'une cuve principale qui distribue les solutions, 4 cuves qui se succèdent destinées au traitement, une pompe, un système de réglage de la température de l'eau et de la tuyauterie (Figure 07).

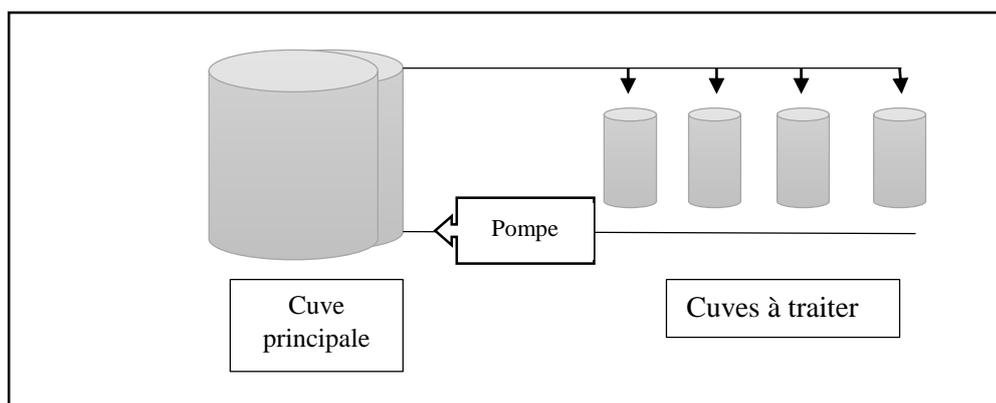
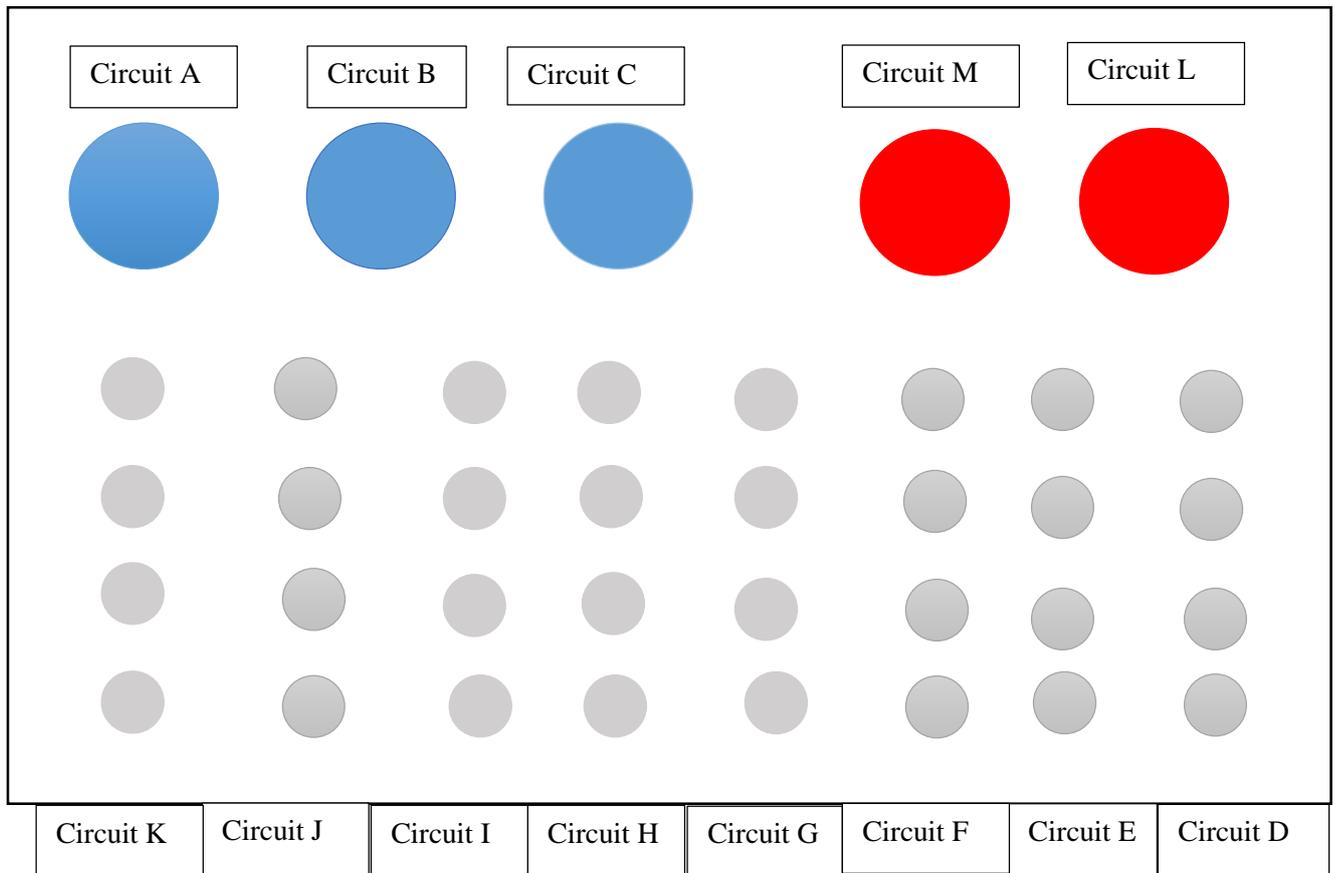


Figure 07 : Plan d'un circuit type (Schéma personnel).

Les cuves dans l'unité de production sont réparties par nombre de quatre, chaque groupe représentant un circuit. Certains circuits sont formés d'une chaîne de cuisson ou d'une machine de conditionnement comme montré dans la figure suivante. Le nombre de circuits traités est égal à 13.



Bleu : chaînes de cuisson ; Gris : cuves de maturation ; Rouge : machine de conditionnement

Figure 08 : Répartition des circuits (Schéma personnel).

Pour faciliter le marquage des prélèvements, chaque circuit est désigné par un code, 11 circuits sont retenus. Ils sont représenté dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Désignation des circuits.

Nom des cuves	Désignation des circuits
Chaine cuisson A	A
Chaine cuisson B	B
Chaine cuisson C	C
28 – 29 –30 – 31	D
24 – 25 – 26 – 27	E
32 – 33 – 34 – 35	F
20 – 21 – 22 – 23	G
16 – 17 – 18 – 19	H
12 – 13 – 14 – 15	I
6-7-8-9-10-11	J
01-02-03-04-05	K
Machine 1	L
Machine 2	M

b. Application

Les directives de l'application du traitement sont comme suit (NOSOCLEAN) :

-Nettoyer les circuits avec la méthode usuelle et rincer abondamment.

-Déverser la solution 1 (enzymes) à raison de 0,25% et la seconde (séquestrants, dispersants, tensio-actifs et une base) à 0,05% dans une eau à 45°C à pH neutre et laisser tourner dans le circuit pendant une heure. Ajouter progressivement la soude caustique jusqu'à pH 10 en veillant à ce que la température de l'eau reste stable. Au bout d'une heure, vidanger, rincer et désinfecter à l'aide de l'acide péracétique à 0,6%. Laisser agir une quinzaine de minutes. Rincer abondamment et surveiller le pH, lorsqu'il retrouve une valeur proche de 7, le traitement est fini (Figure 09).

PROTOCOLE D'AUDIT DE MISE EN EVIDENCE DE BIOFILMS					
Etape	Produit	Concentration (%)	Temps	T°C	Commentaires
Lavage complet matériel	Lavage classique	Selon Process			
Rinçage	Eau				
TRAITEMENT BIOFILM: STEP 1	[REDACTED] CIP CT + [REDACTED] CIP CT	[REDACTED] IP CT] = 0,25%	5 minutes (en premier)	45°C	Important: TEMPERATURE Ne jamais dépasser 50°C Mélanger les deux produits: D'abord [REDACTED] CIP CT puis [REDACTED] CT.
		[REDACTED] CIP CT] = 0,05%	55 minutes		
TRAITEMENT BIOFILM: STEP 2	[REDACTED] HA ou SOUDE	[REDACTED] HA] = 0,2% Atteindre pH 10	60 minutes	45°C	Conserver la solution enzymatique e additionner progressivement [REDACTED] PHA pour atteindre pH10 Circulation 45 min
Rinçage	Eau				
Disinfection	[REDACTED]	300 ppm [REDACTED] = 0,6%	15 minutes	<40°C	Important: Désinfection à froid. Ne jamais dépasser 40°C. Circulation 15 minutes
Rinçage	Eau	pH 7			

Figure 09 : Protocole du traitement (photo personnelle).

II.3.4. Echantillonnage

Au cours du traitement, il a été procédé au prélèvement des échantillons à des moments clés :

- Avant l'application du traitement.
- Avant l'ajout de la soude.
- Avant la désinfection.
- Après le rinçage final.

Ils sont nommés respectivement T0, T1, T2 et T3. Et ils consistent à suivre l'évolution du traitement. T0 permet d'estimer l'efficacité du nettoyage fait au préalable et la qualité microbiologique de l'eau d'arrivée. Alors que T1 et T2 renseignent sur la présence ou non d'un biofilm, et T3 permet d'estimer l'efficacité de la désinfection et le résultat final du traitement.

Les prélèvements se font sur tubes SLIM B.A.R.T puis sont acheminés vers un laboratoire externe. Ils sont ouverts juste au moment du prélèvement, remplis jusqu'au trait de jauge et refermés aussitôt (Figure 10).



Figure 10 : Tube de prélèvement SLIM B.A.R.T. (photo personnelle).

Pour l'expérimentation, des tubes de prélèvement stériles sont remplis de la même façon et désignés par un code. Ce code se compose de la désignation du circuit accompagnée du numéro de prélèvement. Par exemple : le prélèvement T3 du circuit D est désigné par le code D3, et le prélèvement T0 du circuit E est désigné par le code E0 et ainsi de suite (Figure 11).



Figure 11 : Tube de prélèvement stérile (photo personnelle).

De cette manière, 8 prélèvements sont effectués pour chaque circuit, 4 sur SLIM B.A.R.T et 4 sur tube de prélèvement stérile. En tout, 88 échantillons sont prélevés, 44 sur SLYM B.A.R.T et 44 sur tubes stériles (Tableau 05).

Tableau 05 : Suivi des prélèvements.

	NEP	Enzymes				Soude				Désinfection		Rinçage		
circuit	P0	Ph	T°	Heure	P1	Ph	T°	Heure	P2	T°	Heure	Ph	Heure	P3
A	A0	7,3	45°C	09:30	A1	10,02	43°C	10:40	A2	40°C	11:45	7,5	12:00	A3
B														
C1														
C2														
D														
E														
F														
G														
H														
I														

P : prélèvement ; T° : température

II.4. Evaluation de l'efficacité du traitement

L'évaluation de l'efficacité du traitement s'est faite au niveau de deux laboratoires distincts et avec deux méthodes d'analyses différentes, l'une au niveau du laboratoire externe à l'aide de biodétecteurs B.A.R.T. et la seconde au niveau du laboratoire de recherche de microbiologie spéciale à l'E.N.S.V. d'alger par des méthodes d'analyse conventionnelle.

Pour pouvoir évaluer un procédé de nettoyage quelconque, il faut prendre des échantillons avant et après son application et comparer les résultats. Dans ce cas précis, puisqu'il s'agit de biofilms fixés aux supports. L'évaluation consistera à prendre des prélèvements avant, pendant et après le traitement et d'apprécier si la masse bactérienne s'est détachée pendant celui-ci, et si en fin de procédé les circuits sont correctement désinfectés et exempts de présence bactérienne.

II.4.1. Biodétecteurs B.A.R.T.

II.4.1.1. Matériel et méthodes

a. Matériel

L'utilisation du SLYME BART ne requiert pas beaucoup de moyens, il suffit simplement du biodétecteur, d'une lampe UV et d'une pièce à température ambiante.

b. Méthode

La méthode employée nécessite d'ouvrir le bouchon, de remplir le tube avec l'eau à analyser sans déborder et de refermer aussitôt. Si l'utilisation d'une spatule ou d'un récipient est nécessaire au moment du prélèvement, il est recommandé que celui-ci soit stérilisé au préalable au four pasteur ou bien flambé à l'alcool. Les tubes ainsi remplis sont posés dans une pièce à température ambiante et sont régulièrement inspectés, et ce pendant 8 jours.

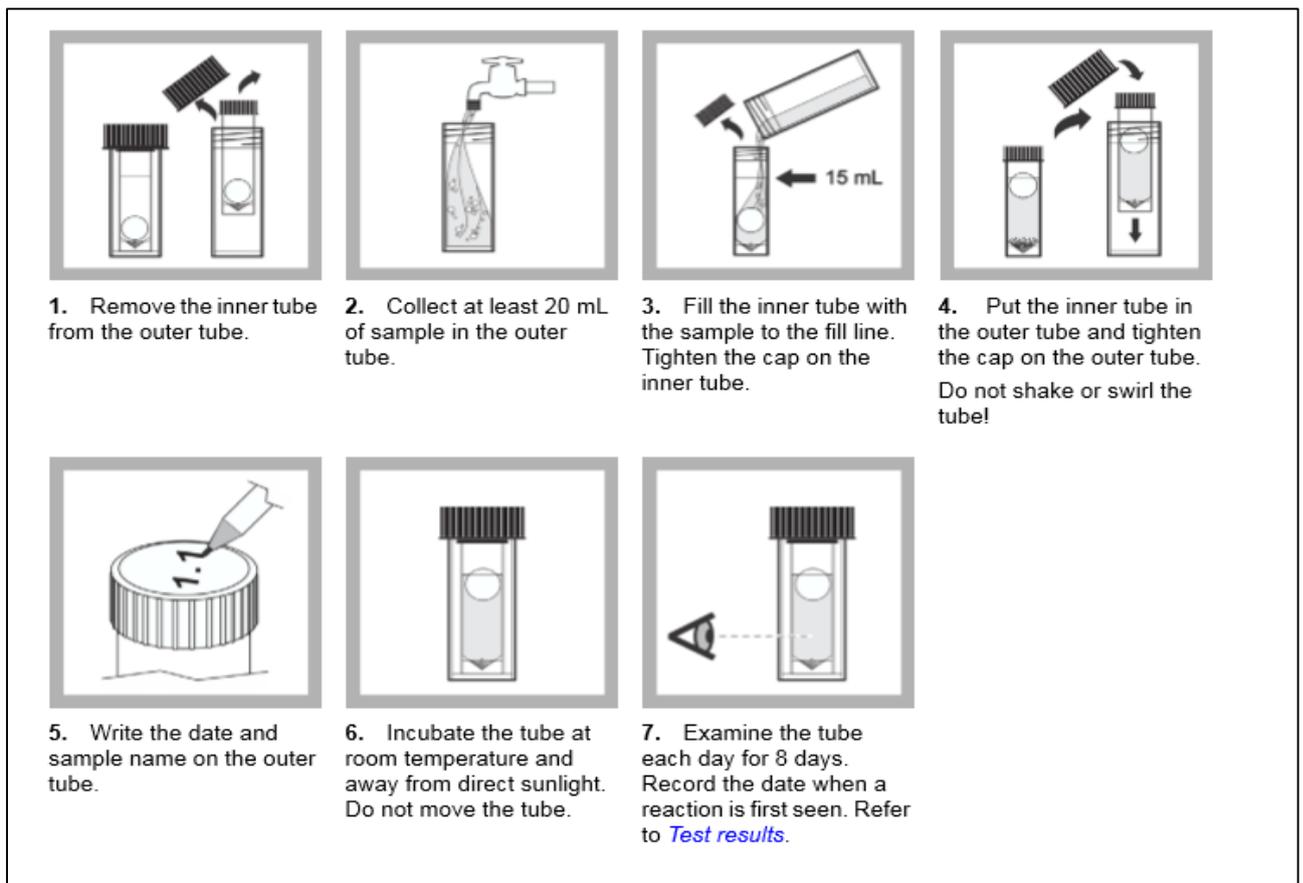


Figure 12 : Méthode d'utilisation du SLYME BART (Manuel HACH, 2016).

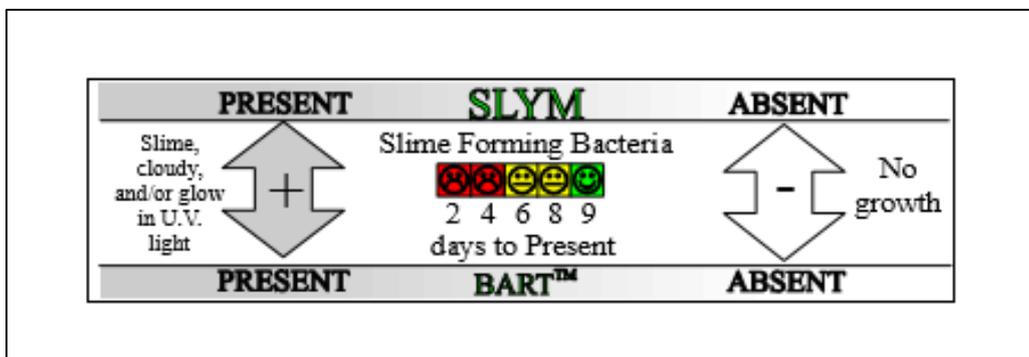


Figure 13 : Lecture du SLYME BART (Manual DBI, 2004).

Plus les réactions dans le tube mettent de temps pour apparaître plus la population de bactéries actives, dites agressives est moindre. Au contraire, plus elles sont rapides à apparaître et plus la population bactérienne est importante. Ce temps appelé Time Lag permet de calculer la population bactérienne en UFC/ml selon le tableau suivant :

Tableau 06 : Relation entre le Time Lag et la population bactérienne (Manuel DBI, 2004).

Time Lag (jour)	Population UFC/ml
1	1,800,000
2	350,000
3	66,500
4	12,500
5	2500
6	500
7	100
8	10

Le milieu de culture étant très riche en nutriment, il permet la croissance de divers bactéries et donc l'apparition de réactions divers et variés, somme toute les réactions observées n'ont pas toujours la même importance dans la détermination de l'agressivité du biofilm.

Le tableau suivant démontre la relation entre le Time Lag de chaque réaction et son degré d'agressivité :

Tableau 7 : Relation entre le Time Lag et l'agressivité des bactéries (Manuel DBI, 2004).

<u>Relationship between the Time Lag to the Reactions in a SLYM-BART™ and the Aggressivity of the Slime Forming Bacteria</u>					
		Aggressivity			
		Very	Sign.	Moderate	Not
DS	-Dense Gel Slime	<1	2	3-7	>7
SR	-Slime Ring	<1	2-3	4-6	>6
CP	-Cloudy Plates	<0.5	1-2	3-6	>6
CL	-Cloudy Growth	<1	2	3-6	>6
BL	-Blackened Liquid	<1	2-4	5-8	>8
TH	-Threads	<2	3-4	5	>6
PB	-Pale Blue Glow	<1	2-4	5-8	>8
GY	-Green-Yellow Glow	<1	2-3	4-8	>8

Selon le résultat obtenu certaines actions peuvent s'avérer urgentes à mener.

La liste des choses recommandée à faire selon le cas rencontré est présentée dans le tableau 8 :

Tableau 8 : Actions à mener selon le résultats de SLYM BART obtenu (MANUEL DBI, 2004).

Résultat	Action à mener
Très agressif	Un traitement devrait être lancé aussi tôt que possible.
Agressif	Un traitement devrait être envisagé avant que la situation ne s'aggrave.
Modéré	Il peut ne pas être nécessaire de traiter mais la vigilance est de mise.
Niveau normal	Des tests de routine sont recommandés.
Coloration noirâtre	Il indique la présence de <i>Pseudomonas</i> et des <i>enterobactéries</i> le risque d'hygiène étant hautement significatif, si cette coloration apparait dans les huit jours il est recommandé de faire un examen de coliformes fécaux pour déterminer le risque sanitaire de l'eau.
Fluorescence PB ou GY	Ce résultat doit être confirmé par l'utilisation du FLOR BART.

II.4.1.2. Présentation

Le biodétecteur B.A.R.T. qui veut dire test de réaction d'activité biologique est un kit de diagnostic des bactéries indésirables dans l'eau. Il est basé sur la rapidité de croissance sur les tubes et le type de lecture obtenu. Son utilisation est préconisée dans deux cas essentiellement, le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau ou l'évaluation de l'efficacité d'un processus de nettoyage. Par ailleurs, différents types de biodétecteurs existent, l'IRB BART, le SRB BART, le HAB BART, le SLYME BART etc... ils sont sélectifs selon la ou les bactéries incriminées et il peut être nécessaire d'en utiliser deux ou plus lors d'un diagnostic (Tableau 9).

Tableau 09 : Types de biodétecteurs BART (Manuel DBI, 2004).

Communauté microbienne	BART	Milieu de culture sélectif	Couleur du capuchon
Bactéries ferriques	IRB	Winogradsky	Rouge
Bactéries réductrices de sulfate	SRB	Postgate	Noir
Bactéries formant le slime	SLYM	Glucose Peptone	Vert
Bactéries Aérobieques hétéotrophiques	HAB	Sucre Peptone	Bleu
Algues	ALGE	Bold	
Pseudomonas fluorescense	FLOR	Peptone base	Jaune
Bactéries dénitrifiantes	DN	Nitrate Peptone	Gris
Bactéries nitrifiantes	N	Ammonium sels	Blanc
Bactéries produisant de l'acide	APB	Glucose Peptone modifié	Violet
Demande biochimique en oxygène	BOD	Sucre Peptone modifié	Bleu clair



Figure 14 : Gamme de biodétecteur BART.

IL se présente sous forme d'un tube contenant un milieu de culture sélectif cristallisé au fond, et une balle flottante au milieu. Une fois l'eau à analyser est déversée dans le tube, la boule remonte et crée une barrière réduisant la concentration d'oxygène dans le milieu à des niveaux différents, permettant l'accroissement des bactéries aérobies, anaérobies, strictes et facultatives. Le milieu de culture prend 2 jours pour être entièrement dissous dans le tube. La croissance bactérienne se

traduit par des changements d'aspect de l'eau, et chaque modification suggère la présence de telle ou telle bactérie (Figure 15).

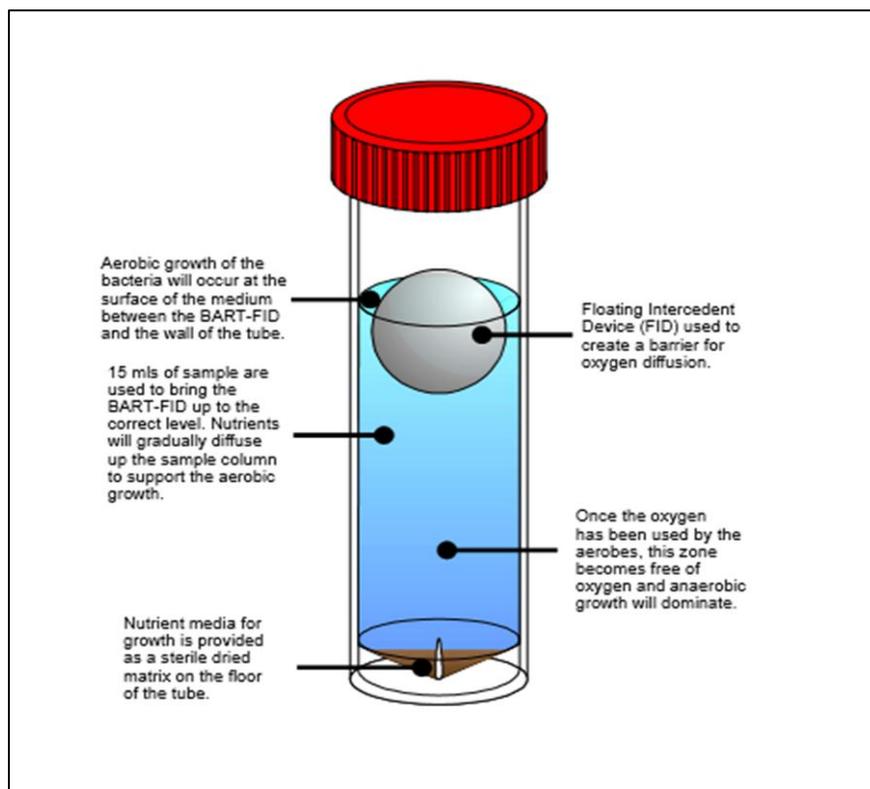


Figure 15 : Principe du BART (Manuel DBI, 2004).

Les changements pouvant opérés dans le cas du SLYME BART sont décrits dans le tableau 10 et la figure 16 qui suivent :

Tableau 10 : Modifications possibles dans le cas du SLYM BART (Manuel DBI, 2004).

Designation	Aspect	Description
DS dense slime	Slime dense (ressemble à du gel)	Beige, blanc ou jaune orangé ce slime est souvent déposé au fond du tube, lorsqu'il est agité il forme un petit tourbillon puis se dissipe vite et l'eau redevient claire.
SR slime ring	Anneau de slime autour de la balle	Un anneau de slime muqueux de 2 à 5 millimètres de largeur et d'une couleur blanc, beige, jaune, orange ou violet se forme autour de la balle. Au fil du temps la couleur s'intensifie par le dessus.
CP cloudy plates	Superposition de plaques troubles	Croissance initiale aux frontières redox (15 à 30 millimètres sous la surface) avec apparition de disques gris minces aux contours distincts qui s'accumulent

		avant de rendre toute l'eau trouble, ou des nuages rebondis aux contours indistincts qui diffusent dans le milieu. Une coloration jaune brunâtre surplombe ces formations.
CL cloudy growth	Culture trouble	La solution est très dense et un faibles lime peut exister autour de la balle, parfois une fluorescence est observée dans les 18 millimètres supérieurs de l'eau sous lame UV elle est synonyme de présence de pseudomonas.
BL blackened liquid	Liquid noirâtres	la solution est claire, voir incolore avec des taches noirâtres sur les parois du tube en bas et en haut. Cette réaction est généralement présente sur l'IRB BART et le SLYME BART s'ils sont utilisés pour le même échantillon.
PB pale blue glow	Fluorescence bleue pale à la lampe UV	
GY greenish yellow glow	Fluorescence jaune vert à la lampe UV	
TH thread like	Fils sur les bords	Parfois ces fils de slime forment une toile allant du haut au bas du tube.

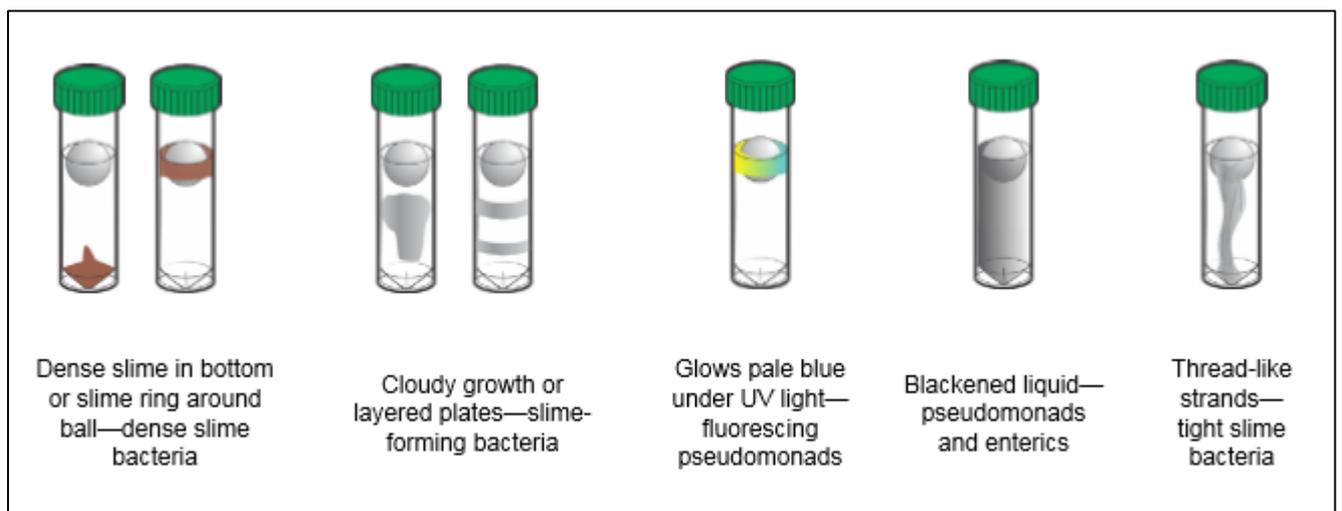


Figure 16 : Aspect du SLYME BART après incubation (MANUEL HACH, 2016).

Chaque changement d'aspect représente un groupe bactérien donné qui sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 11 : Bactéries responsables de la modification d’aspect du milieu BART
(MANUEL DBI, 2004).**

Aspect	Reaction pattern signature
DS CL	Bactéries produisant une importante quantité d’EPS, anaérobie facultative dominantes
SR CL	Bactéries aérobie formant le slime dominantes tel <i>Micrococcus</i> avec quelques bactéries anaérobies facultatives
CP CL	Bactéries anaérobies facultatives motiles tel <i>Proteus</i>
CL SR	Flore bactérienne mixte incluant quelque bactéries formant le slime
CL BL	Bactéries produisant du slime dominées par <i>Pseudomonas</i> et <i>Enterobactérie</i>
CL PB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> domine
CL GY	<i>Pseudomonas fluorescens</i> domine
TH CL	Bactérie aérobie capable de produire des fils de slime dominante comme <i>Zoogloea</i>

II.4.1.3. Résultats

Les résultats obtenus sont communiqués dans un bulletin d’analyse. Ce dernier informe sur l’aspect de l’échantillon (trouble/clair/résidus), la population bactérienne (UFC/ml), la turbidité (FTU), le repiquage sur milieu cétrimide (*Pseudomonas*) et la conclusion de l’analyse (agressif/modéré/ pas agressif).

Il se base dans la lecture des résultats sur l’échelle suivante :

**Tableau 12 : Echelle de lecture de l’agressivité et de la population bactérienne par jour
(BULLETIN D’ANALYSE).**

Jour	1	2	3	4	5	6	7	8
Population	1.750.000	440.000	67.000	13.000	2.500	500	100	<20
Agressivité	Agressif			Modéré			Non agressif	

Les méthodes d’analyse citées sont référencées « Méthode BART TEST FOR SLYM » pour le biodétecteur, et ISO 16266 pour la recherche de *Pseudomans aeruginosa*. Les résultats communiqués sont rassemblés dans le tableau suivant par étape de traitement et par circuit, ils sont exprimés en UFC/ml.

**Tableau 13 : Résultats des analyses obtenus par SLYME BART exprimés en UFC/ml
(BULLETIN D'ANALYSE).**

circuits	T0	T1	T2	T3
A	/	/	<20	<20
B	500	13000	13000	0
C	/	/	13000	0
I	/	/	13000	0
E	<20	67000	0	67000
D	67000	0	<20	2500
F	67000	<20	<20	67000
G	67000	<20	<20	67000
H	67000	67000	0	67000
J	67000	0	0	67000
K	67000	67000	0	67000
L	0	444000	444000	444000
M	/	/	13000	0

Le raisonnement type qui permet de dire s'il y'a présence ou absence d'un biofilm dans un circuit suit le schéma suivant :

- Hausse de la population bactérienne en T1 et T2 surtout, par rapport à T0 = Présence de biofilm.
- Population bactérienne similaire ou absente = Absence de biofilm.

Pour la désinfection, l'absence de bactéries renvoie à un bon résultat.

Dans le tableau suivant (tableau 14) la conclusion de chaque échantillon est désignée par une lettre, et l'alignement de ces conclusions représente les résultats d'un circuit depuis le début du traitement jusqu'à sa fin. L'étude de cet ensemble de données peut renseigner sur la présence effective du biofilm ou non dans les circuits traités, mais aussi sur leur désinfection en fin de cycle car la finalité de toutes ces procédures reste l'élimination du biofilm.

Tableau 14 : Résultats des analyses obtenus par SLYME BART exprimés selon l'agressivité.

Circuits	T0	T1	T2	T3	Echantillons	Biofilm	Désinfection	Interprétation
A	/	/	PAg	PAg	2	A	P	pas de biofilm
B	M	M	M	PAg	4	P	P	traitement réussi
C	/	/	M	PAg	2	P	P	traitement réussi
D	Ag	PAg	PAg	M	4	A	A	pas de biofilm
E	PAg	Ag	PAg	Ag	4	A	A	pas de biofilm
F	Ag	PAg	PAg	Ag	4	A	A	pas de biofilm
G	M	PAg	PAg	Ag	4	A	A	pas de biofilm
H	Ag	Ag	PAg	Ag	4	A	A	pas de biofilm
I	/	/	M	PAg	2	P	P	traitement réussi
J	Ag	PAg	PAg	Ag	4	A	A	pas de biofilm
K	Ag	Ag	PAg	Ag	4	A	A	pas de biofilm
L	PAg	Ag	Ag	Ag	4	P	A	traitement non réussi
M	/	/	M	PAg	2	P	P	traitement réussi
Somme des échantillons	9	9	13	13	44	13	13	
Echantillons contaminés	7	5	4	8		5	8	
% des échantillons contaminés	78%	56%	31%	62%		38%	62%	
Nombre d'échantillons contaminés par <i>Pseudomonas</i>	6	4	3	8	10	3	8	

Ag : Agressif ; M : Modéré ; PAg : Pas agressif ; A : Absence ; P : Présence ; Les échantillons contaminés par *Pseudomonas* sont en rouge.

L'essentiel de ces données est résumé dans le graphe suivant dans le but de visualiser l'évolution de la contamination à travers les étapes du traitement tous circuits confondus.

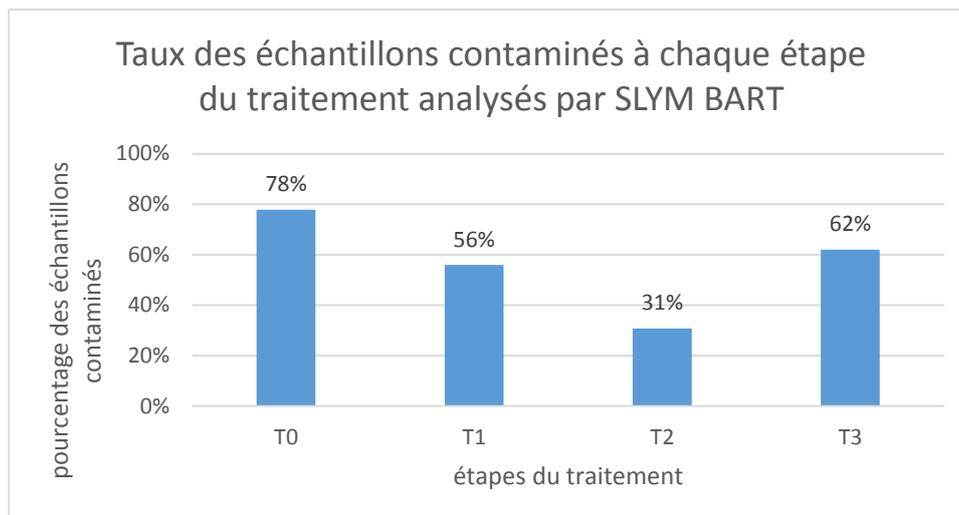


Figure 17 : Taux des échantillons contaminés à chaque étape du traitement analysés par SLYM BART.

Les observations tirées et les conclusions liées à chaque point sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Observations et conclusions tirées des résultats de l'analyse par SLYM BART.

Observations	Conclusions
<ul style="list-style-type: none"> Seulement 5 circuits des 13 qui ont été traités contenaient un biofilm. 	<ul style="list-style-type: none"> La contamination rapportée dans les échantillons n'est donc pas entièrement causée par le biofilm.
<ul style="list-style-type: none"> Seulement 4 des 5 circuits contenant un biofilm ont été efficacement désinfectés. 	<ul style="list-style-type: none"> La désinfection n'a pas été efficace.
<ul style="list-style-type: none"> Dans 7 cas sur 10, la présence de <i>Pseudomonas</i> n'était pas due au biofilm. 	<ul style="list-style-type: none"> L'eau de rinçage est incriminée.
<ul style="list-style-type: none"> Dans 2 cas sur 5, le biofilm n'était pas composé de <i>Pseudomonas</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> La présence de <i>Pseudomonas</i> n'est pas à elle seule un facteur déterminant de la formation du biofilm.
<ul style="list-style-type: none"> L'agressivité du biofilm dans 4 cas sur 5 était modérée. 	<ul style="list-style-type: none"> Leur traitement n'était donc pas nécessairement imposé.

Dans l'ensemble, cette unité de production ne semble pas souffrir d'une importante contamination au biofilm dans ses circuits puisqu'un seul circuit sur les 13 circuits traités montre un taux d'agressivité conséquent. Toutefois, une importante contamination de l'eau d'arrivée est notée et il est impératif d'y remédier.

Ceci dit, les résultats ne sont pas concluants à 100% car des incohérences et un manque d'informations sur le bilan d'analyse ainsi que les circonstances de l'application du traitement remettent en cause leur significativité.

II.4.3. Moyens d'analyse conventionnelle

II.4.3.1. Matériel et méthode

II.4.3.1.1. Matériel

Le matériel nécessaire pour la réalisation de cette étude est le suivant :

Tableau 16 : Matériel de laboratoire.

Matériel	
Matériel lourd	Petit matériel
<ul style="list-style-type: none">• Vortex.• Etuve à 37°C.• Autoclave.• Bec bunsen.• Microscope optique.	<ul style="list-style-type: none">• Flacons et fioles.• Pipettes et portoirs.• Anse de platine.• Pipettes pasteur.• Lames de microscope et porte lames.• Boîtes de pétri stériles.• Tubes stériles.

Les milieux de culture, réactifs et solutions utilisées sont les suivants :

Tableau 17 : Milieux de culture, réactifs et solutions.

Milieux de culture	Réactifs	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> • Bouillon B.H.I.B • Gélose nutritive • Gélose Hektoen • Gélose Chapman • Milieu de conservation • Gélose TSI • Bouillon nitrate • Galeries Api Staph et 20E 	<ul style="list-style-type: none"> • N1 et N2 • Kovacs • VP1 et VP2 • TDA • Bandelettes oxydase 	<ul style="list-style-type: none"> • Violet de gentiane • Alcool • Fushine • Lugol • Eau distillée • Eau oxygénée • Huile à immersion • Huile de vaseline

II.4.3.1.2. Méthode

Le protocole suivi consiste à pré-enrichir les échantillons prélevés lors du traitement, à les isoler en les cultivant sur le milieu de culture adéquat en se basant sur leur coloration de Gram. Puis à les identifier grâce à des tests biochimiques.

Ce protocole est représenté par le schéma suivant :

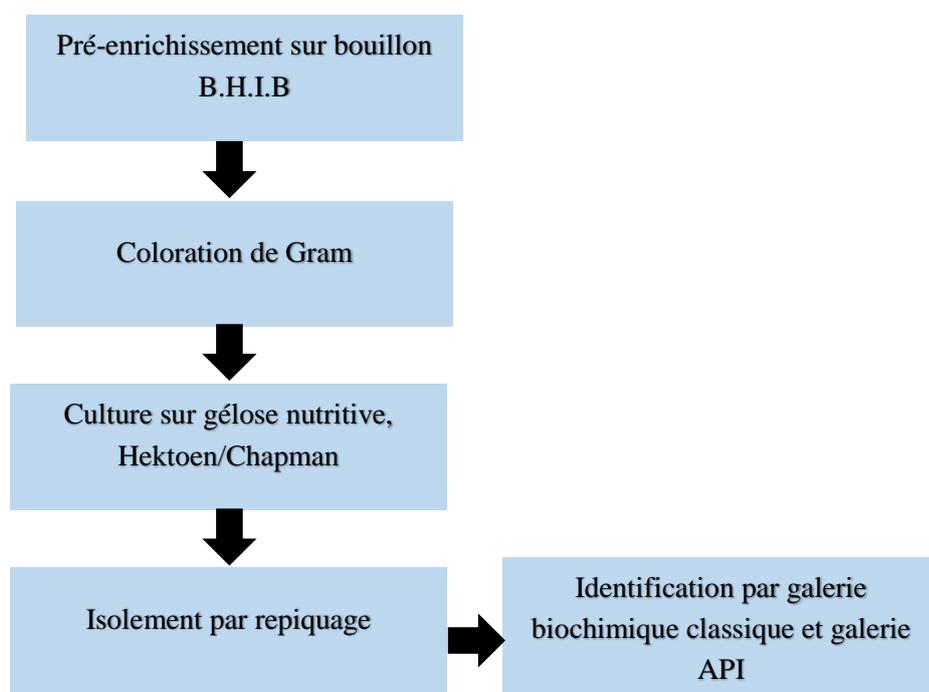


Figure 18 : Protocole d'identification des bactéries (Diagramme personnel).

a. Méthode de l'isolement :

Dans des conditions d'asepsie et après avoir préparé le matériel nécessaire, un millilitre de chaque échantillon est inoculé dans 9 ml de bouillon B.H.I.B pour permettre à toutes les bactéries de croître, y compris les plus exigeantes. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures en vue de réaliser un examen visuel pour détecter tout éventuel changement d'aspect (Figure 19).

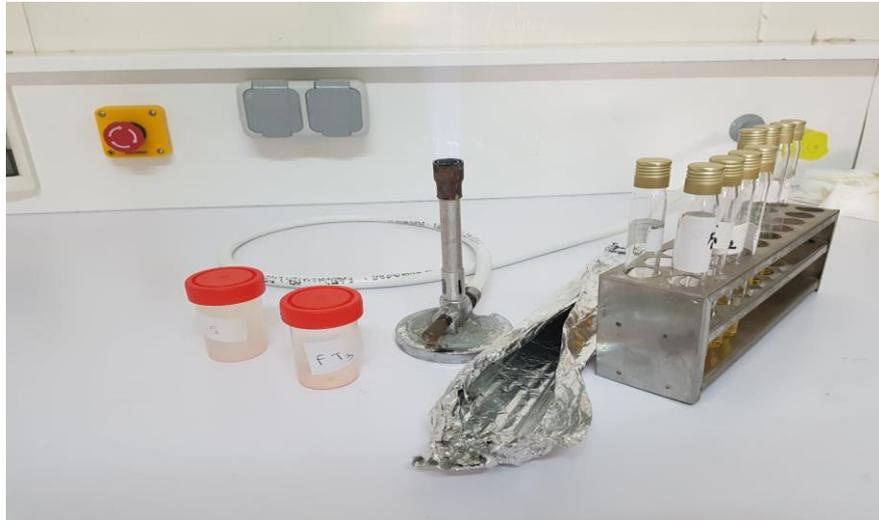


Figure 19 : Enrichissement des prélèvements dans le bouillon BHIB (photo personnelle).

Par la suite, un frottis de chaque prélèvement est réalisé sur des lames de microscope préalablement marquées, et ce, afin de réaliser une coloration de Gram (Figure 20 : Coloration de Gram). Puis, ces lames sont visualisées au microscope optique, agrandissement x100 avec huile à immersion (Figure 21).

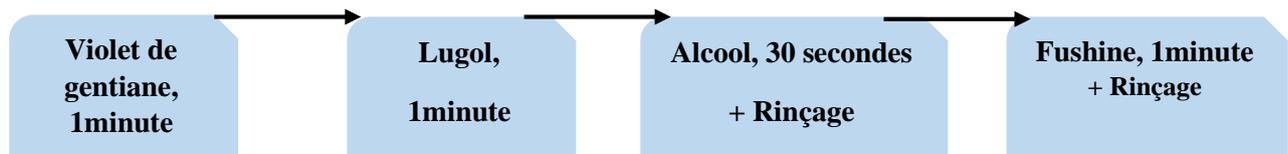


Figure 20 : Coloration de Gram.



Figure 21 : Lecture des lames de coloration Gram au microscope optique *100 (photo personnelle).

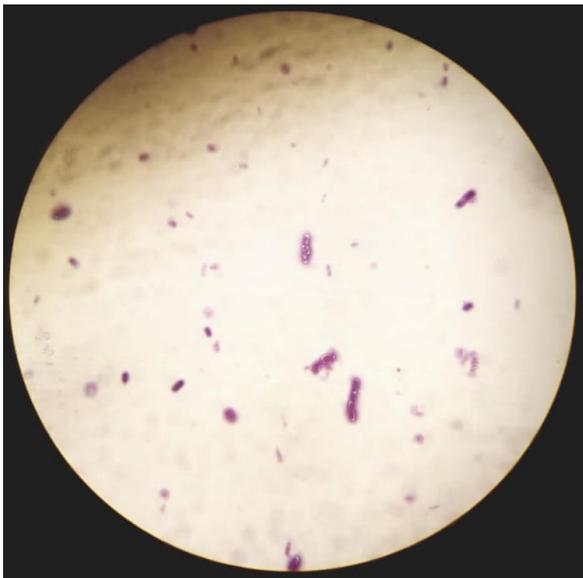


Figure 22 : Gram + (photo personnelle).

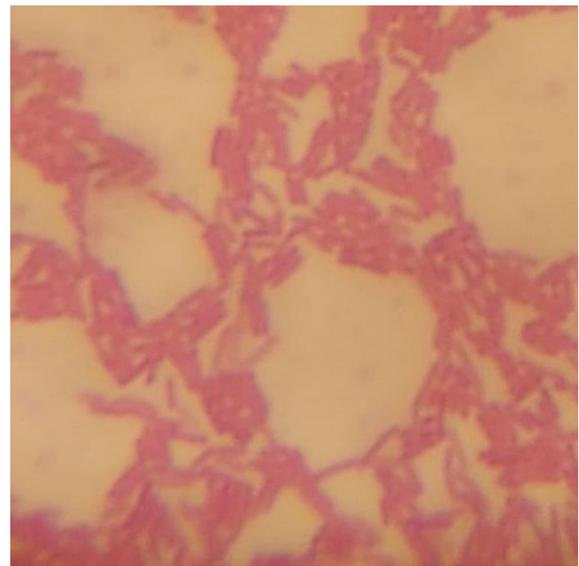


Figure 23 : Gram – (photo personnelle).

Suivant le résultat de la coloration de Gram (Figure 22), les inocula bactériens issus des échantillons sont ensemencés sur les milieux de culture appropriés. S'ils sont purement Gram +, ils sont ensemencés sur le milieu Chapman, s'ils sont purement Gram –, ils sont ensemencés sur milieu Hektoen, et si les deux cas sont présents l'ensemencement se fait sur les deux géloses. Dans tous les cas de figures, un ensemencement sur gélose nutritive est toujours réalisé pour permettre la croissance des bactéries usuelles.

Cette ensemencement est réalisé comme suit : à l'aide de l'anse de platine, une boîte de Pétri préalablement marquées et contenant le milieu de culture solidifié est sélectionnée puis

ensemencée en effectuant des stries à partir du bouillon d'enrichissement (Figure 24). Les boîtes de Pétri contenant l'inoculum sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C.



Figure 24 : Ensemencement sur milieux de culture (photo personnelle).

Afin de purifier les souches bactériennes, 3 ou 4 colonies isolées sont repiquées et réensemencées sur le même milieu de culture où elles ont poussé. Enfin, elles sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

b. Méthode de l'identification :

Après avoir purifié les bactéries, les bactéries sont identifiées. Pour cela, des tests biochimiques sont réalisés et la somme des résultats obtenus définit l'espèce bactérienne isolée.

Les tests biochimiques réalisés se divisent en deux catégories. La première catégorie regroupe les tests réalisés individuellement tels que le test de la nitrate réductase, le milieu TSI, le test de l'oxydase et celui de la catalase tandis que la seconde catégorie est celle des galeries Api . Ces dernières représentent un kit rassemblant plusieurs tubules contenant des milieux déshydratés qui sont dissouts lors de l'introduction de la suspension bactérienne.

- Test de la nitrate réductase : 5 colonies de souches pures sont ensemencées dans 9 ml de milieu nitrate puis 1 à 2 gouttes de réactif N1 puis N2 sont rajoutées afin d'observer le changement de couleur (Figure 25).

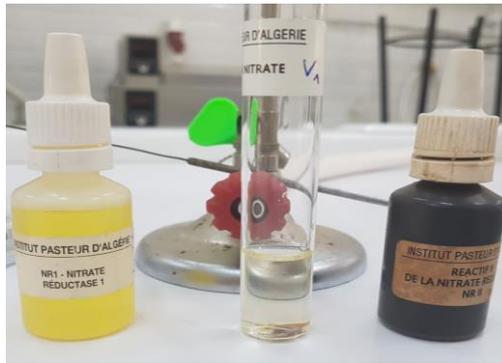


Figure 25 : Test de la nitrate réductase (photo personnelle).

- Test TSI : ce test consiste à introduire une colonie bien isolée d'une souche pure en une seule strie profonde dans le milieu gélosé puis de réaliser des stries serrées sur la surface en contact avec l'air (Figure 26).

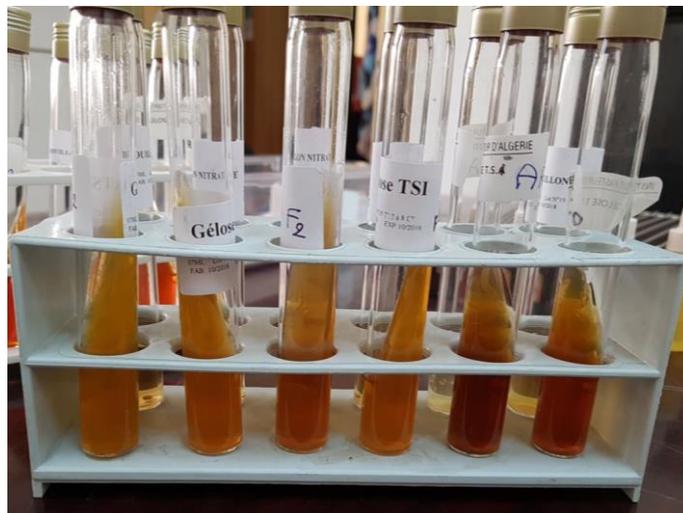


Figure 26 : Test TSI (photo personnelle).

- Test de l'oxydase : Après avoir déposé 1 à 2 colonies pures sur le disque imprégné du réactif oxydase, le changement de couleur est observé (Figure 27).



Figure 27 : Test de l'oxydase (photo personnelle).

- Test de la catalase : A l'aide d'une **pipette Pasteur**, déposer une colonie isolée sur une lame de microscope préalablement flambée et égoutter quelques gouttes d'eau oxygénée par dessus. Puis, observer l'apparition d'une effervescence ou non (Figure 28).



Figure 28 : Test de la catalase (photo personnelle).

- Galerie Api E20 : humidifier les creux du support de la galerie puis la déposer. Prélever 1 colonie pure du milieu de culture et l'inoculer dans 5 ml d'eau distillée, puis introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette pasteur. Remplir les cupules selon les instructions à moitié ou en entier. Et recouvrir d'huile de paraffine ou rajouter une goutte du réactif là où c'est désigné (Figure 29).



Figure 29 : Galerie Api E20 et les réactifs nécessaires (photo personnelle).

- Galerie Api Staph : Procéder de la même manière que pour l'Api E20, sauf que lors de l'inoculation on inocule 4 à 5 colonies isolées dans 5 ml de milieu de culture qui accompagne le kit (Figure 30).



Figure 30 : Milieu d’ensemencement accompagnant la galerie Api Staph (photo personnelle).

Mettre le couvercle et incuber le tout à 37°C pendant 24 heures (Figure 31).



Figure 31 : Incubation des galeries Api et des milieux de culture (Photo personnelle).

L’interprétation des résultats de ces tests se lisent de la manière décrite dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Lecture des milieux de culture et des tests d’identification biochimique.

Test	Objectif	Lecture
Coloration de Gram	Classifier les bactéries selon la composition et l’épaisseur de la paroi, leur forme et leur disposition.	<u>Couleur</u> : violet (Gram +), rose (Gram -). <u>Forme</u> : coque, bacille. <u>Disposition</u> : diplocoques, chaînette, grappe etc...
Milieu Chapman	Culture des bactéries halophiles, essentiellement les Gram + tel	<u>Pousse</u> : halophile. <u>Coloration</u> :

	<p><i>Staphylocoques</i> mais aussi <i>Micrococcus, Enterococcus,</i> <i>Bacillus</i> et quelques bactéries Gram -.</p>	<p>Rouge (mannitol -). Jaune (mannitol +).</p>
Milieu Hektoen	<p>Isolement de salmonelle et shigella et autres bactéries Gram -.</p>	<p><u>Coloration du milieu :</u> Saumon (dégradation de sucres). Noir (production d'H₂S). Bleu (libération de pigments). <u>Coloration des colonies :</u> Colonies saumon : <i>Escherichia,</i> <i>Levinea, Citrobacter diversus,</i> <i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia,</i> <i>Yersinia.</i> Colonies saumon à centre noir : <i>Citrobacter freundii, Proteus vulgaris.</i> Colonies bleu-vert à centre noir : Suspicion de <i>Salmonella</i>, à différencier de <i>Proteus mirabilis.</i> Colonies bleu-vert ou vertes : Suspicion de <i>Shigella, Salmonella</i> ou <i>Pseudomonas.</i></p>
Nitrate réductase	<p>Recherche la production d'une enzyme : la nitrate-réductase par la bactérie.</p>	<p><u>Coloration après le premier réactif :</u> Rouge (NR+). Incolore (appliquer le second réactif). <u>Coloration après le second réactif :</u> Rouge (NR-). Incolore (NR+).</p>
TSI	<p>Déterminer la capacité d'une bactérie à fermenter le glucose, lactose, et le sucrose, ainsi que la production de sulfure d'hydrogène.</p>	<p><u>Coloration :</u> Jaune (fermentation+) bactérie anaérobie. Rouge (fermentation-) : bactérie aérobie. Noir (H₂S +).</p>

Oxydase	Permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Il est à la base de l'identification des bactéries Gram -.	Coloration : Rose/Violet (oxydase+). Incolore (oxydase-).
Catalase	Recherche de la catalase.	Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène (catalase +). Pas de bulles (catalase -).
Galerie Api	Mettre en évidence un nombre important de critères biochimiques.	Se référer au manuel d'utilisation (Figure 32).



Figure 32 : Manuel d'utilisation des galeries Api (photo personnelle).

II.4.3.2. Résultats :

Les résultats de l'examen microbiologique sont synthétisés par circuit et par étape de traitement dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Résultats des échantillons analysés par la méthode conventionnelle.

Circuit	T0	T1	T2	T3	Nombre d'échantillons	Biofilm	Désinfection
A	I	I	P	P	4	P	A
B	A	P	P	A	4	P	P
C	/	I	A	A	3	A	P
D	I	A	I	A	4	A	P
E	I	I	A	A	4	A	P
F	I	I	I	A	4	P	P
G	I	A	A	A	4	A	P
H	A	A	A	A	4	A	P
I	P	I	P	A	4	P	P
J	A	A	A	P	4	A	A
K	A	P	A	A	4	A	P
M	/	A	P	I	3	P	A
total	10	12	12	12	46	12	12
Contaminés	6	7	6	3	22	5	3
%	60%	58%	42%	25%	48%	41%	25%

A : Absence ; P : Présence ; I : identifié.

Sur les 12 circuits examinés, 5 présentent une contamination au biofilm. Dont 2 restent contaminés à la fin du traitement.

Les taux d'échantillons contaminés à chaque étape sont représentés dans le graphe suivant :

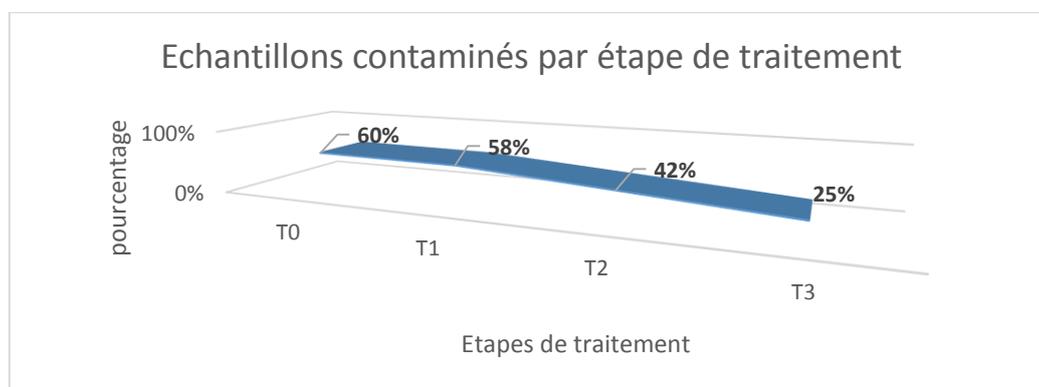


Figure 33 : Taux d'échantillons contaminés à chaque étape analysés par la méthode conventionnelle.

Ce graphe démontre un important nombre d'échantillons contaminés en début de traitement, T0 et T1. Puis, ce nombre décroît au fur et à mesure jusqu'en T2 mais ne disparaît pas totalement en T3.

Sur les 22 échantillons contaminés, 13 sont passés à l'étape de l'identification. Les milieux de culture sur lesquels ils avaient poussé auparavant et la galerie avec laquelle ils sont identifiés sont notés dans le tableau suivant :

Tableau 20 : Résultats de l'isolement.

ECHANTILLON	CULTURE	REPIQUAGE	GRAM	API
A0	CHAPMAN/GN	GN	POLY +	STAPH
A1	CHAPMAN/GN	GN	POLY +	STAPH, E20
C1	CHAPMAN/GN	GN	POLY +	STAPH, E20
D0	HEKTOEN/GN	GN	B -/ B+	STAPH, E20
D2	HEKTOEN/GN	HEKTOEN/GN	B-/B+	STAPH, E20
E0	HEKTOEN/GN	HEKTOEN/GN	POLY +	STAPH, E20
E1	GN	GN	B+	STAPH
F0	HEKTOEN/GN	HEKTOEN/GN	POLY +	STAPH, E20
F1	GN	GN	POLY +	STAPH
F2	GN	GN	B+	STAPH
G0	HEKTOEN/GN	HEKTOEN/GN	B + -	STAPH, E20
I1	HEKTOEN/GN	HEKTOEN	B +	STAPH, E20
M3	CHAPMAN/GN	GN	/	STAPH, E20

GN : gélose nutritive ; POLY : poly microbien ; B : Bacille ; + : Gram + ; - : Gram - .

Sur les 13 échantillons identifiés, 21 identifications ont été réalisées car certains échantillons sont polymicrobiens.



Figure 34 : 2 tests d'identification biochimique sur galerie Api pour un échantillon polymicrobien (photo personnelle).

Les résultats de l'identification par échantillon et par test sont visibles dans le tableau 21.

Tableau 21 : Résultats de l'identification biochimique.

Echantillons	catalase	Oxydase	Nitrate réductase	TSI	Galerie API	
					STAPH	E20
A0	+	/	-	-	<i>S. haemolyticus</i>	
A1	+	-	-	-	<i>S. saprophyticus</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
C1	-	/	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens / putida</i>
D0	+	+	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria 1</i>
D2	+	+	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens / putida</i>
E0	+	-	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
E1	+	/	-	-	<i>S. lentus</i>	
F0	+	-	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens / putida</i>
F1	+	/	-	-	<i>S. haemolyticus</i>	

F2	+	/	-	-	<i>S. saprophyticus</i>	
G0	+	+	-	-	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
I1	/	+	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
M3	+	+	-	-	<i>S. xylosus</i>	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria 1</i>

Les espèces bactériennes rencontrées sont :

- *Staphylococcus spp.* : *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. lentus*, *S. haemolyticus*.
- *Pseudomonas spp.* : *P. fluorescens*, *P. oryzihabitans*, *P. aeruginosa*.
- *Autres* : *Aeromonas hydrophila/Cavia/ Sobria1*, *Micrococcus*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Ces mêmes résultats sont réunis dans le tableau suivant par espèce bactérienne et par étape de traitement.

Tableau 22 : Synthèse des résultats de l'identification biochimique.

Bactéries	T0	T1	T2	T3	total
<i>Staphylococcus spp.</i>	4	5	2	1	12
<i>Pseudomonas spp.</i>	3	2	1	0	6
Autres	1	1	0	1	3
Total	8	8	3	2	21

Il en est déduit qu'il y'a plus d'échantillons contaminés par *Staphylocoques* (57%) que par *Pseudomonas* (29%). Les autres bactéries sont minoritaires (14%).

Ceci est également confirmé par le graphe suivant :

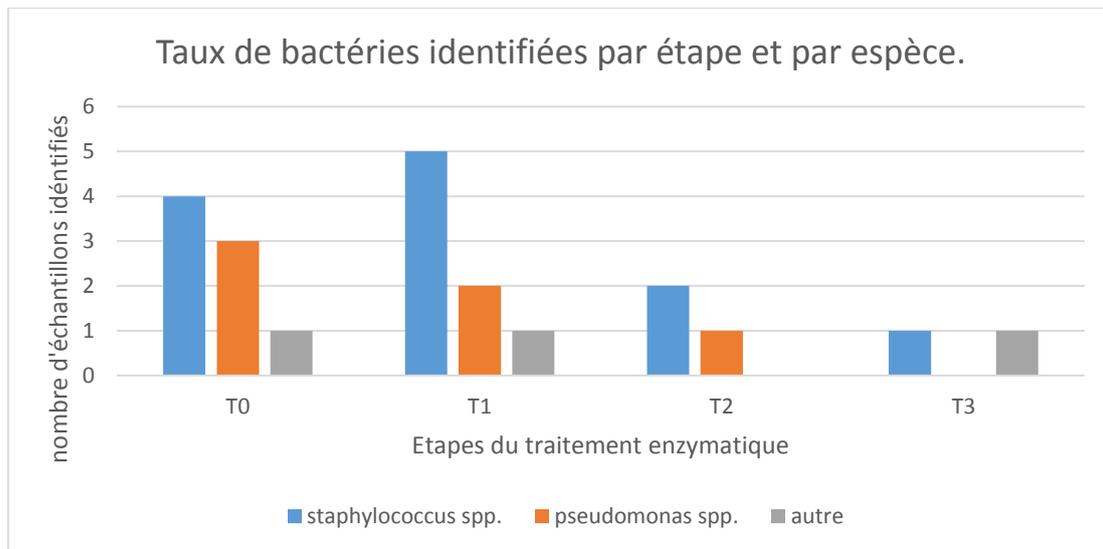


Figure 35 : Taux de bactéries identifiées par étape et par espèce.

En termes de pathogénicité, toutes les bactéries ne sont pas égales. Dans leurs espèces respectives, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont considérés comme étant les plus pathogènes. Parmi les échantillons prélevés et identifiés par la présente méthode, un seul cas sur 6 comportait la présence de *P. aeruginosa* et aucun cas sur 12 ne comportait de staphylocoques dorés.

Les conclusions concernant le traitement enzymatique évalué par cette méthode rejoignent ceux de la méthode précédente, la majorité des circuits sont considérés indemnes de biofilms, et la qualité microbiologique de l'eau d'arrivée doit être contrôlée.

II.4.3. Comparaison entre les résultats des deux méthodes

Afin de comparer les résultats obtenus par les deux méthodes pour un même échantillon, le procédé suivant a été appliqué :

Les résultats des échantillons communs aux deux méthodes sont superposés, puis les cases qui présentaient des résultats similaires sont colorés en jaune, les résultats différents en rouge et les échantillons non communs en gris.

Le résultat « présence » de bactérie pour la méthode conventionnelle est assimilé à tous les résultats supérieurs à 0 pour la méthode BART.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Comparaison entre les résultats obtenus par les deux méthodes d'analyse.

Circuits	T0	T1	T2	T3
A	/	/	<20	<20
B	500	13000	13000	0
C	/	/	13000	0
D	67000	0	<20	2500
E	<20	67000	0	67000
F	67000	<20	<20	67000
G	67000	<20	<20	67000
H	67000	67000	0	67000
I	/	/	13000	0
J	67000	0	0	67000
K	67000	67000	0	67000
L	0	444000	444000	444000
M	/	/	13000	0

Sur 38 échantillons communs, 16 montrent des résultats différents. Dont 13 de manière significative : 67000 UFC/ml contre absence de bactéries.

De ce fait, il y a 34% résultats positifs supplémentaires avec le biodétecteur BART qu'avec une méthode conventionnelle.

Les caractéristiques des deux méthodes sont comparées dans le tableau suivant :

Tableau 24 : Comparaison entre la méthode d'analyse BART et la méthode conventionnelle.

Caractéristiques	Méthode BART	Méthode conventionnelle
Temps de lecture	+	+
Temps de travail	-	+++
Sensibilité	+	-
Identification bactérienne	-	+
Risque de contamination	-	++
Facilité d'utilisation	+++	-
Coût	+++	-

+ : ... ; ++ : ... ; +++ : ... ; - : ...

II.5. Discussion

II.5.1. Méthode BART

Les résultats obtenus par la méthode BART montrent plus de résultats positifs (34%) que la méthode d'analyse conventionnelle. Sachant que les biodétecteurs BART comportent moins de risques de contamination, les résultats de leur analyse sont pris pour références.

Lors de l'application du traitement, les circuits furent séparés en trois groupes. Dix mois séparent le traitement du groupe 1 et 2 alors que deux mois séparent le traitement du groupe 2 et 3.

Le premier groupe comporte les circuits suivant : A, B, C, I et M. L'analyse de leurs résultats montre une hausse bactériologique en T2 et l'absence de germes en T3. La conclusion tirée de cette première application est que les circuits diagnostiqués contaminés par un biofilm, en l'occurrence les circuits B, C, I et M ont été bien désinfectés et le biofilm éliminé. Le traitement est donc efficace.

Concernant les résultats du groupe 2 qui englobe les circuits D, E, F, G, H et J, une importante population bactérienne est présente dans les prélèvements en T0 et T3. Nous suspectons alors que l'eau de rinçage est de mauvaise qualité microbiologique et qu'elle contient des *Pseudomonas*. Concernant les prélèvements en T2, 4 cas sur 7 sont exempts de germes et 3 présentent un taux très bas de <20 UFC/ml. Deux hypothèses se présentent : la première consiste en l'absence de biofilms dans les circuits et la seconde en leur présence mais sans détachement. La première hypothèse trouve appui dans la conformation des cuves traitées de forme cylindrique, dépourvues de zones difficiles d'accès et faites d'acier inoxydable. Ainsi, elles réunissent toutes les conditions recommandées pour prévenir la formation du biofilm. Cependant, cette explication n'est pas forcément applicable, puisque le circuit I du premier groupe présente les mêmes caractéristiques mais est tout de même diagnostiqué contaminé par le biofilm. Ce qui nous emmène à la 2^{ème} hypothèse où nous suggérons que le non détachement du biofilm peut être dû à la non action des enzymes.

Suite à l'élaboration de ces analyses, des recherches supplémentaires ont montré que l'eau de rinçage était effectivement de mauvaise qualité microbiologique et il a été recommandé à la société d'y remédier. Lorsque le problème a été résolu, le troisième groupe composé d'un seul circuit qui n'est autre que le circuit L fut traité. Les résultats obtenus suggèrent la présence d'un biofilm très agressif à raison de 444000 UFC/ml en T1 et T2, mais ce nombre reste constant après la désinfection, ce qui remet en question l'efficacité de cette dernière vu qu'aucune réduction n'a été décelée, pas même minime.

Les résultats inexplicables du groupe 2 et 3 sont considérés comme aléatoires par les membres de la société prestataire, qui recommande par ailleurs une désinfection de choc pour tous les circuits

II.5.2. Bulletin d'analyse du laboratoire externe

Certes, les résultats font preuve d'incohérences. Mais est-ce uniquement dû aux circonstances de l'application du traitement. C'est-à-dire la marge de temps entre les différents groupes traités, la contamination de l'eau de rinçage et la conformation des circuits ? le laboratoire d'analyse a-t-il un impact sur les résultats obtenus puisque des incohérences sont relevés sur leur bulletin d'analyse ?

Pour commencer, l'échantillon G à T0 montrait une population bactérienne de 67000 UFC/ml selon le bulletin, mais la conclusion rattachée désignait « modéré » au lieu de « agressif ». Ensuite, la turbidité du milieu affichée ne correspond pas à l'aspect visible à l'œil nu dans plusieurs échantillons. Ceci est un problème très fréquent car le réglage des appareils de mesure de la turbidité en bactériologie est très compliqué, il dépend de la taille des bactéries en suspens, de la couleur de la solution, des capacités de l'appareil, de la méthode suivie et de l'homogénéisation à chaque étape. Autant de conditions à remplir pour avoir des résultats fiables. Ceci dit, les résultats observés démontrent des incohérences qui remettent en cause l'utilité ou la fiabilité d'utiliser une telle technique dans la lecture des biodétecteurs BART (UPBM.ORG).

L'autre observation relevée est la suivante : puisque tous les échantillons troubles présentent une population de 13000 UFC/ml et que les résidus montrent une population moindre, pourquoi dans l'échantillon I T2 la population est à 13000UFC/ml avec un aspect de résidus ?

Enfin, la dernière remarque à souligner est la désignation du nom du milieu de culture. Selon le bulletin d'analyse la méthode utilisée pour la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* est référencié ISO16266, et selon cette méthode le milieu indiqué est le cétrémide alors que sur le bulletin il est mentionné céramide.

II.5.3. Méthode d'analyse conventionnelle

Concernant les résultats obtenus par la méthode conventionnelle, certains prélèvements étaient des faux négatifs (en se référant aux résultats de la méthode BART), cela peut être expliqué par un manque de sensibilité de la méthode, du choix des milieux ou des erreurs de manipulation.

Ensuite, les lectures des lames de microscope après coloration de Gram ne concordent pas tous avec les bactéries identifiées ; les bactéries Gram – n'apparaissant pas toujours au microscope. Cela peut avoir pour origine une mégarde d'observation ou la dominance des bactéries à Gram +.

Parmi les échantillons identifiés du genre *Staphylococcus*, l'espèce *S. xylosus* est celle qui revient le plus souvent. C'est une bactérie commensale et ubiquitaire souvent présente dans les industries du lait et ses dérivés (FRISONI, 2007). L'espèce *S. aureus* n'est quant à elle pas identifiée.

Concernant le genre *Pseudomonas*, l'identification par les galeries Api assimile quatre prélèvements à *P. fluorescens*, un à *P. oryzihabitans* et un à *P. aeruginosa* alors que selon les résultats du laboratoire externe après repiquage sur milieu sélectif, tous les prélèvements correspondent à *P. aeruginosa*. Cette différence peut être expliquée par la diversité des nombreux tests biochimiques disponibles dans la galerie Api qui permettent de mieux cerner l'espèce isolée.

La couleur de la fluorescence sur milieu BART peut également indiquer l'espèce dominante, mais ce critère n'as pas été communiqué dans le bulletin d'analyse. Cette donnée peut permettre d'estimer la gravité de la contamination car chaque bactérie a un degré de pathogénicité différent.

Conclusion et recommandations

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'efficacité d'un traitement enzymatique dans la lutte contre le biofilm bactérien dans une unité de production de glace. Cette évaluation s'est faite par deux méthodes différentes, les biodétecteurs BART et les milieux de culture avec des galeries d'identification Api.

Les résultats obtenus par la méthode BART montrent que sur 13 circuits traités, 5 comportent un biofilm dont l'un d'eux n'as pas été efficacement désinfecté, et 8 seraient exempts de biofilm. Pour la méthode conventionnelle, 60% de ces résultats sont concordants, mais la différence serait attribuée à la sensibilité de la méthode ou à la manipulation.

Pour conclure ce travail, il serait approprié de dire que le traitement enzymatique peut être efficace s'il est correctement appliqué dans de bonnes conditions, et que la méthode d'évaluation par les biodétecteurs BART est avantageuse et adaptée, mais qu'elle doit être suivie par des tests de confirmation.

En ce qui concerne l'unité de production de glace, les résultats sont pour la plupart incohérents et non concluants. Il est recommandé de refaire une bonne désinfection dans tous les circuits avec un procédé fiable et de continuer à veiller à la qualité microbiologique de l'eau utilisée. Il serait par ailleurs intéressant de cibler les circuits à traiter en diagnostiquant la présence de biofilm par les différentes techniques possibles.

Il est également recommandé à la société prestataire d'ajouter une étape au protocole qui consisterait à analyser l'eau d'arrivée par la même méthode prévue pour l'évaluation du traitement avant de commencer ce dernier, et ce dans le but de ne pas troubler les résultats obtenus par la suite. Il est également recommandé d'appliquer le traitement dans une faible marge de temps afin que les conditions environnantes soient les mêmes et n'interfèrent pas dans la lecture des résultats.

Quant au laboratoire d'analyse externe, ils sont invités à repenser la rédaction du bulletin d'analyse, afin de communiquer plus d'information sur les changements d'aspect du biodétecteur BART et ainsi optimiser son utilisation. Pour ce qui est de la turbidité, les résultats fournis par l'appareil de mesure ne sont pas toujours cohérents et risquent d'induire en erreur, c'est pourquoi il est conseillé de l'utiliser avec précaution pour ne pas nuire à la lecture de l'analyse.

Perspectives de recherche

Le travail réalisé pourrait être complété par d'autres recherches telles que :

- Une enquête sur l'étendue de l'application du traitement enzymatique dans les entreprises agro-alimentaires en Algérie et sur les résultats de son application à long terme.
- Le mode d'action des biodétecteurs BART et la corrélation entre l'opacité du milieu et l'importance de la population bactérienne.
- L'utilité des appareils de mesure de la densité dans la lecture des biodétecteurs BART.

Bibliographie

- **ALVAREZ-ORDONEZ A., BRIANDET R., 2017.** Biofilms from a Food Microbiology Perspective: Structures, Functions and Control Strategies. *Frontiers Media SA*, 9-10.
- **BOURION F., 2000.** Les biofilms dans les bio-industries, 2^{ème} édition, ASEPT editeur, 5-85.
- **BRANGER A., 2007.** Microbiochimie et alimentation, Educagri Editions, 131-144.
- **BRIAN-JAISSON F., 2014.** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse pour obtenir le grade de docteur en aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, école doctorale mer et science.
- **COSTERTON J W. GEESEV G G & CHENG K-J, 1978.** How bacteria stick. *Sci. Amer.* 238:86-95.
- **MEDEIROS AC., 2016.** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Mécanique des fluides. Thèse de doctorat à l'université Grenoble Alpes. Français.
- **DORDET-FRISONI E., 2007.** *Staphylococcus xylosus* : Cartographie du génome et diversité génétique. Thèse de doctorat à l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé.
- **DROYCON BIO CONCEPT, 2004.** Biological Activity Reaction Test BART™ User Manual.
- **HACH, 2016.** Hydraulic Fracturing Water Analysis Handbook.
- **HENDERSON J., 2016.** Biofilms: Characterization, Applications and Recent Advances. Nova Science Publishers.
- **LEBEAUX D., GHIGO JM., 2012.** Infections associées aux biofilms. Médecine/science.
- **LEWANDOWSKI Z., BEYENAL-HALUK H., 2013.** Fundamentals of Biofilm Research, Second Edition.
- **TREMBLAY Y.D.N., HATHROUBI S., JACQUES M., 2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique, article du Canadian Journal of Veterinary Research; 78(2): 110–116.
- **VALDES J., 2000.** Bioremediation. Springer science and business media.

Sites internet sur les biofilms

- Université du Montana. Center for biofilm engineering :
 - <http://www.biofilm.montana.edu/>
- ENS de Lyon. Ressources en Sciences de la Vie et Sciences de la Terre :
 - <http://perso.ens-lyon.fr/romain.berardozzi/index.php>
- US National Library of Medicine :
 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>
 - <http://communitypharmacymd.com/2013/05/31/lyme-resistance-and-biofilms/>
- SANSONETTI P. cours 1 et 2, Collège de France :
 - <http://amgar.blog.processalimentaire.com/microbiologie-alimentaire/le-quorum-sensing-et-la-communication-des-bacteries/>
 - <https://www.college-de-france.fr/site/philippe-sansonetti/course-2010-01-14-16h00.htm>
 - <https://www.college-de-france.fr/site/philippe-sansonetti/course-2009-12-10-16h00.htm>
- A technology for the investigation of biofilm transmission under shearing pressures :
 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5658607/>
- Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth :
 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374658/?page=1>
- KJELLEBERG S., GIVSKOV M. :
 - The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations (book) :
https://books.google.dz/books?id=bH85iSQatPcC&pg=PT12&lpq=PT12&dq=Heukelekian+H,+Heller+A,+1940.+J.+Bacteriol.,40:547-558&source=bl&ots=tAQmQWhCnh&sig=ACfU3U3Cav2QtA15NzTdnQ5Hlxj1Ft3lJw&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjP0d_HjfPhAhUT8uAKHV8YCIQM6AEwA3oECAgQAQ#v=onepage&q=Heukelekian%20H%2C%20Heller%20A.%201940.%20J.%20Bacteriol.%2C40%3A547-558&f=false
- ZOBELL C. :
 - Bacterial Utilization of Low Concentrations of Organic Matter :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373777/?page=1>
 - The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373789/>
- Biofilms and Veterinary Medicine :
 - https://books.google.dz/books?id=OgkWyzaZyQgC&pg=PA65&lpq=PA65&dq=Heukelekian+H,+Heller+A,+1940.+J.+Bacteriol.,40:547-558&source=bl&ots=uiYGIXUyZa&sig=ACfU3U1aiJx6RAX10CgQP6v1H4nrDkifig&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjP0d_HjfPhAhUT8uAKHV8YCIQM6AEwAnoECAkQAQ#v=onepage&q=Heukelekian%20H%2C%20Heller%20A.%201940.%20J.%20Bacteriol.%2C40%3A547-558&f=false
- BRIAN-JAISSON F. :
 - https://www.researchgate.net/figure/Les-six-etapes-de-la-formation-dun-biofilm-Characklis-1990_fig1_278645960
- KEOWN B. :

- Ministère agriculture ontario. Le Biofilm :

<http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/goat/news/dgg1308a3.htm>

- FERGUSON BJ, STOLZ :
Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16270598>
- MASSOL-DEYA :
 - Channel structure in aerobic biofilms of fixed film reactors treating contaminated groundwater :
https://www.researchgate.net/publication/15623731_Channel_structure_in_aerobic_biofilms_of_fixed_film_reactors_treating_contaminated_groundwater
- MARSHALL K. :
 - Microbial adhesion in biotechnological processes :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166994900329?via%3DIuhb>
- HOSMIN A., JANICE L. :
 - Changing characteristics of aging biofilms :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483059290062S>
- BROWN M.R.W., GILBERT P. :
 - Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents :
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1993.tb04345.x>
- Spectrophotométrie des suspensions bactériennes:
 - <https://upbm.org/index.php/site-association/vie-associative/cela-fait-debat/305-spectrophotometrie-des-suspensions-bacteriennes?fbclid=IwAR2vKlcmY9z9eP82vXy42QgMXn4QNKag4vvjzIYRWIcQ9JHieNsVUuGuxls>
- Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Pseudomonas spp. :
 - <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/pseudomonas.html>
- DELORME L. ,2012. Biofilms : nouvelle approche dans la guérison des plaies :
https://www.oiiq.org/sites/default/files/uploads/pdf/l_ordre/ordres_regionaux/ORIIM/2012/biofilm_presentation_%20dr_Delorme_%2020120207.pdf
- FAO, :
<http://www.fao.org/3/y7867f/y7867f04.htm>
- JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N 24, 2017 :
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwiz4sn55bmAhWDsHEKHTgOA7oQFjABegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.commerce.gov.dz%2Ftelecharger%2Freglementation%2F796%2Farticle&usg=AOvVaw36As4XYhmZhiDqL6OJEo2j>

Résumé

Veiller à la salubrité des aliments passe par l'élimination des biofilms dans les unités de production agro-alimentaires. Cette étude est réalisée dans une société algérienne produisant des glaces comptant sur le traitement enzymatique pour lutter contre les biofilms. Afin d'évaluer l'efficacité de ce procédé, deux méthodes sont utilisées : les biodétecteurs BART et l'analyse microbiologique conventionnelle. Les résultats obtenus par les testeurs BART sont classés en deux groupes : l'un présente des résultats satisfaisants (31%) tandis que l'autre présente des résultats incohérents ne permettant pas de trancher sur l'efficacité du traitement. Quant aux résultats des analyses obtenus suite à l'utilisation de la méthode conventionnelle, ils présentent un taux de 34% de faux négatifs. Ainsi, le traitement enzymatique est efficace s'il est correctement appliqué. De plus, les biodétecteurs sont très sensibles mais doivent être utilisés de façon optimale et être confirmés par des tests supplémentaires.

Mots clés : Biofilm_ Enzyme_Slime_ Biodétecteur_ BART_ Agro-alimentaire_Glaces_Crèmes glacées_Alger.

Abstract

Eliminating biofilms in industry process is very important for food safety. This study has been done in an ice cream production unit in Algiers. It is about evaluating an enzymatic treatment efficiency to eliminate biofilms. Two ways are chosen to evaluate it: slyme BART testers and commun microbiological analysis method. Slyme BART testers results are divided into 2 groups: The first one is showing 31% of good results while the second one contains incoherent and non concluding results. Conventional microbiological analysis method showed 34% of false negative reactions. Enzymatic treatment is an efficiency one if used in good conditions. Furthermore, BART biodetectors are very sensitive tests but should be used in an optimal way and should be confirmed.

Key words : Biofilm_ Enzyme_Slyme_Biodetector_ BART_Food industry_Ice cream_Algers.

ملخص

مكافحة البيوفلم في مصانع الإنتاج مرحلة مهمة في المحافظة على صحة المنتوجات الغذائية. قامت هذه الدراسة بتقييم ازالة البيوفلم في مصنع انتاج المتلجات باستعمال الانزيمات. اعتمد التقييم على طريقتين، الكاشف بارت و التحليل الميكروبيولوجية التقليدية. كانت نتائج البارت ناجحة بنسبة 31% و الباقي غير قابل للاستغلال. اما الطريقة التقليدية ف 34% من النتائج سالبة مزيفة.

المعالجة بالانزيمات فعالة ان كانت اوضاع التجربة صحيحة، و الكاشف بارت جد حساس لكن يتطلب دراسة كاملة و تأكيد لنتائج.

الكلمات المفتاحية : بيوفلم_ انزيمات_ سلايم_ الكاشف بارت_ انتاج الأغذية_ المتلجات_ الجزائر العاصمة.