

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2018

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle. Aliane SAMIA

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Contribution à l'étude de la formation de biofilm par des
souches industrielles de *Streptococcus thermophilus***

Soutenu publiquement le Septembre 2018

Devant le Jury :

Président	DJIBAOUI R.	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	BENNAMA R.	Maitre de Conférences [B]	U. Mostaganem
Examineur	BELKACEMI L.	Maitre de Conférences [A]	U. Mostaganem

Remerciements

Mes premiers remerciements sont adressés à ma directrice de mémoire, **BENNAMA. R**, Maître de conférences au département de biologie, qui a consacré toute son expérience, son temps et ses capacités pour réaliser et mettre au point ce travail.

Je remercie spécialement, Mr. Djibaoui R. Professeur au département de biologie, pour avoir accepté de présider le jury et discuter ce travail.

Je remercie Madame BELKACEMI L. Maître de conférence à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Cette étude a été réalisée au cours d'un stage de quatre mois effectué au sein des laboratoires du département de la biologie au niveau de l'université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. Je remercie M^{me} DJAMAIA technicienne du laboratoire de biologie animale N°1, pour m'avoir reçue avec un grand cœur et de m'avoir encouragée, je vous présente mon respect le plus profond.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel travaillant au niveau des laboratoires du département de Biologie, pour leur aide.

Je profite aussi pour remercier particulièrement tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation pendant mon cursus universitaire.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance envers toutes celles et ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

Tables des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures	v
Introduction	01

Partie I : Revue bibliographique

I. Bactéries lactiques.....	04
1. Caractéristiques générales.....	04
2. Ecologie des bactéries lactiques	04
3. Aperçu taxonomique	06
4. Intérêt des bactéries lactiques	08
II. Genre de Streptococcus	09
1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	09
1.1. Principales activités métaboliques de <i>S.thermophilus</i>	10
1.1.1. Métabolisme des sucres.....	10
1.1.2. Métabolisme protéolytique.....	12
1.1.3. Métabolisme des acides aminés.....	12
1.1.4. Activité uréasique	12
1.1.5. Production des exopolysaccharides	13
1.1.5.1. Classification des EPS.....	13
1.1.5.2. Biosynthèse des EPS.....	14
III. Biofilm.....	16
1. Définition du biofilm.....	16
2. Composition du biofilm.....	16
3. Formation du biofilm bactérien	17
3.1. Attachement.....	17
3.2. Formation des microcolonies	18
3.3. Structure en trois dimensions et maturation du biofilm.....	18
3.4. Dispersion.....	19
4. Communication cellulaire : Quorum Sensing.....	19
4.1 .Chez les bactéries à Gram positif.....	19
4.2 .Chez les bactéries à Gram négatif.....	20
5. Biofilm dans l'industrie laitière.....	21
6. Biofilm chez le <i>Streptococcus thermophilus</i>	22

Partie II : Matériel et méthodes

1. Échantillons étudiés.....	23
2. Milieux de cultures et conditions de croissance.....	24
3. Souches étudiées	24
4. Isolement de <i>S.thermophilus</i>	24
4.1. Préparation des échantillons et de culture d'enrichissement	24
4.2. Isolement sur milieu gélosé	25
5. Purification et pré-identification des souches	25

5.1. Étude morphologique	25
5.1.1. Examen macroscopique.....	25
5.1.2. Recherche de catalase.....	25
5.1.3. Examen microscopique.....	26
5.1.3.1. Observation à l'état frais.....	26
5.1.3.2. Examen après coloration de Gram.....	26
6. Identification biochimique partielle des souches.....	26
6.1. Test de croissance dans le lait de Sherman.....	27
6.2. Test de croissance à une concentration de 6.5% de NaCl.....	27
6.3. Test de thermorésistance.....	27
7. Identification de <i>S.thermophilus</i> par système API	27
7.1. Tests d'identification compris dans les galeries utilisés.....	28
7.1.1. Fermentation des sucres.....	28
7.1.2. Hydrolyse d'esculine.....	28
7.1.3. Recherche de l'uréase.....	28
7.1.4. Recherche d'arginine dihydrolase.....	28
8. Mise en évidence de la formation du biofilm	29
8.1. Méthode de microplaque en polystyrène (TCP).....	29
8.2. Méthode en tube (TM).....	30
8.3. Détection de la production de slime par la méthode rouge Congo agar RCA.....	30
9. Détection de certains acteurs impliqués dans la formation du biofilm	30
9.1. Détection de la production des EPS	30
9.2. Mise en évidence des EPS capsulaires.....	31
10. Analyse statistique.....	31

Partie III : Résultats et discussion

1. Isolement de <i>S.thermophilus</i>	32
2. Pré-identification de <i>Streptococcus thermophilus</i>	32
2.1. Aspect macroscopique et test à catalase	32
2.2. Aspect microscopique.....	33
3. Identification biochimique partielle des souches	34
3.1. Croissance sur le lait de Sherman.....	34
3.2. Croissance à concentration de 6.5% de NaCl.....	34
3.3. Test de thermorésistance.....	35
3.4. Identification par système API.....	35
4. Mise en évidence de formation du biofilm.....	39
4.1. Méthode d'évaluation en microplaque.....	39
4.2. Méthode d'évaluation en tube	47
4. Production de slime sur le rouge Congo agar RCA	51
5. Détection de certains acteurs impliqués dans la formation du biofilm.....	56
5.1 Production d'EPS.....	56
5.2. Mise en évidence des EPS capsulaires	59
Conclusion.....	62
Références bibliographiques	65
Annexes.....	83

Résumé

Le présent travail décrit un protocole expérimentale visant à démontrer la formation du biofilm chez des souches industrielles de *Streptococcus thermophilus* isolé à partir de yaourt et du fromage, en faisant le lien avec la biosynthèse des exopolysaccharides et mettant en évidence certains acteurs moléculaires impliqués dans ce processus. Au début, Nous avons isolé et purifié 20 souches industrielles de *S. thermophilus* issues des produits laitiers (*i.e.* Yaourt et fromage). Tous les isolats ont été identifiés selon des critères microbiologiques et biochimiques clés (coloration du Gram, test du catalase, croissance à 6.5% du NaCl (P/V), sur le lait de Sherman ainsi que la fermentation des sucres et l'hydrolyse de l'esculine). L'étape d'évaluation La formation du biofilm par trois méthodes différentes (microplaque en polystyrène (TCP), méthode en tube (TM)) afin de détecter l'adhésion de *S. thermophilus* sur deux surfaces de nature différente (polystyrène et le verre), ainsi nous avons adapté la méthode RCA (rouge Congo agar) vise à confirmer la production de slime dans les mêmes conditions de culture. Sachant que la formation du biofilm fait impliquer certains acteurs moléculaires (EPS et EPS capsulaire), l'attachement initial dont les EPS s'interviennent c'est pour cette raison nous avons cherché la production des EPS par une simple détection visuelle et sur la gélose RRM17 (gélose au rouge de ruthénium) dans les même conditions décrites précédemment, ce travail a été finalisé par la mise en évidence de la capsule par l'encre de Chine. Nous avons trouvé que toutes les souches sont des formatrices de biofilm par la méthode de TCP et TM avec une certaine différence dont une proportion est une forte formatrice et l'autre alterne entre modérée et faible. Parallèlement certaines souches ont montré une production de slime (souches présentant un aspect noir sec). Sachant que cette production varie quantitativement d'une souche à une autre, cela est lié à l'aspect de colonie sur gélose RCA et l'interprétation est ainsi relative aux références consultées. Concernant la biosynthèse d'EPS est aussi la majorité des souches sont des fortes productrices et le reste est modéré, nous avons bien éclairci la capsule chez nos souches dont elles sont tous formatrices de capsules.

Mots clés : *Streptococcus thermophilus*, formation de biofilm, Slime, production des EPS.

Abstract

The present work describes an experimental protocol aimed at demonstrating the formation of biofilm in industrial strains of *Streptococcus thermophilus* isolated from yoghurt and cheese, making the link with the biosynthesis of exopolysaccharides and highlighting certain molecular actors involved in this process. . At first, 20 industrial *S. thermophilus* strains from dairy products (i.e. yoghurt and cheese) were isolated and purified. All isolates were identified according to key microbiological and biochemical criteria (Gram stain, catalase test, 6.5% growth of NaCl (P/V), Sherman milk, and sugar fermentation and hydrolysis esculin). The evaluation step The formation of the biofilm by three different methods (polystyrene microplate (TCP), tube method (TM)) to detect the adhesion of *S. thermophilus* to two surfaces of different nature (polystyrene and glass), so we adapted the method RCA (Red Congo agar) aims to confirm the production of slime under the same growing conditions. Knowing that the formation of biofilm involves some molecular actors (EPS and capsular EPS), the initial attachment that EPS intervenes is for this reason we sought the production of EPS by a simple visual detection and agar RRM17 (ruthenium red agar) under the same conditions described above, this work was finalized by highlighting the capsule with Indian ink. We found that all the strains are biofilm formers by the TCP and TM method with some difference of which one proportion is a strong trainer and the other alternates between moderate and weak. At the same time some strains showed slime production (strains with a dry black appearance). Knowing that this production varies quantitatively from one strain to another, this is related to the appearance of colony on RCA agar and the interpretation is thus relative to the references consulted. Regarding EPS biosynthesis is also the majority of strains are high producers and the rest is moderate, we have cleared the capsule in our strains of which they all form capsules.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, biofilm formation, Slime, EPS production.

ADH : Arginine Dihydrolase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AHL : Acyl Homosérines Lactones
AI : Auto-Inducteur
AMD : amidon
AMY: Amygdaline
ARA : Arabinose
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.
ATP : Adénosine triphosphate
°C : Degré Celsius
CIT : utilisation du Citrate
CO₂ : dioxyde de carbone
CPS : polysaccharides capsulaires
CV : Cristal Violet
G+C%:Guanine + Cytosine %
da: Dalton
DO: Densité optique.
DOc : Densité optique critique.
EPS : exopolysaccharides
ESC : Esculine
FDA: Food and Drug Administration
g :gramme
GAL :Galactose
GEL: Gélatinase
GLU :Glucose
GRAS: Generally Recognized As Safe.
H : heure
H₂O : molécule d'eau
H₂S: dihydrogene de sulfure
H₂O₂ : Eau oxygénée
HIP: Hippurate
IND:Testproduction d'indole.

INU: Inuline

H_ePO: hétéropolysaccharides

H_oPO: homopolysaccharides

LAB: lactic acid bacteria

LAC : Lactose

LAP : Leucine arylamidase

Lb:*Lactobacillus sp*

LDC: Lysine décarboxylase

LM17 : milieu M17 additionné au lactose.

LM17RCA : la gélose M17 au rouge Congo additionné au Lactose.

MAN : Mannitol

min: minutes

ml : millilitre

mm : millimètre

nm: nanomètre

O₂ : oxygène

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG : Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside

PAL: phosphatase alcaline

PBS: Tampon phosphate salin.

PCR: Polymerase chain reaction

PIA: Polysaccharide Intercellular Adhesine

pH: Potential d'hydrogène

P/V: poids /volume

QS: Quorum Sensing

RCA : Rouge Congo Agar (Red Congo Agar)

RAF : Raffinose

RIB : Ribose

RHA: Rhamnose

rpm : Round per minute.

RRLM17 : La gélose M17 au rouge de ruthénium additionné au lactose.

RRSM17 : La gélose M17 au rouge de ruthénium additionné au saccharose.

S.thermophilus :*Streptococcus thermophilus*

SAC : Saccharose

SM17: milieu M17 additionné au saccharose

SM17RCA : la gélose M17 au rouge Congo additionné au saccharose.

SOR : Sorbitol

Sp :Espèce non précisée.

Subsp : sous espèce

T : Température

T : témoin

TCP : Plaque de Culture de Tissus

TM : Méthode en tube

UFC :Unité formant colonies.

μl : microlitre

URE:Uréase

VP : Voges Proskawer

V/V: volume/volume

αGAL :α Galactosidase

βGAL :β Galactosidase

βGUL :β Glucorunidase

% : pourcentage

< : Inférieur

+ : présence ou test positif

- : absence ou test négatif

Liste Des Tableaux

Tableau I : Caractères différentiels des genres de bactéries lactiques	06
Tableau II : Critères biochimiques et physiologiques des souches de <i>S. thermophilus</i> isolées et celles des souches de référence	10
Tableau III : Composition d'un biofilm bactérien	16
Tableau IV : Variables importants pour l'attachement et la formation du biofilm	18
Tableau V : Type des échantillons de produits laitiers fermentés utilisés dans la présente étude.	23
Tableau VI : Tests d'identification biochimique des souches de <i>S. thermophilus</i>	38
Tableau VII : Classification de l'adhérence des souches sélectionnées de <i>S. thermophilus</i> par la méthode de microplaque en polystyrène	46

Liste Des Figures

Figure 1 : Les principales voies de fermentation du glucose	05
Figure 2 : Arbre phylogénétique des membres représentatifs des Firmicutes.	07
Figure 3 : Arbre phylogénétique des Actinobactéries	08
Figure 4 : Principales voies du métabolisme des sucres chez <i>S. thermophilus</i>	11
Figure 5 : Représentation schématique de voies métaboliques pour la génération des précurseurs des sucres activés pour la synthèse des EPS par les bactéries lactiques, au cours du catabolisme du lactose ou du glucose	15
Figure 6 : cycle de vie d'un biofilm et les facteurs influençant sa forme.	18
Figure 7 : Quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif	20
Figure 8 : Quorum sensing chez les bactéries à Gram positif.	21
Figure 9 : Aspect de la réaction du test de catalase réalisé, avec les souches <i>S. thermophilus</i> B05 et E17.	32
Figure 10 : Aspect microscopique de la souche E06 et E20 respectivement de <i>Streptococcus thermophilus</i> après la coloration de Gram indiquant la forme ovoïde et l'arrangement en chaînette, l'observation est effectuée à l'objectif 100	33
Figure11 : Résultat du test de croissance de <i>S. thermophilus</i> sur le lait de Sherman après 24h d'incubation à 42°C	34
Figure 12 : Résultat de test de croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> à une concentration de 6.5 %de NaCl	35
Figure 13 : Résultats de la galerie Api 20E pour les souches E4, E14 et B05 de <i>Streptococcus thermophilus</i>	36
Figure 14 : Résultats de la galerie Api Strep pour les souches E4 et E12 de <i>Streptococcus thermophilus</i>	36
Figure 15 : Résultat des microplaques en absence du lait après incubation à 42°C pendant 18h.1 : (a) : additionné au saccharose ; (a) :Après coloration au cristal violet ; 2 : (b) : additionné au lactose ; (b) : Après coloration au cristal violet méthode des disques.	40

Figure 16: Résultat des microplaques en présence du lait après incubation à 42°C pendant 18h	41
1 : (A) : additionné au saccharose; (A) : Après coloration au cristal violet;	
2 : (B) : additionné au lactose; (B) : Après coloration au cristal violet	
Figure 17 : Formation du biofilm chez les souches <i>S. thermophilus</i> sur microplaque en polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon M17 saccharosé en absence lait	43
Figure 18 : Formation du biofilm chez les souches de <i>S. thermophilus</i> sur microplaque en polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon M17 saccharosé additionné au lait	43
Figure 19 : Formation du biofilm chez les souches <i>S. thermophilus</i> sur microplaque en polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon M17 lactosé en absence du lait	44
Figure 20 : Formation du biofilm chez les souches <i>S. thermophilus</i> sur microplaque en polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon M17 lactosé en présence du lait.	44
Figure 21 : Formation du biofilm par les souches sélectionnées de <i>S. thermophilus</i> par la méthode des tubes sur le LM17 additionné au lait après incubation à 42°C pendant 24h.	48
Figure 22 : Formation de biofilm par les souches sélectionnées de <i>S. thermophilus</i> , par la méthode en tubes sur SM17 additionné au lait après incubation à 42°C pendant 24h.	48
Fig.23 : Formation de biofilm par les souches sélectionnées de <i>S. thermophilus</i> par la méthode en tubes sur le LM17 sans lait après incubation à 42°C pendant 24h	50
Fig. 24: Formation du biofilm par les souches sélectionnées de <i>S. thermophilus</i> par la méthode en tubes sur le SM17 sans lait après incubation à 42°C pendant 24h	50
Fig.25 : Aspects des colonies des souches <i>S. thermophilus</i> E4, E14 et E20 indiquant la production de "slime" sur le LM17RCA au lait, après 24h d'incubation à 42°C	52
Fig.26 : Aspects des colonies des souches <i>S. thermophilus</i> E06, E14, E20, B03 et B34, indiquant la production de "slime" sur le SM17RCA au lait après 24h d'incubation à 42°C	52

Fig.27 : Fréquence (%) des différents aspects (couleur) des colonies formées par le <i>S. thermophilus</i> sur la SM17RCA	54
Fig.28 : Fréquence (%) des différents aspects des colonies formées par le <i>S. thermophilus</i> sur le LM17 RCA	54
Fig. 29 : Influence de l'espace sur l'intensité de production du "slime" par les <i>S. thermophilus</i> E14 et E20, cultivées sur le LM17RCA au lait.	55
Fig.30 : Variation d'aspects des colonies formées par les souches sélectionnées de <i>S. thermophilus</i> sur gélose RRM17	57
Fig.31 : Aspect macroscopique de <i>S.thermophilus</i> E4, E11, E14et E17 sur RRSM17 agar, après 24h d'incubation à 42°C	58
Fig.32 : Aspect macroscopique de <i>S. thermophilus</i> E4, E11, E14 et E17 sur RRSM17 agar, après 24h d'incubation à 42°C	58
Fig.33 : Aspect microscopique de la souche E20 de <i>S. thermophilus</i> après la coloration négative à l'encre de Chine indiquant la présence d'un halo entourant le corps cellulaire	60
Fig.34 : Aspect microscopique de la souche E20 de <i>S. thermophilus</i> après la coloration négative à l'encre de Chine indiquant la présence d'un halo entourant le corps cellulaire	60

Introduction

INTRODUCTION

Depuis plusieurs siècles, les bactéries lactiques ont présenté un grand intérêt dans l'élaboration des produits alimentaires fermentés. Plusieurs études ont abordé leur rôle dans les transformations des aliments. Au cours de ces transformations, le produit a subi des modifications de la texture et de la saveur. Les bactéries lactiques assurent également une bonne sécurité alimentaire grâce à la production de métabolites antimicrobiens tels que les acides organiques et les bactériocines. Plusieurs espèces de ce groupe ont la capacité de produire des exopolysaccharides (EPS) contribuant à l'amélioration des propriétés organoleptiques des produits laitiers fermentés ainsi qu'ils attribuent un effet bénéfique sur la santé du consommateur comme l'activité anti-tumorale et la réduction de taux de cholestérol **(Taillez et al., 2001; Vinderola et al., 2006; Rul et al., 2011)**.

Le *Streptococcus thermophilus* est une espèce lactique très intéressante en raison de ses propriétés technologiques citant leur capacité à produire du folate, l'activité acidifiante, l'activité uréasique et la production de bactériocine. Ce ferment fait partie de la flore lactique utilisée comme étant une culture initiateur de yaourt à côté de *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus*. et celle du fromage (Emmental, Gruyère, Parmigiano et Mozzarella) **(Lui et al., 2014)**. La production des EPS par le *S. thermophilus* est l'une de ses caractéristiques exploitées dans l'industrie laitière, en tant que des bio-épaississant, texturants, stabilisants, émulsifiants, et agents viscosifiants **(Jaiswal et al., 2014)**.

Le mode de vie bactérien alterne entre la forme planctonique et la forme sessile connue également par le « biofilm ». La capacité de se développer en biofilm présente un caractère dominant chez la majorité des bactéries. Ce mode de vie permet aux bactéries de persister et faire face à certaines hostilités rencontrées dans leur environnement. Certaines bactéries lactiques ont montré une capacité de formation du biofilm varie d'une espèce à une autre **(Diaz et al., 2016)**. Cette propriété est un trait important chez certaines espèces streptocoques. Tandis que la capacité de *S. thermophilus* à former un biofilm reste sous-entendu **(Couvigny et al., 2015)**.

Notre travail a concerné 21 souches de *S. thermophilus* isolées à partir de différents produits laitiers (yaourt et fromages à pâte cuite, incluant l'emmental et Gruyère). Les souches ont été testées pour leur aptitude à former un biofilm sur des surfaces différentes (polystyrène et verre).

Nous avons aussi exploité la production de slime comme étant un indice de formation du biofilm par la méthode de la gélose au rouge Congo.

Certains acteurs moléculaires contribuant à la formation du biofilm ont été mis en évidence (EPS et CPS).

Ce mémoire est scindé en deux parties :

La partie bibliographique : cette partie inclut cinq points traitant les titres suivants : les bactéries lactiques, le *S. thermophilus*, les exopolysaccharides bactériens et les biofilms.

La partie expérimentale : elle comporte le matériel et méthodes et les techniques adoptées dans cette partie. Les résultats sont présentés avec des interprétations ainsi qu'une discussion et une conclusion.

Revue Bibliographique

I. Les bactéries Lactiques

1. Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques représentent un groupe de bactéries à Gram-positif ayant en commun des caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Elles se présentent sous forme de bâtonnets ou de cocci, non sporulées, dépourvues de cytochromes et de catalase, quelques rares souches peuvent posséder des activités pseudo-catalasiques. Elles sont par ailleurs, aéro-tolérantes, tolérantes à l'acidité (**Dellaglio et al., 1994; Guiraud, 1998; Endo et Dicks, 2014**). Sur le plan nutritionnel, les bactéries lactiques ont des exigences particulières vis-à-vis de certains facteurs de croissance, tels que les vitamines. Elles accumulent à partir du glucose, de l'acide lactique comme produit majoritaire de leur métabolisme. Leurs activités et conversions métaboliques sont assurées grâce à la glycolyse et à la fermentation par la réduction du NADH, en réduisant le pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Elles peuvent être homo-fermentaires, dans ce cas, l'acide lactique est le principal produit de leur métabolisme (85%). Quand elles sont hétéro-fermentaires, les produits formés sont compris dans l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et du CO₂ (**Fig. 1**) (**Stiles et Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004; Endo et Dicks, 2014**).

2. Ecologie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont rencontrées dans diverses niches écologiques, où les substrats glucidiques sont disponibles (**Tailliez, 2001**). Leur présence est souvent associée aux aliments : produits laitiers, produits céréaliers, viandes et produits de la pêche, fruits et jus de fruits, légumes marinés, choucroute, ensilage et levains. Certaines espèces prolifèrent au niveau des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et génitales des humains et des animaux (**Horvath et al., 2009; Linares et al., 2017**). Le genre *Lactobacillus* occupe une grande place dans ce groupe, il comprend plus de 100 espèces qui sont omniprésentes où des substances riches en glucides sont disponibles. Ces espèces sont étroitement associées à des animaux terrestres et marins, leur environnement (plantes, matériaux d'origine végétale et fumier) et leurs aliments (fromages et yaourts). Elles sont couramment trouvées dans les cavités corporelles des humains et des animaux (**Liu et al., 2014; Mahasnah et Mahasnah, 2017b**). Les espèces du genre *Lactococcus* ont été isolées à partir des produits végétaux, mais sont généralement associées aux produits laitiers (**Liu et al., 2014; Mahasnah et Mahasnah, 2017a**).

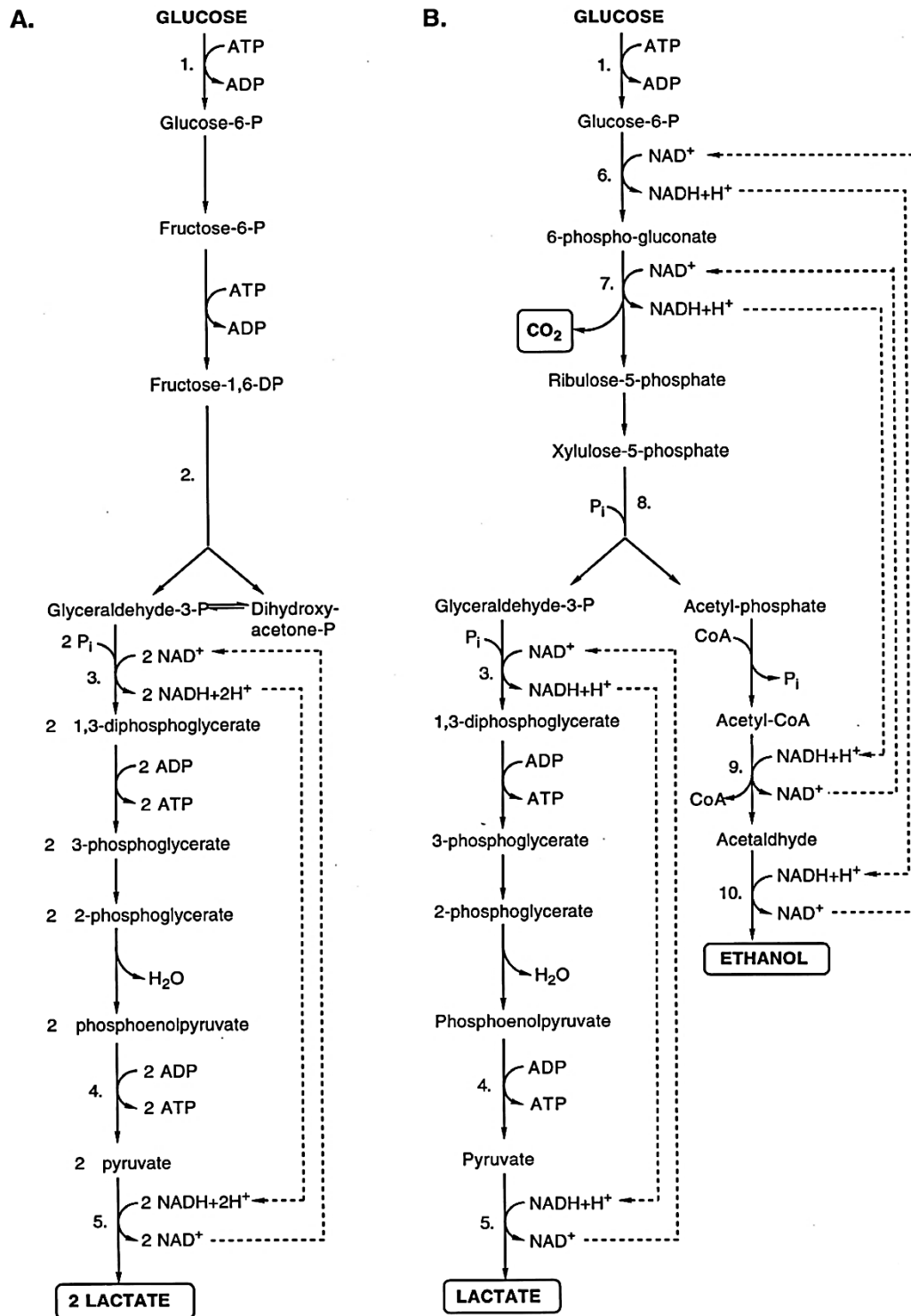


Fig. 1 : Les principales voies de fermentation du glucose chez les bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

(A) : La fermentation homolactique (glycolyse, voie d'EMP);

(B) : La fermentation hétérolactique (6-phosphogluconate/phosphocétolase).

Les enzymes sélectionnées sont numérotées:

- 1: Gucoquinase; 2: Fructose diphosphate-aldolase; 3: Glycéradéhyde-3-phosphate déshydrogénase; 4: Pyruvate kinase;
- 5: Lactate déshydrogénase; 6: Glucose-6-phosphate déshydrogénase; 7: 6- phosphogluconate déshydrogénase;
- 8: phosphocétolase; 9: Acétaldéhyde déshydrogénase; 10: Alcool déshydrogénase.

3. Aperçu taxonomique

Les critères taxonomiques des bactéries lactiques (Tableau I) se basent principalement sur leur morphologie (bacilles ou coques), mais aussi sur les critères phénotypiques suivants: le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes température (de 15 à 45°C), la nature de l'acide lactique (D, L ou DL), la tolérance ou l'intolérance aux fortes concentrations en sel (6,5%, 18% de NaCl), la tolérance à l'acidité (des pH relativement bas), au milieu alcalin ou à l'éthanol, la tolérance aux sels biliaires, l'hydrolyse de l'arginine, la formation de l'acétoïne, et la production des polysaccharides extracellulaires (Axelsson, 2004; Liu *et al.*, 2014).

Tableau I. Caractères différentiels des genres de bactéries lactiques adaptés d'après (Axelsson, 2004; Lahtinen *et al.*, 2011; Kalschne *et al.*, 2015).

Caractère	Genre	Formation des tétrades	Formation du CO ₂ à partir de glucose	Croissance à 10°C	Croissance à 45°C	Croissance à 6.5% de NaCl	Croissance à 18% de NaCl	Croissance à pH 4,4	Croissance à pH 9,6	Acide lactique ^d	% (G+c)
Bâtonnet	<i>Carnobacterium</i>	-	- ^b	+	-	ND ^c	-	ND	-	L	33 à 37%
	<i>Lactobacillus</i>	-	±	±	±	±	-	±	-	D, L, DL ^e	32 à 53%
Coques	<i>Aerococcus</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	L	35 à 44%
	<i>Enterococcus</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	L	37 à 44%
	<i>Lactococcus</i>	-	-	+	-	-	-	±	-	L	34 à 36%
	<i>Vagococcus</i>	-	-	+	-	-	-	±	-	L	33 à 37%
	<i>Leuconostoc</i>	-	+	+	-	±	-	±	-	D	36 à 42%
	<i>Oenococcus</i>	-	+	+	-	±	-	±	-	D	36 à 42%
	<i>Pediococcus</i>	+	±	+	±	±	-	+	-	D, DL ^e	34 à 42%
	<i>Streptococcus</i>	-	-	-	±	-	-	-	-	L	34 à 46%
<i>Tetragenococcus</i>	+	-	±	-	+	+	-	+	L	34 à 36%	
<i>Weissella^a</i>	-	+	±	-	±	-	±	-	D, DL ^e	DND	

+ : positif, - : négatif, ± : variable entre les espèces, **ND** : Non déterminé, **DND** : donnée non disponible.

Weissella^a : peuvent avoir des formes bâtonnets.

Production de **D**, **L** ou **DL** : acide lactique produits varie entre les espèces.

a : quantité insuffisante de CO₂ produite, dépend du milieu de culture.

c : absence de la croissance à 6.5% de NaCl.

d : configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose.

e : production de l'acide lactique varie entre les espèces.

Selon la classification taxonomique actuelle fondée sur le séquençage de l'ARN 16S, les bactéries lactiques appartiennent à l'embranchement des Firmicutes, la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales (**Lahtinen et al., 2011; Liu et al., 2014**). Différentes familles ont été définies à savoir: Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae et Streptococcaceae. Les genres de bactéries lactiques associés aux aliments sont : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques indiquent que ces micro-organismes peuvent comprendre environ une quarantaine de genres (**Stiles et Holzapfel, 1997; Wessels et al., 2004**).

Phylo-génétiquement, tous les genres susmentionnés forment un clade proche de la branche clostridiale (**Fig. 2**) des bactéries à Gram-positif, avec une faible teneur en guanine-cytosine (<50%). Cette propriété éloigne ces bactéries lactiques "traditionnelles" des bifidobactéries, qui ont une teneur en (G+C) supérieure à 55%, figurant parmi l'embranchement des Actinobactéries et proche du clade des 'Actinomyces' (**Fig. 3**). Néanmoins, le genre *Bifidobacterium* est toujours considéré par certains chercheurs comme une bactérie lactique, en raison de ses propriétés physiologiques et biochimiques similaires, et parce que le genre *Bifidobacterium* partage certaines niches écologiques communes telles que le tractus gastro-intestinal (**Klein et al., 1998; Liu et al., 2014**).

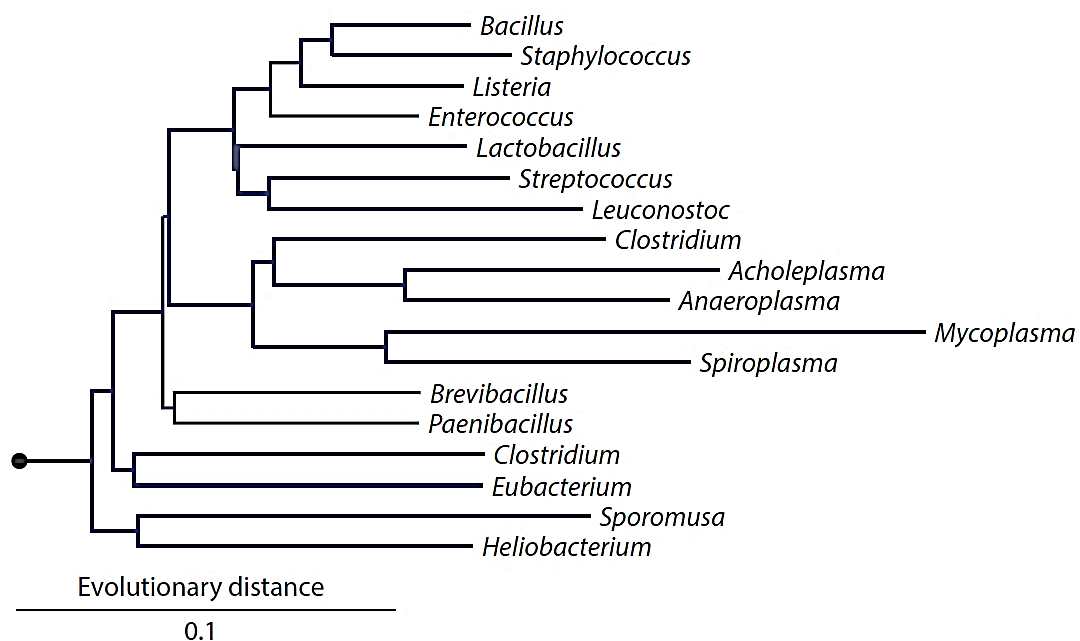


Fig. 2 : Arbre phylogénétique des membres représentatifs des Firmicutes (**Brown, 2015**).

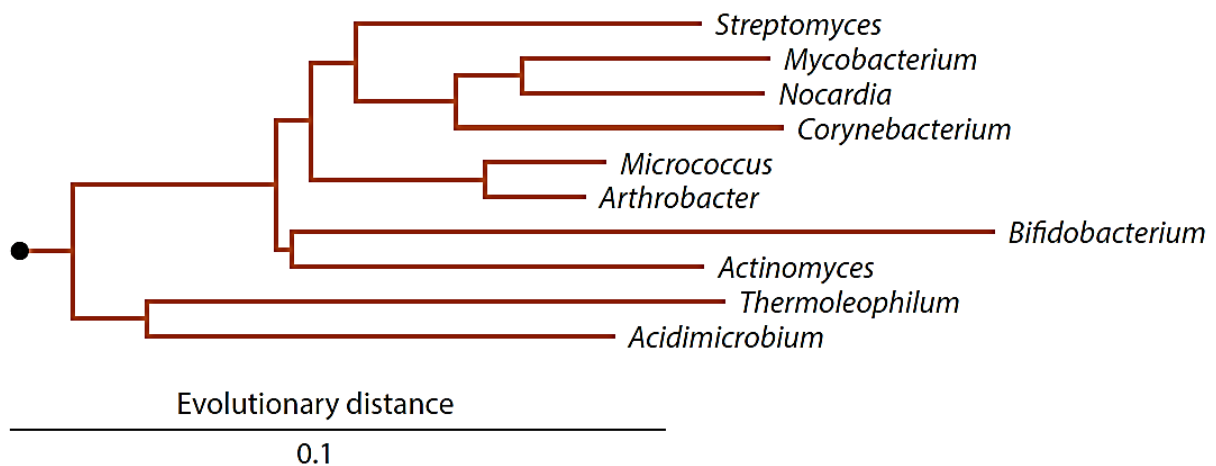


Fig. 3 : Arbre phylogénétique des Actinobactéries (**Brown, 2015**).

4. Intérêt des bactéries lactiques

Vu que de nombreux effets bénéfiques (nutritionnels et pour la santé) ont été apportés par les bactéries lactiques, leur utilisation commence à s'élargir et envahir plusieurs domaines. D'abord ce groupe de bactéries a été impliqué dans l'industrie alimentaire et plus spécifiquement dans l'industrie laitière, en tant que ferments lactiques améliorant, la valeur nutritive, les propriétés organoleptiques ainsi que la saveur, tout en augmentant la durée de conservation (**Asmahan, 2010; Florou-Paneriet al., 2013; Bintsis, 2018**). Les bactéries lactiques sont employées dans la bio-préservation (comme cultures protectrices) des aliments, en exploitant leurs métabolites, tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol, le dioxyde du carbone et les bactériocines. Ces métabolites exercent des effets inhibiteurs sur les germes d'altération ou pathogènes (**Asmahan, 2010; Ołdak et Zielińska, 2017**). Elles sont aussi connues par leurs effets probiotiques, ces bactéries peuvent avoir des effets salutaires pour le contrôle du cholestérol, ainsi que la stimulation du système immunitaire et des effets anti-cancérigènes (**Asmahan, 2010**).

II Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est constitué dans l'ensemble d'espèces bactériennes pathogènes. Il inclut des streptocoques beta-hémolytiques, des streptocoques non-hémolytiques et des streptocoques viridans. Des études phylogénétiques appuyées sur l'analyse de la séquence ARN 16S ont permis de distinguer au sein des streptocoques viridans 5 groupes à savoir: *mutans*, *anginosus*, *mitis*, *sanguinus* et *salivarius*, comportant 26 espèces différentes. Les espèces du groupe viridans ne possèdent pas les antigènes de Lancefield et leur pouvoir de pathogénicité est faible (**Kawamura et al., 1995; Facklam, 2002; Maeda et al., 2010**). Le sous-groupe *salivarius* comprend trois espèces *S. salivarius*, *S. vestibularis* et *S. thermophilus* (**Delorme, 2008**). Le *S. salivarius*, est un colonisateur pionnier des muqueuses orales chez l'homme, principalement isolée de la langue dorsale. Le *S. vestibularis* (**Whiley et Hardie, 1988**), une espèce mutualiste présente sur le vestibule de la muqueuse buccale. Le *S. thermophilus*, un streptocoque relativement thermophile utilisé en tant que ferment lactique dans la production de yaourt et des fromages à pâte cuite de type suisse ou italien (**Schleifer et al., 1991**). Des analyses phylogénétiques soutiennent une affiliation relativement étroite entre *S. vestibularis* et *S. thermophilus* et une divergence de *S. salivarius* dans la lignée du groupe *salivarius* (**Pombert et al., 2009; John et al., 2012**).

1. *Streptococcus thermophilus*

Le *S. thermophilus* a été retenu dans le genre *Streptococcus* et re-classifié avec les streptocoques viridans. Il a en effet été considéré comme une espèce du groupe *salivarius* (**Facklam, 2002; Delorme, 2008; Pontigo et al., 2015**). Le *S. thermophilus* est une exception dans le genre *Streptococcus*, car c'est la seule espèce qui n'est pas pathogène, et réputée par son statut de grade alimentaire, reconnu sous le nom GRAS (**Generally Recognized As Safe**) (**Siezen et al., 2008; Liu et al., 2014**).

Tous les isolats de *S. thermophilus* sont identifiés comme anaérobies, aérotolestants, catalase négative et Gram-positif. Leurs cellules ovoïdes se développent généralement en chaînes linéaires. Ils sont incapables de croître à 10°C, à pH 9,6 ou en présence de 6,5% de NaCl (**Delorme, 2008; Iyer et al., 2010**).

Il s'agit, par ailleurs, d'une espèce thermophile, ayant une température d'incubation optimale au-dessus de 40°C. *S. thermophilus* est largement utilisé en combinaison avec *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. Lactis* et / ou *Lb. helveticus*, en tant que culture starter

pour le yogourt et autres produits laitiers fermentés, ainsi que pour les fromages de type Suisse et Italien (Hols et 2005; Iyer et al., 2010).

1.1 Principales activités métaboliques de *S. thermophilus*

1.1.1. Métabolisme des sucres

La première fonction de *S. thermophilus* dans la fermentation des produits laitiers industriels est la conversion rapide du lactose en lactate à des températures élevées. Cette espèce thermophile est réputée par sa capacité limitée à utiliser les hydrates de carbone. Cinq différents sucres sont fermentés par *S. thermophilus* (Tableau II) : le lactose, le saccharose, le glucose, le galactose et le fructose. Les deux derniers sucres sont utilisés par un nombre limité de souches. Chez *S. thermophilus*, le saccharose et le fructose sont les seuls sucres transportés par un système phospho-transférase dépendant du phospho-énolpyruvate (PTS-PEP), mais avec un rendement inférieur à celui du lactose (Van Den Bogaard et al., 2004; Hols et al., 2005; Wu et al., 2014).

En outre, Le glucose est un sucre non-PTS chez *S. thermophilus*, la plupart des souches de cette espèce poussent faiblement sur le glucose. *S. thermophilus* est en effet, fortement adapté à croissance sur le lactose, qui est transporté dans la cellule par l'intermédiaire d'une perméase (LacS) (Fig. 4), et son métabolisme comprend l'hydrolyse par la β -galactosidase (LacZ), puis la dégradation du glucose et du galactose, selon les voies de la glycolyse et de Leloir, respectivement. Bien que toutes les souches utilisent le glucose fragmenté du lactose, le galactose est généralement non métabolisé et expulsé à l'extérieur de la cellule (Hols et al., 2005; Iyer et al., 2010).

Tableau II : Transport et métabolisme des sucres chez *S. thermophilus* (Poolman, 1993).

Substrat	Croissance	Mécanisme de transport	
		PEP-PTS	Transport secondaire
Lactose	+	-	+
Galactose	-	-	+
Glucose	+ / -	-	?
Saccharose	+	+	-
fructose	+	+	-

1.1.2. Métabolisme protéique

les bactéries lactiques sont exigeantes, et nécessitent un apport exogène en acides aminés pour assurer leur croissance (**Herbet et al., 2000**). Le système protéolytique de *S. thermophilus* comprend plus de 20 enzymes protéolytiques, il est composé de: (i) d'une protéase extracellulaire (PrtS) capable de dégrader et hydrolyser les caséines, (ii) de systèmes de transport pour des acides aminés et des peptides, (iii) d'une série de peptidases intracellulaires nécessaires à la dégradation des peptides et des peptides dérivés des caséines. A cet effet, parler du système protéolytique est également une manière de parler d'enzymes présentant une capacité singulière à la dégradation des peptides. Cette dégradation se traduit par une forte croissance et un fort pouvoir acidifiant dans le lait (**Hols et al., 2005; Iyer et al., 2010**).

1.1.3. Métabolisme des acides aminés

Comme le lait contient de faibles quantités d'acides aminés libres et de peptides, la croissance optimale de *S. thermophilus* dans le lait exige l'hydrolyse de la caséine ou la biosynthèse de nouveaux acides aminés (**Iyer et al., 2010**). Il a démontré que le génome de *S. thermophilus* contient des gènes responsables de la biosynthèse des acides aminés appelés "amino-transférases". Trois groupes de gènes d'amino-transférases sont en effet, connus, il s'agit: des aspartates amino-transférases (*asp C1, aspC2, aspC3*), d'un gène d'acide aminé aromatique amino-transférase (*araT*) et d'un gène d'acide aminé à chaîne ramifiée (BCAA), amino-transférase (*bcaT*) (**Chaves et al., 2002**). En revanche, puisque la plupart des souches de *S. thermophilus* sont capables de croître en présence d'un mélange de glutamine, de méthionine, de leucine, d'isoleucine, de valine et d'histidine, comme seules sources d'acides aminés, il est probable que les voies de biosynthèse des autres acides aminés sont entièrement fonctionnelles (**Hols et al., 2005**).

Par ailleurs, le catabolisme des acides aminés joue un rôle important en fournissant des précurseurs pour la biosynthèse des acides aminés, des vitamines et de la production d'un grand nombre de composés aromatiques (**Iyer et al., 2010**).

1.1.4. Activité uréasique

Le lait contient de l'urée sachant que la présence de l'urée à certain niveau peut conduire à des taux d'acidification imprévisibles durant le processus de la fermentation. L'ammonium

exerce un effet tampon qui réduit le taux de diminution du pH, et en augmentant la durée de la fermentation. Ce phénomène peut affecter la texture et l'activité de l'eau du produit fermenté **(Iyer et al., 2010)**.

Le *S. thermophilus* est la seule bactérie lactique dotée d'une activité uréasique. Cependant, son rôle physiologique chez cette bactérie reste mal connu. Cette activité peut influencer la flaveur et le profil d'acidification, elle est exploitée dans la fabrication du yaourt et du fromage **(Mora et al., 2004; Iyer et al., 2010)**.

1.1.5. Production des exopolysaccharides

Les *S. thermophilus* ont la capacité de produire des polysaccharides (polymère de nature glucidique), excrétés à l'extérieur de la cellule, appelés "exopolysaccharide" (EPS) ou "polysaccharide exocellulaire" **(Cerning, 1990; Kanamarlapudi et Muddada, 2017)**. Ces macromolécules sont hautement diversifiées, dont les propriétés fonctionnelles sont investies dans plusieurs domaines industriels. Ces polymères peuvent être localisés à l'intérieur de la cellule, dans la paroi, ou à la surface bactérienne, avec ou sans attachement **(Hassan, 2008; Zeidan et al., 2017)**.

1.1.5.1. Classification des EPS de *S. thermophilus*

Les souches de *S. thermophilus* synthétisent des EPS et parfois certaines souches peuvent former des EPS capsulaires (CPS) **(Cui et al., 2016)**. Les EPS de *S. thermophilus* sont des hétéropolysaccharides composés de plusieurs types de sucre, principalement de glucose, de galactose et d'un monomère de rhamnose, mais aussi de N acétyl-galctosamine, de fucose et de galactose acétylé **(Laws et al., 2001)**. En effet, la production des EPS par *S. thermophilus* est d'une importance considérable pour l'industrie laitière, car elle contribue dans l'amélioration de la texture et des propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés tels que le yaourt et les fromages **(de Vuyst et al., 1998; Hassan, 2008)**. Les EPS synthétisés par le *S. thermophilus* apportent aussi des bénéfices pour la santé chez l'homme et l'animal, tout en perfectionnant le système immunitaire de l'hôte **(Cui et al., 2016)**.

La production des EPS est influencée par la souche elle-même, et les conditions de culture (température, le pH, la source de carbone et la source d'azote **(Zisu et Shah, 2003; Cui et al., 2016)**).

1.1.5.2. Biosynthèse des EPS

la biosynthèse des EPS se déroule dans le cytoplasme, elle présente l'une des propriétés les plus importantes chez le *S. thermophilus* (Cui *et al.*, 2016). Les sucres précurseurs disponibles dans le milieu de culture vont s'introduire dans le cytoplasme par une base régulatrice, là où intervient la glycosyltransférase, utilisant ces derniers comme substrat et permettant de former des unités répétitives du polysaccharide. Les sucres nucléotidiques (UDP et TDP), qui sont dérivés de sucre -1- phosphate, jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse des hétéropolysaccharides, en activant le sucre pour la polymérisation et les interconversions relatives aux principales réactions d'épimérisation, de décarboxylation et de déshydrogénation (Zeidan *et al.*, 2017). L'assemblage successif des sucres activés mène à la formation des EPS (Fig. 5). Une fois l'unité répétitive est formée, le premier saccharide est lié à un transporteur lipidique, et après addition des autres unités saccharidiques, l'ensemble quitte le cytoplasme vers le milieu extérieur. Les EPS peuvent être liés de manière covalente à la surface de la cellule pour former une capsule, ou libéré dans le milieu comme une masse (Broadbent *et al.*, 2003). Le potentiel de production des différents sucres nucléotidiques est déterminé par le génome bactérien, cela explique la diversité des EPS (Zeidan *et al.*, 2017).

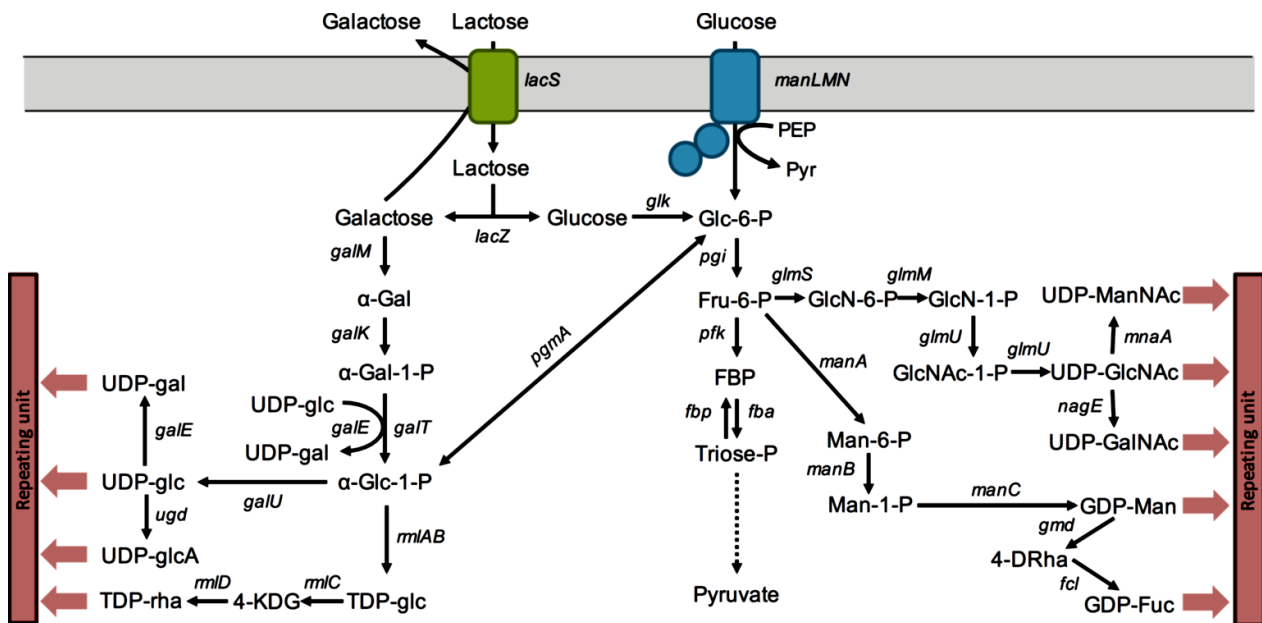


Fig. 05 : Représentation schématique des voies métaboliques pour la génération des précurseurs de sucres activés pour la synthèse des EPS par les bactéries lactiques, au cours du catabolisme du lactose ou du glucose (Zeidan *et al.*, 2017).

PTSMan (*manMNL*), lactose permease (*lacS*), phosphoglucose isomerase (*pgi*), 6-phosphofructo-1-kinase (*pfk*); fructose-1,6-bisphosphate aldolase (*fba*), fructose-1,6-bisphosphatase (*fbp*); glucokinase (*glk*), β -galactosidase (*lacZ*), galactose mutarotase (*galM*), α -galactokinase (*galK*), galactose-1-phosphate uridylyltransferase (*galT*), UDP-galactose 4-epimerase (*galE*), α -phosphoglucomutase (*pgmA*), glucose-1-phosphate uridylyltransferase (*galU*), UDP-glucose 6-dehydrogenase (*ugd*), dTDP-glucose pyrophosphorylase (*rmlA*), dTDPglucose 4,6-dehydratase (*rmlB*), dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase (*rmlC*), dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase (*rmlD*), L-glutamine:D-fructose-6-phosphate aminotransferase (*glmS*), phosphoglucosamine mutase (*glmM*) N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase and glucosamine-1-phosphate acetyltransferase (*glmU*), UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (*mnaA*), UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase (*nagE*), mannose 6-phosphate isomerase (*manA*), phosphomannomutase (*manB*), mannose 1-phosphate guanylyltransferase (*manC*), GDP-mannose 4,6-dehydratase (*gmd*), GDP-fucose synthase (*fcl*). Gal, galactose; Glc, glucose; Rha, rhamnose; Man, mannose; Fuc, fucose; GlcA, glucuronic acid; GlcNAc, N-acetyl-glucosamine; GalNAc, N-acetyl-galactosamine; ManNAc, N-acetyl-mannosamine; Glc-6-P, glucose-6-phosphate; Fru-6-P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; α -Gal-1-P, α -galactose-1-phosphate; α -Glc-1-P, α -glucose-1-phosphate; GlcN-6-P, glucosamine-6-phosphate; GlcN-1-P, glucosamine-1-phosphate; GlcNAc-1-P, N-acetylglucosamine-1-phosphate; Man-6-P, mannose-6-phosphate; Man-1-P, mannose-1-phosphate; 4-KDG, 4-keto-6-deoxyglucose; 4-DRha, 4-deoxyrhamnose; P, phosphate.

III. Les Biofilms

1. Définition du biofilm

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique (**Hall-Stoodley et al., 2004; Muhsin et al., 2015**). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique, qu'à une surface abiotique (**Muhsin et al., 2015**). Ainsi, le biofilm est défini comme étant une association de micro-organismes, dans laquelle les cellules se collent l'une à l'autre sur une surface recouverte par une matrice de substances extracellulaires polymériques produites par les bactéries elles-mêmes (**Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 2004; Muhsin et al., 2015**).

2. Composition du biofilm

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm, incluant des protéines, des enzymes, des polysaccharides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des lipides, des glycolipides et des cations (**Tableau III**) (**Flemming et Wingender, 2010**). En plus de ces composants, l'eau est le composant majeur, avec plus de 97%, responsable du flux des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm (**Sutherland, 2001**). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (**Yannick et al., 2014**).

Tableau III. Composition d'un biofilm bactérien (**Muhsin et al., 2015**).

Composés	Pourcentage dans la matrice
Cellules microbiennes	2-5%
Protéines	1-2%
Polysaccharides	<1-2%
ADN/ARN	<1-2%
Eau	Supérieur à 97%

3. Formation du biofilm bactérien

La formation du biofilm est un processus hautement complexe, dans lequel les cellules microbiennes passent de la forme planctonique à la forme sessile (**Okada *et al.*, 2005**). Il a été supposé que la formation du biofilm est dépendante de l'expression de certains gènes spécifiques contrôlant leur formation (**Sauer *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2005**).

Le processus de formation de biofilm s'effectue en une série d'étapes conduisant à l'adaptation à une multitude de conditions nutritionnelles et environnementales (**Hentzer *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2007**). Dans ce processus, les micro-organismes subissent des changements après leur adhésion à une surface. Les différentes étapes du cycle de vie dans un biofilm sont montrées dans la **Figure 6**.

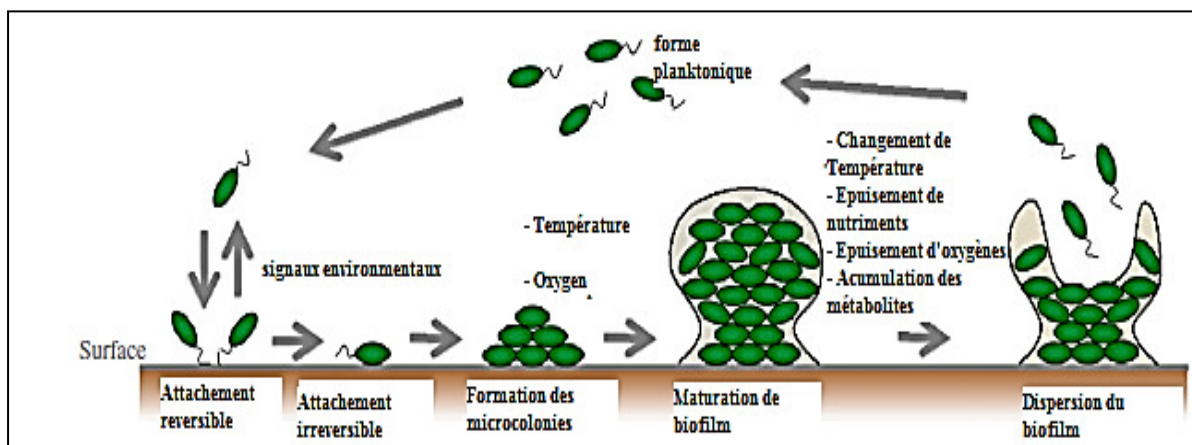


Fig. 6 : Cycle de vie d'un biofilm et les facteurs influençant sa forme (**Toyofuku *et al.*, 2016**).

3.1. Attachement

Quand les cellules bactériennes sont à proximité de certaines surfaces ou supports, leur mouvement devient de plus en plus ralenti, cela engendre une adhésion réversible avec la surface d'une part et avec les microorganismes adhérents préalablement à la surface d'autre part.

Pour la formation du biofilm, l'interface solide-liquide peut fournir un environnement idéal pour les microorganismes pour s'attacher et se développer (**Costerton *et al.*, 1999; Muhsin *et al.*, 2015**). Ces variables sont indiquées dans le tableau IV.

La présence des structures locomotives aux niveaux de la surface cellulaire comme les flagelles, les pilis, les fimbriaes, les protéines ou les polysaccharides est également importante; et peut engendrer un avantage pour la formation du biofilm lorsqu'il y'a une communauté mixte (**Donlan et Costerton, 2002; Muhsin et al., 2015**).

Tableau IV. Variables impliqués dans l'attachement et la formation du biofilm (**Donlan, 2002**).

Propriétés du substratum	Propriétés du fluide	Propriétés des cellules
Texture et rugosité Hydrophobicité Film du conditionnement	Vitesse d'écoulement pH Température Cations Présence des agents antimicrobiens	Hydrophobicité de la surface cellulaire Fimbriae Flagelles Substances polymériques extracellulaires

3.2. Formation des micro-colonies

La formation des micro-colonies provient après l'adhésion à une surface biotique ou abiotique et la liaison devient stable, dont le résultat est la formation de micro-colonies. La multiplication des bactéries dans le biofilm est le résultat des signaux chimiques. Le mécanisme génétique de la production des EPS est activé lorsque l'intensité du signal dépasse un certain seuil (**Costerton et al., 1999**). Alors par l'intermédiaire du signal chimique, les cellules bactériennes commencent à se diviser, tout en prenant une place dans la matrice exopolysaccharidique, entraînant la formation des micro-colonies (**Mc Kenney et al., 1998; Muhsin et al., 2015**).

3.3. Structure en trois dimensions et la maturation du biofilm

La formation des micro-colonies induit l'expression de certains gènes liés à la formation du biofilm. Ces gènes sont nécessaires pour la synthèse des EPS présentant la charpente du biofilm. Il est reporté que l'attachement du biofilm peut activer la formation de la matrice extracellulaire. La formation de la matrice est suivie par la formation des canaux d'eau, pour le transport des nutriments dans le biofilm. Ces canaux sont considérés comme un système

circulatoire, distribuant différents nutriments, et faisant sortir les déchets des micro-colonies du biofilm (Parsek et Singh, 2003; Toyofuku *et al.*, 2016).

3.4. Dispersion du biofilm

Après la formation du biofilm, les bactéries quittent le biofilm sur une base régulatrice. Le détachement des cellules bactériennes planctoniques du biofilm est en effet programmé (Costerton *et al.*, 1999). Lorsque les bactéries subissent un stress mécanique, elles sont détachées de la colonie vers l'environnement. La dispersion des cellules dans le biofilm est une réponse à certains stress mécaniques. Cependant, la plupart du temps les bactéries commencent à se détacher tout en reprenant leur forme planctonique à l'issue d'un quorum quenching (Baselga *et al.*, 1994; Kaplan, 2010; Muhsin *et al.*, 2015). Parfois la dispersion du biofilm est causée par l'action d'activité enzymatique hydrolysant l'alginate (Costerton *et al.*, 1999; Muhsin *et al.*, 2015). Les caractères phénotypiques des cellules sont nettement affectés par la dispersion du biofilm. Les cellules dispersées ont la capacité à retenir certaines propriétés du biofilm, comme la résistance aux antibiotiques. Les cellules dispersées peuvent retourner rapidement au phénotype planctonique (Baselga *et al.*, 1994). Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm (Karatan et Watnick, 2009).

4. Communication cellulaire : Quorum Sensing

Durant la formation du biofilm plusieurs espèces bactériennes sont capables de communiquer entre elles par le mécanisme du quorum sensing (QS) (Naves *et al.*, 2010; Gad, 2018). C'est un système qui stimule l'expression coordonnée avec d'autres cellules et la réponse dépend de la densité de leur population locale. Pendant le QS, les molécules signales se fixent à des récepteurs bactériens conduisant ainsi à un changement dans l'expression des gènes chez la cellule réceptrice. Cela est constaté chez les mono-espèces bactériennes et aussi chez les hétéro-espèces (Miller et Bassler, 2001).

4.1. Chez les bactéries à Gram négatif

Le mécanisme de QS chez les Gram négatifs implique la production des petites molécules inductrices appartenant à la famille des N-acyles homo-sérines lactones ou molécules acylées (AHLs) (Fuqua *et al.*, 1994; Fuqua et Greenberg, 2002; Czajkowski et Jafra, 2009). Les AHLs sont synthétisées par une protéine homologue le "LuxI", elles sortent par la suite

des cellules par une simple diffusion, pour les courtes chaînes d’AHLs, ou par un transport actif pour les longues chaînes (**Fig. 7**). Lorsque leur concentration atteint un seuil critique, elles entrent dans les cellules et se fixent sur un récepteur homologue de Lux R. Le complexe AHLs –LuxR active la transcription de gènes spécifiques (**Fuqua et al., 1994**).

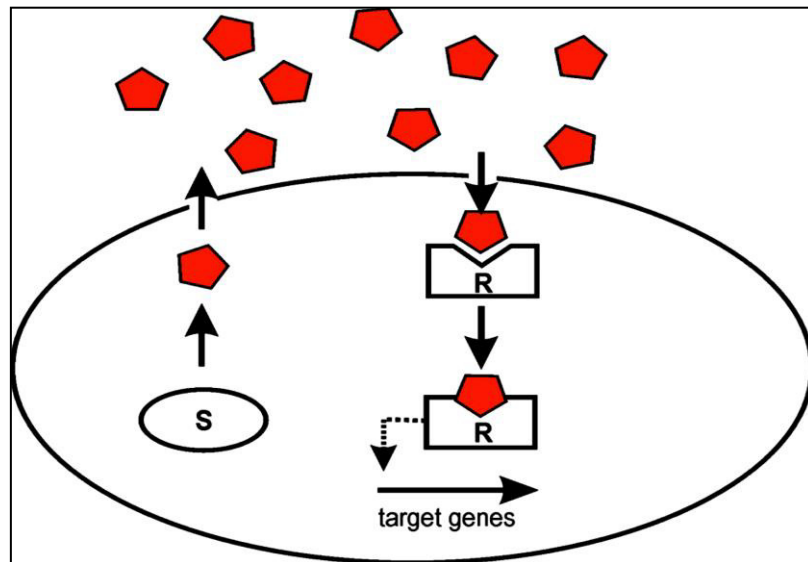


Fig. 7: Le mécanisme du QS chez les bactéries à Gram négatif (**Svjetlana et Jasmina, 2007**).
Pentagones= homo-sérine lactone acylé (acyle-HSL), S= acyle HSL synthésases, R= protéine de liaison acyle-HSL.

4.2. Chez les bactéries à Gram positif

La voie de communication cellulaire chez les bactéries à Gram positif fait impliquer des molécules signales peptidiques, dont la protéine précurseur est sécrétée dans le milieu extracellulaire et commencent à s’accumuler. Une fois le taux d’accumulation atteint une concentration seuil, une zone d’auto-induction est créée. Les molécules peptidiques "signal" interagissent avec l’histidine kinase portée par un récepteur membranaire (**Kleerebezem et al., 1997; Waters et Bassler, 2005; Bose et Ghosh, 2016**). L’interaction du récepteur avec le ligand peptidique initie une cascade de phosphorylation qui aboutit à la formation de la protéine régulatrice. Une série de phosphorylation active donc un récepteur qui vient se fixer sur l’ADN et régule ainsi la transcription des gènes cibles (**Fig. 8**) (**Lazazzera et Grossman, 1998; Miller et Bassler, 2001**). Tout comme les bactéries à Gram négatif, ce

type de système est aussi régulé de façon dépendante de la densité cellulaire (**Kleerebezem et al., 1997; Bose et Ghosh, 2016**).

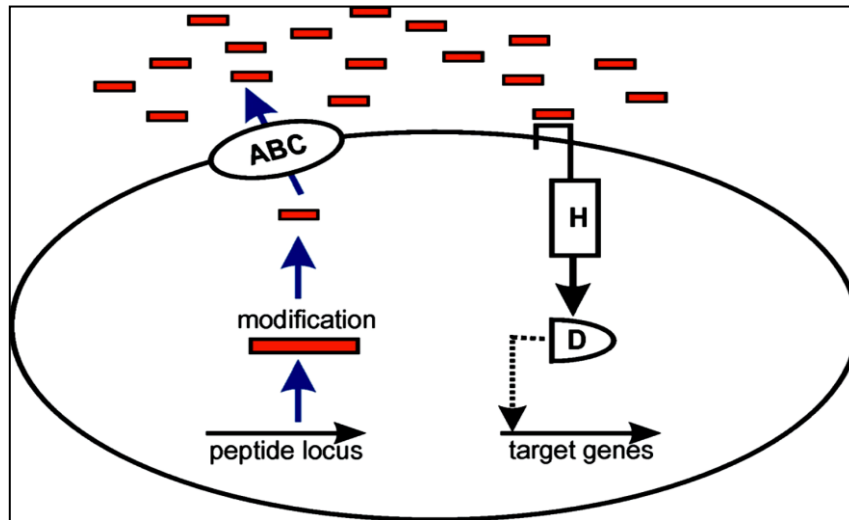


Fig. 8: Le mécanisme du QS chez les bactéries à Gram positif (**Svjetlana et Jasmina, 2007**).

ABC= complexe de transport des protéines, **H**= histidine kinase, **D**= protéine régulatrice.

5. Biofilm dans l'industrie laitière

De nombreux microorganismes rencontrés dans l'environnement laitiers peuvent développer des biofilms à n'importe quel stade de la chaîne de production. Les analyses microbiologiques des surfaces des équipements ont montré que les bactéries adhérentes sur ces dernières proviennent de la ferme (**Huck et al., 2008; Gad, 2018**). Les streptocoques thermorésistants ont l'aptitude de former des biofilms dans les équipements de fabrication des produits laitiers. Des études ont signalé la croissance de ces bactéries à l'échelle pilote au niveau des équipements de pasteurisation (**Hup et al., 1979; Bouman et al., 1982; De Jong et al., 2002; Knight et al., 2004 ; Flint et al., 2015**). De même, des niveaux élevés de contamination par des biofilms formés par des bactéries thermophiles ont été détectés dans les sections chauffantes du matériel de pasteurisation du lait et l'élaboration du fromage, où la température varie de 30 à 73°C. Ces sections contaminées sont par conséquent une source de contamination pour le lait pasteurisé. Cela peut affecter la qualité du lait et du fromage, en entraînant une saveur acide et une texture indésirable (**Knigt et al., 2004**).

Les biofilms des streptocoques thermorésistants atteignent un état stable après environ 12 heures à 42,5°C, lorsque le taux de croissance et le taux de détachement sont équivalents. Les études s'intensifient afin de déterminer l'importance des différents composants du lait et ses dérivés dans la formation de biofilms par les streptocoques thermorésistants (**Lee et al., 1997; Flint et al., 2015**).

6. Biofilm chez *Streptococcus thermophilus*

De nombreuses espèces de streptocoques forment des biofilms, et les descriptions de formation du biofilm par *S. thermophilus* sont par ailleurs rares (**Couvigny et al., 2015**). Chez *S. thermophilus*, les événements de transfert de gènes et la perte des traits ancestraux au fil des années ont contribué à son haut niveau d'adaptation aux environnements laitiers (**Bassi et al., 2017**). La capacité de formation de biofilms par cette espèce peut jouer un rôle dans la persistance dans les environnements laitiers, tels que les usines de pasteurisation du lait et la fabrication du fromage (**Hup et al., 1980; Bassi et al., 2017**).

La formation de biofilms par le *S. thermophilus* est par ailleurs, influencée par les différents composants du lait, ainsi que la nature de la surface (**Barnes et al., 1999; Bassi et al., 2017**). Des travaux récents portant sur l'étude de la formation des biofilms par les bactéries lactiques affirment que le développement de *S. thermophilus* au sein d'un biofilm est renforcé en association avec les espèces *L. lactis* et *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*. Par contre, en monoculture le biofilm de *S. thermophilus* s'avère nettement affaibli. L'intérêt de cette combinaison entre *S. thermophilus* et les autres bactéries lactiques pourrait être exploité dans le contrôle et l'inhibition de la croissance des pathogènes, ainsi que la production des EPS, tout en apportant des bénéfices aux corps humains, en particulier lors d'une antibiothérapie (**Rajpal et al., 2017**).

Matériel & Méthodes

1. Échantillons étudiés

Au cours de cette étude, nous avons examiné un total de 21 produits laitiers fermentés, dont 18 échantillons de yaourt et 3 échantillons de fromage à pâte pressée cuite. Les échantillons ont été obtenus à partir de quelques superettes à Mostaganem. La description des échantillons testés est indiquée dans le tableau V. Nous avons choisi ces échantillons étant donné que le *S. thermophilus* fait partie de leur flore lactique (Tamime et Deeth, 1980; Nathanon, 2002).

Tableau V : Type des produits laitiers fermentés utilisés dans la présente étude.

Produit laitier fermenté	Type du produit	Date d'expiration
1 : Yaourt	Aromatisé étuvé	19-02-2018
2 : Yaourt	Aromatisé étuvé	20-02-2018
3 : Yaourt	Aromatisé étuvé	22-02-2018
4 : Fromage	Emmental	05/05/2018
5 : Yaourt	Aromatisé étuvé	27-02-2018
6 : Yaourt	Aromatisé brassé	02-03-2018
7 : Yaourt	Aromatisé brassé	27-02-2018
8 : Yaourt	Aromatisé	22-03-2018
9 : Yaourt	Aromatisé liquide brassé	14-02-2018
10 : Yaourt	Aromatisé brassé	26-02-2018
11 : Yaourt	Aromatisé étuvé	06-03-2018
12 : Fromage	Gruyère	10/07/2018
13 : Yaourt	Aromatisé étuvé	21-02-2018
14 : Yaourt	Aromatisé étuvé	07-03-2018
15 : Yaourt	Aromatisé étuvé	25-02-2018
16 : Yaourt	Aromatisé étuvé	03-03-2018
17 : Yaourt	Aromatisé étuvé	09-03-2018
18 : Yaourt	Aromatisé étuvé	26-02-2018
19 : Yaourt	Aromatisé brassé	04-02-2018
20 : Yaourt	Aromatisé brassé fruité	22 -02-2018
21 : Fromage	Gruyère	DND

DND : Donnée non disponible.

2. Milieux de culture et conditions de croissance

Les souches de *S. thermophilus* ont été isolées sur le milieu M17 (**annexe 1**), additionné de 2% (P/V) de lactose (LM17) et ajusté à pH 7. Il est utilisé sous les deux formes : liquide et solide par addition d'agar-agar à raison de 2% (P/V). Ce milieu est considéré comme étant un milieu favorable à l'isolement et à la culture de la plupart des coques de bactéries lactiques ; il favorise leur développement sous l'effet tampon du Bêta-glycérophosphate de Sodium (**Terzaghi et Sandine, 1975**).

Les streptocoques thermophiles sont en général des bactéries aérotolérantes, mais afin d'éviter une éventuelle action toxique de l'oxygène, les cultures sont incubées dans une jarre d'anaérobiose sans catalyseur en présence de 10% de CO₂.

Toutes les souches isolées et identifiées comme étant des *S. thermophilus* ont été conservées à courte durée par des fréquents repiquages sur le LM17 gélosé, pour une période ne dépassant pas un mois à + 4°C. Alors que la conservation à long terme a été effectuée à - 20°C sur le LM17, en présence de 20% de glycérol (**Bennama et al., 2012**).

3. Souches étudiées

La procédure d'isolement, nous a permis de retenir 18 souches de *S. thermophilus* à partir des échantillons de yaourt et 2 souches à partir des fromages : l'emmental et le gruyère. Comme souches de référence, nous avons utilisé trois souches de *S. thermophilus* (B05, B3 et B34) appartenant à la collection du Dr. Bennama. Ces souches ont été décongelées à partir d'un stock de cultures entreposé à -20°C, en présence de 20% de glycérol. Elles ont été réactivées sur le LM17 à 42°C, puis conservées à + 4°C sur le LM17 gélosé.

4. Isolement des *S. thermophilus*

4.1. Préparation des échantillons et des cultures d'enrichissement

Les échantillons de yaourt (1ml) ou de fromage (1g) ont été homogénéisés aseptiquement dans 9 ml de peptone saline (Annexe 02), afin d'obtenir une dilution mère au 1/10. Afin d'augmenter le nombre initial des streptocoques thermophiles présents dans les échantillons étudiés, nous avons procédé à une culture d'enrichissement, en ensemençant 100µl de la dilution mère dans 10ml de LM17. Les cultures ainsi réalisées sont incubées à 42°C pendant 18h.

4.2. Isolement sur milieu gélosé

À l'aide d'une anse de platine, une quantité de la culture d'enrichissement du bouillon LM17 a été prélevée et striée par la méthode d'épuisement sur des boîtes contenant le LM17 agar. Les boîtes sont ensuite incubées à 42°C pendant 24 à 48h.

5. Purification et pré-identification des souches

La purification des colonies apparues sur les cultures d'isolement a été réalisée par la méthode des quadrants, sur des boîtes contenant du LM17 agar. Après confirmation de leur pureté, les souches isolées ont fait l'objet d'une pré-identification en utilisant des tests rapides permettant juste de vérifier leur appartenance à la population des bactéries lactiques.

5.1. Étude morphologique

L'étude morphologique est portée sur la description des aspects morphologiques macroscopiques et microscopiques des souches (**Guiraud, 1998**).

5.1.1. Examen macroscopique

La description macroscopique en milieu liquide concerne l'examen à l'œil-nu des cultures (sans les agiter), en notant trois caractères cultureux des souches à savoir la turbidité, la formation d'une pellicule à la surface et le dépôt. Par ailleurs, l'examen macroscopique des colonies développées sur les milieux gélosés permet de déterminer la forme, la taille, le diamètre, le contour, la couleur et la texture des colonies.

5.1.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aérobies facultatives. Elle permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau selon la réaction suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Elle est mise en évidence sur une lame en verre bien nettoyée, en émulsionnant une colonie de l'isolat à tester prélevée à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'activité de la catalase. Le contraire indique par ailleurs, l'absence de cette activité enzymatique (**Delarras, 2007**).

5.1.3. Examen microscopique

Cet examen permet d'observer des bactéries vivantes ou fixées et colorées le plus souvent à l'aide d'un microscope optique à fond clair. L'observation microscopique permet de déterminer la mobilité, la forme cellulaire, le mode d'association et le Gram (**Delarras, 2014**).

5.1.3.1. Observation à l'état frais

Cette technique permet l'observation des cellules vivantes, avec la détermination de leur morphologie et de leur mobilité. A partir d'une culture jeune de 18h, une goutte est prélevée aseptiquement et déposée sur une lame propre. Ensuite, la préparation est recouverte d'une lamelle et l'observation se fait immédiatement à l'objectif 40. Les bactéries sont dites mobiles si les corps bactériens se déplacent et traversent le long du champ microscopique.

5.1.3.2. Observation après coloration de Gram

Cette technique est découverte par Hans Christian Joachim Gram en 1884. Un frottis est préparé à partir d'une suspension bactérienne, ce dernier est recouvert avec du cristal violet pendant 1 minute, puis l'excès est éliminé. Juste après, le frottis est traité deux fois avec une solution de lugol, pendant 30 secondes. Les lames sont décolorées en utilisant l'éthanol à 95°C pour (5 à 10 secondes), puis rincées immédiatement à l'eau distillée. Finalement, le frottis est recouvert par la fuchsine pendant 1 minute. Les lames sont rincées à l'eau distillée et séchées. L'observation se fait à l'immersion en utilisant l'objectif 100. Les bactéries dites « Gram négatives » apparaissent roses, tandis que les bactéries dites « Gram positives » sont colorées en violet (**Delarras, 2007**).

6. Identification biochimique partielle des souches

Nous rappelons que les produits laitiers fermentés industriels (Yaourt, Gruyère, Emmental) utilisés pour l'isolement des souches de *S. thermophilus* sont élaborés à base de ferments lactiques contenant principalement des souches industrielles de *S. thermophilus*. Pour ces raisons, la procédure d'identification des souches isolées a comporté un nombre limité de tests biochimiques.

6.1. Test de croissance sur le lait de Sherman

L'utilisation de colorants comme un moyen d'identification de certains groupes bactériens n'est pas rare. C'est le cas du bleu de méthylène qui permet de distinguer parfaitement les véritables bactéries lactiques, connues par leur pouvoir réducteur, du genre *Streptococcus* qui ne possède pas de réductase. La mise en évidence de la réductase est testée en présence du bleu de méthylène à raison d'une concentration finale de 0,1% (Sherman, 1937). Pour ce faire, une série de tubes à essai contenant 10 ml de lait demi-écrémé stérile (Candia) a été additionné de 1ml de bleu de méthylène à 1%. Le lait ainsi préparé est inoculé par les souches à tester à raison d'une concentration initiale de 1% (V/V) et incubé à 42°C pendant 24h (Sherman, 1937; Guiraud, 1998). Le résultat est révélé positif lorsque la couleur du milieu vire vers le blanc et négatif quand la couleur reste inchangée.

6.2. Test de croissance sur 6.5 % de NaCl

Parmi les autres caractéristiques inhabituelles de *S. thermophilus* est son extrême sensibilité au chlorure de sodium, certaines souches sont inhibées seulement par une concentration de 2% (Sherman, 1937). Ce test est réalisé par l'ensemencement des souches (1%) sur le milieu de Naylor et Sharpe (annexe 03) contenant une concentration de 6,5% (P/V) de NaCl. L'incubation s'effectue à 42°C pendant 24h.

6.3. Test de thermorésistance

Ce test d'identification consiste à vérifier la résistance des souches à une température égale à celle de la pasteurisation (Sherman et Stark, 1931). Il a été effectué en inoculant le bouillon LM17 avec 1% d'inoculum prélevé d'une pré-culture de 18h. Les cultures établies sont portées dans un bain-marie réglé à 63°C pendant 30 min. Après quoi les cultures sont refroidies sous un jet d'eau et incubées à 42°C pendant 24h.

Remarque : La croissance bactérienne dans un milieu liquide se manifeste par le développement d'un trouble. Pour cela, dans les tests de croissance sur 6,5% de NaCl et de thermo-résistance, la lecture des résultats consiste à détecter un trouble dans les tubes de chaque souche. L'absence de trouble indique un résultat négatif.

7. Identification de *S. thermophilus* par système "API"

Vu que les tests clés choisis par nos soins afin d'identifier les souches étudiées étaient limités, et comme il a été mis à notre disposition des galeries "API" 20 Strep et 20E, nous

avons donc complété l'identification des souches, en utilisant ces galeries "API". Il est vrai que la galerie API 20E n'est pas adaptée à l'identification des *S. thermophilus*; mais nous avons juste considéré quelques tests, en se basant sur les critères utilisés dans l'identification de cette espèce. Toutes les informations concernant les galeries utilisées sont citées en **annexe (07)**.

7.1. Tests d'identification de *S. thermophilus* compris dans les galeries utilisées

7.1.1. Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques sont connues par leurs propriétés fermentaires d'un nombre important de substrats glucidiques. L'identification de *S. thermophilus* est fondée sur sa capacité de fermenter des sucres principalement le lactose, l'inuline, le sorbitol, le mannitol, le galactose, la salicine, le cellobiose, le maltose, le melibiose et le raffinose (**Moschetti et al., 1998; Facklam, 2002; Bennama et al., 2012**).

7.1.2. Hydrolyse de l'esculine

Ce test vise à révéler la présence de l'enzyme esculine hydrolase, qui dégrade l'esculine (un hétéroside) en glucose et esculétine. L'esculétine donne en présence du citrate ferrique une coloration noire due à la formation d'esculine ferrique (**Guiraud, 1998**).

7.1.3. Recherche de l'uréase

Ce test concerne la mise en évidence de l'uréase qui convertit l'urée en ammoniac et dioxyde du carbone. Le *S. thermophilus* est la seule bactérie lactique possédant cette enzyme. La dégradation de l'urée alcalinise le milieu (**Zourari et al., 1992**).

7.1.4. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

Cette enzyme permet de libérer l'ammoniac à partir de l'arginine, elle joue un rôle important dans l'identification des bactéries lactiques. Le milieu utilisé contient un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol, si la couleur du milieu vire au jaune puis vers le violet, ceci indique la présence de l'enzyme et la dégradation de l'arginine. Si elle reste jaune, cela indique que la bactérie ne possède pas une ADH (**Thomas, 1973**).

8. Mise en évidence de la formation de biofilm

S. thermophilus est une espèce qui métabolise un nombre restreint de substrats glucidiques, tout en exhibant une haute affinité pour le lactose et peut également utiliser le saccharose, mais avec une efficacité moindre que le lactose (**Poolman et al., 1992; Hols et al., 2005**). Pour ces motifs, le protocole suivi dans l'étude du pouvoir d'adhérence et la formation de biofilm par les souches étudiées, le lactose et le saccharose ont été choisis comme source de carbone et additionnés au milieu M17 (LM17 et SM17) à raison d'une concentration de 3% (P/V).

8.1. Méthode d'évaluation en microplaque

Après trois essais incluant les 23 souches étudiées, nous avons mis au point le protocole suivant : le bouillon LM17 ou SM17 testé en présence ou en absence du lait demi-écrémé (10%) a été utilisé pour remplir des microplaques de 96 puits en polystyrène transparent. Chaque puit a étéensemencé à partir des pré-cultures de 18h réalisées avec les souches étudiées. Les puits témoins ont été remplis par les mêmes milieux stériles. Les microplaques ont été ensuite incubées à 42°C pendant 24h. Après incubation, le surnageant est retiré et les puits ont été rincés deux fois avec du tampon phosphate (PBS) (**annexe 04**). Les cellules adhérentes ont été colorées avec une solution aqueuse de cristal violet à 0,5% (P/V). Après 15min d'application, le cristal violet a été éliminé et les puits ont été rincés trois fois à l'eau bi-distillée stérile. La microplaque a été séchée pendant une quinzaine de minutes à température ambiante. La récupération du cristal violet retenu au niveau des cellules bactériennes a été effectuée par l'éthanol à 95%. Il a été déterminé par la lecture de l'absorbance à 595nm, en utilisant un spectrophotomètre type (**Jenway 6715UV/Vis. Spectrophotometer**).

Dans ce test l'évaluation est basée sur la comparaison des valeurs de la densité optique (DO) du film bactérien par rapport à la DO des témoins négatifs (milieux stériles). La capacité de formation de biofilm a été exprimée en utilisant la valeur seuil (DOc). La valeur seuil (DOc) est définie comme la moyenne de la DO des témoins négatifs plus trois fois l'écart-type des témoins négatifs

8.2. Méthode d'évaluation en Tubes (TM)

Cette évaluation d'aspect qualitatif a été établie selon la méthode de base décrite par **Christensen et al. (1985)**, en utilisant des tubes à hémolyse en verre stériles, et dans les mêmes conditions de cultures décrites précédemment avec les microplaques. Dans le protocole réalisé, un volume des bouillons LM17 et SM17 a été transvasé aseptiquement dans les tubes à hémolyse et inoculé par les pré-cultures des souches testées. Après incubation à 42°C pendant 18 h, les tubes ont été vidés de leur contenu et lavés avec du PBS, puis séchés à température ambiante. Chaque tube a ensuite été coloré par du cristal violet à 0,5% pendant 15min. Après élimination du colorant, les tubes ont été lavés à l'eau bi-distillée stérile, puis séchés renversés à température ambiante. Le test est considéré positif quand la coloration révèle une couche adhérente sur la surface interne des tubes.

8.3. Détection de la production de "Slime" par la méthode de rouge Congo agar

La production du "slime" a été évaluée par la méthode de culture sur rouge Congo agar (RCA), selon un protocole modifié adapté d'après celui décrit initialement par **Freeman et al. (1989)**. Le milieu RCA a été préparé avec du bouillon LM17 et SM17 contenant 0,08% de rouge Congo (**Annexe 05**) enrichi de lait écrémé stérile. Les boîtes de RCA inoculées ont été incubées pendant 24h à 42°C. Concernant la lecture, différents aspects macroscopiques ont été décrits (**Freeman et al., 1989; Arciola et al., 2001; Darwish et Asfour, 2013**); mais en général sur le RCA, les souches productrices de "slime" forment des colonies noires, tandis que les souches non productrices développent des colonies rouges. D'autres descriptions macroscopiques sont citées dans la partie résultats et discussion.

9. Détection de certains acteurs impliqués dans la formation de biofilm

9.1. Détection de la production des EPS par culture sur rouge de ruthénium agar

Pour détecter les souches productrices d'EPS, nous avons suivi le protocole de **Dabour et La pointe (2005)**, en utilisant le milieu M17 additionné de 0,08% de rouge de ruthénium (RRLM17 ou RRS17) (**Annexe 06**). Après ensemencement et incubation à 42°C pendant 24h, les colonies des souches (**EPS+**) apparaissent blanches à roses claires et celles des souches (**EPS-**) roses à rouges.

9.2. Mise en évidence des EPS capsulaires

Sous certaines conditions de culture les bactéries lactiques peuvent former une capsule qui entoure le corps bactériens, les cellules sont alors dites « encapsulées ». La mise en évidence de la capsule a été établie par la technique de coloration négative à l'encre de Chine selon le protocole décrit par **Mozzi et al. (2001)**. Cette technique consiste à déposer sur une lame propre une goutte de la préculture à proximité d'une goutte d'encre de Chine. La préparation est recouverte d'une lamelle, tout en évitant l'introduction de bulles d'air. L'observation microscopique est effectuée à l'objectif 40, ensuite à l'immersion en utilisant l'objectif 100. La capsule apparaît comme une zone claire autour de la bactérie.

10. Analyses statistiques

Les résultats du test de la formation de biofilm sur microplaque en polystyrène représentent la moyenne de trois essais. Les traitements statistiques (Analyse de la variance : Anova) ont été effectués par "XLSTAT 2018". La signification a été fixée à $p < 0.05$.

Résultats & Discussion

1. Isolement de *S. thermophilus*

Lors de cette étude, nous avons isolé au total vingt souches de *S. thermophilus*, dont dix-huit souches issues du yaourt et deux souches d'origine fromagère (Emmental et Gruyère).

2. Pré-identification de *S. thermophilus*

La pré-identification est une étape importante dans les procédures d'identification des espèces microbiennes. Le groupe des bactéries lactiques peut être rapidement pré-identifié, après la détermination de ses aspects macroscopiques et microscopiques, ainsi qu'une recherche de la catalase (De Roissart et Luquet, 1994).

2.1. Aspects macroscopiques et test à catalase

Cultivées sur le bouillon LM17 après 24h d'incubation à 42°C, les souches de *S. thermophilus* forment un trouble homogène avec un dépôt cellulaire au fond du tube un peu collant, tout en donnant un aspect tourbillonnant.

Sur le LM17 agar, les souches développent de petites colonies homogènes, blanchâtres, lisses, à élévation convexe et à contour régulier. Ces aspects macroscopiques typiques à l'espèce *S. thermophilus* ont été largement décrits dans la littérature (Guiraud, 1998; Ayhan *et al.*, 2005; Bennama *et al.*, 2012).

Par ailleurs, le test de catalase a été noté négatif, car aucun dégagement gazeux n'a été observé après le traitement des colonies par l'eau oxygénée (Fig.9). Le test à catalase constitue un test clé dans l'identification du groupe des bactéries lactiques, qui sont dépourvues de cette activité enzymatique (Dellaglio *et al.*, 1994; Guiraud, 1998).



Fig.9 : Aspect de la réaction du test de la catalase réalisé avec les souches *S. thermophilus* B05 et E17.

2.2. Aspects microscopiques

L'examen microscopique à l'état frais a permis de donner un aperçu sur la forme, l'arrangement cellulaire, et aussi de confirmer le caractère immobile des souches. En outre, l'observation microscopique après coloration de Gram a montré la présence de cellules sous forme ovoïde, à Gram positif, organisées en chaînettes plus ou moins longues (**Fig. 10**). Ces aspects micro-morphologiques caractérisent l'espèce *S. thermophilus* et ont été signalés dans de nombreux travaux (**Sherman, 1937; Moschetti et al., 1998; Delorme, 2008; Bennama et al., 2012**).

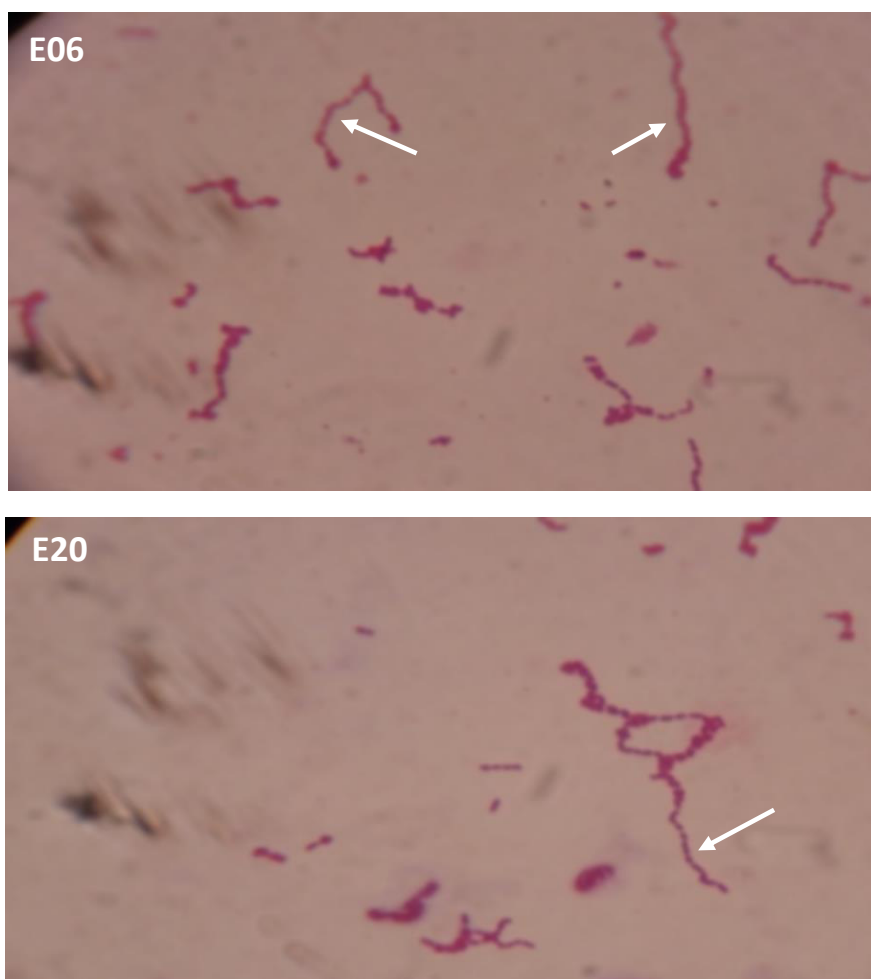


Fig.10 : Aspect microscopique de *S. thermophilus* E06 et E20, après coloration de Gram, indiquant la forme ovoïde et l'arrangement en chaînettes.

- Observation effectuée à l'objectif 100.

Les flèches indiquent le mode d'association en chaînettes.

3. Identification biochimique partielle des souches

3.1. Croissance sur le lait de Sherman

Les souches isolées sont incapables de croître sur le lait de Sherman (en présence de 0,1% de bleu de méthylène, le milieu ne vire pas en blanc) (**Fig. 11**). Ce résultat est lié à l'absence de la réductase, confirme en effet, l'appartenance des souches testées au genre *Streptococcus* (Sherman, 1937; Guiraud, 1998).

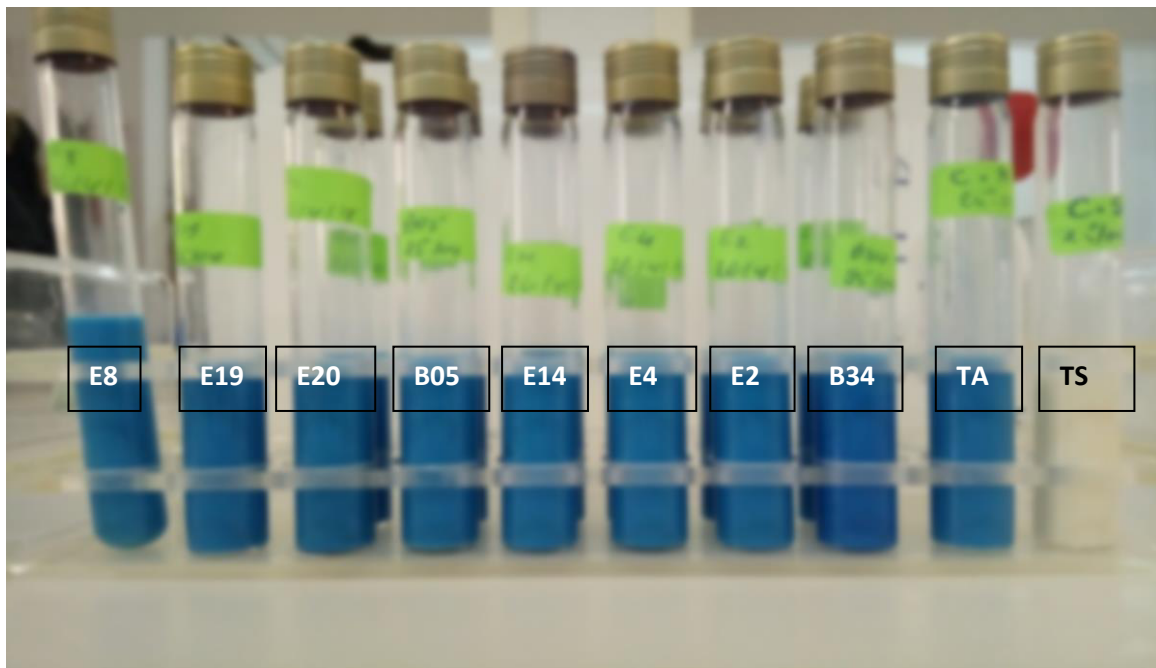


Fig. 11 : Résultat du test de croissance des souches de *S. thermophilus* sur le lait de Sherman, après 24h d'incubation à 42°C.

TS : Témoin sans bleu de méthylène; **TA** : Témoin avec bleu de méthylène.

3.2. Croissance à une concentration de 6.5 %de NaCl

Toutes les souches isolées sont incapables de se développer sur le milieu Nayler et Shape à une concentration de 6.5% de NaCl (**Fig. 12**). Ce résultat s'accorde avec les données bibliographiques portant sur la sensibilité de l'espèce *S. thermophilus* au chlorure de sodium, sachant que cette espèce est inhibée à une concentration de 4% de NaCl (Sherman, 1937; Delorme, 2008; Moschetti *et al.*, 1998; Maqsood *et al.*, 2013).



Fig. 12: Résultat du test de croissance des souches de *S. thermophilus* E12 et E14 à une concentration de 6.5 % de NaCl, indiquant l'absence de croissance après 24h d'incubation à 42°C. T : témoin.

3.3. Test de thermorésistance

Les résultats de ce test ont montré la présence d'un trouble au niveau des tubes, confirmant ainsi la thermorésistance des souches à une température de 63°C. Ceci s'accorde avec les études rapportant que le *S. thermophilus* a la capacité de croître à des températures élevées comprises entre 50°C et 65°C (Sherman, 1937; Delorme, 2008).

3.4. Identification de *S. thermophilus* par système "API"

Les résultats obtenus avec le système "API 20 STREP" et "20E" ont confirmé l'appartenance des souches étudiées au rang de l'espèce *S. thermophilus*. Le profil d'identification obtenu avec les souches testées est présenté dans les figures (13 et 14) et le Tableau VI. L'identification par le système API a montré que les souches testées ont l'aptitude à hydrolyser l'urée, alors qu'elles sont incapables d'hydrolyser l'esculine et l'arginine.



Fig.13: Aspects de la galerie Api 20E obtenus avec les souches *S. thermophilus* E4, E14 et B05.

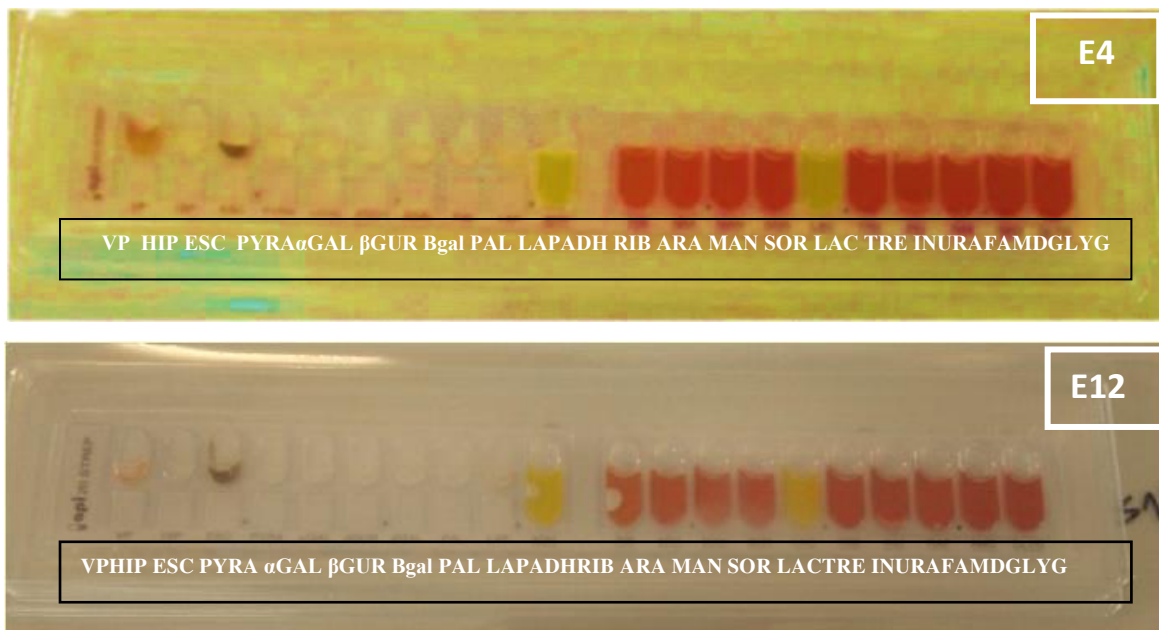


Fig.14 : Aspects de la galerie "Api Strep" obtenus avec les souches *S. thermophilus* E4 et E12.

ONPG : Béta galactosidase; **ADH** : Arginine dihydrolase; **LDC** : Lysine décarboxylase ; **ODC** : Ornithine décarboxylase; **CIT** : Utilisation de citrate; **H₂S** : Production d'H₂S; **URE** : Uréase; **TDA** : Tryptophane désaminase; **IND** : Production d'indole; **VP** : Production d'acétone; **GEL** : gélatinase; **GLU** : glucose; **INO** : Inositol; **RHA** : Rhamnose; **SAC** : saccharose; **MEL**: melibiose; **AMY** : Amygdaline; **Hip** : Hippurate; **ESC**: Esculine; **PYRA**: pyrrolidonyl arylamidase; **αGAL**: α galactosidase; **βGUR** :β glucuronidase; **βGAL** :βgalactosidase; **PAL**: Phosphatase alcaline; **LAP** : Leucine aminopeptidase; **RIB** : Ribose; **ARA**: Arabinose; **MAN** :Mannitol; **SOR** :Sorbitol; **LAC**: Lactose; **TRE** :Trehalose; **INU** :Inuline ; **RAF**: Raffinose; **AMD** :Amidon ; **GLYG**: Glycogène.

Concernant la source de carbone utilisée par les isolats, il semble clair que le lactose est le sucre majoritairement utilisé lors de leur métabolisme fermentatif (**Fig. 14**). Cela est confirmé aussi par la positivité du test de la β -galactosidase (ONPG), inclut dans la galerie Api 20E. Par ailleurs, les isolats sont incapables de fermenter d'autres carbohydrates tels que l'amygdaline, l'amidon, le raffinose et l'inuline. Ce profil fermentaire caractérisant l'espèce *S. thermophilus* est décrit dans de nombreuses études (**Sherman, 1937; Delorme, 2008; Bennama et al., 2012**).

En tenant compte de l'origine des isolats (yaourt et fromage à pâte cuite) et suite aux résultats de cette identification, nous confirmons l'appartenance des souches isolées à l'espèce *S. thermophilus*.

Tableau VI .Tests d'identification phénotypique, physiologique et biochimique des souches de *S. thermophilus*.

Souches	Gram	Catalase	ADH	Esculine	Lactose	6.5% de NaCl	VP	Ribose	Arabinose	Mannitol	Sorbitol	Tréhalose	Inuline	Raffinose	Amidon	Glycogène	Lait de Sherman	Amygdaline	Uréase	o-nitro-phényl-β-D-galactopyranoside(ONPG)	Test deThermorésistance	
E1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
E2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E8	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E9	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E10	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E11	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E12	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E14	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E15	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E16	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E17	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E18	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E19	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E20	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
B05	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
B03	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
B34	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+ : test positif, - : test négatif.

4. Mise en évidence de la formation de biofilm

4.1. Évaluation en microplaque

Toutes les souches isolées ont été testées pour leur capacité à former des biofilms sur microplaque en polystyrène. Nous rappelons que dans une première étape chaque souche a subi 4 tests (sur milieu M17 lactosé ou saccharosé en présence ou en absence du lait). Dans une seconde étape, les souches ayant présenté un pouvoir d'adhérence visible, après coloration des puits au cristal violet ont été sélectionnées pour refaire les tests. Ces souches sont: E1, E2, E4, E6, E8, E11, E12, E14, E17, E19, E20, B03, B05 et B34.

Le test sur microplaque utilisant le cristal violet est une méthode indirecte de quantification des biofilms. Le cristal violet ne colore pas spécifiquement toute la biomasse viable ou morte, ni la matrice du biofilm. Cette coloration évalue la réponse globale du biofilm d'une souche (**Burton et al., 2007**).

L'étape de la récupération du cristal violet qui a pénétré dans les cellules, en utilisant l'éthanol 95%, a permis de donner une première appréciation sur la capacité d'adhérence des souches étudiées. Les aspects des microplaques avant et après récupération du cristal violet sont illustrés par les **figures 15 et 16**. Les résultats obtenus avec les souches sélectionnées montrent qu'elles sont capables d'adhérer au polystyrène (**Fig. 15, 16**), révélant ainsi leurs aptitudes à s'organiser en biofilm. La capacité de former un biofilm est liée principalement à l'adhérence du microorganisme à une surface (**Costerton et al., 1987**). Comme première analyse, cette faculté à adhérer à la surface du polystyrène varie entre ces souches de *S. thermophilus*. Ceci a été confirmé dans un premier temps avec les valeurs de la densité optique lues à 595nm et dans un second temps à travers les traitements relatifs à la classification des souches en catégories par rapport à la valeur seuil (DOc).

Peu d'informations sont connues sur la capacité de *S. thermophilus* à former des biofilms et à y vivre, mais les données bibliographiques disponibles (**Licitra et al., 2007; Lortal et al., 2009; Couvigny et al., 2015**) sur la capacité de l'espèce *S. thermophilus* d'adhérer aux surfaces et de former un biofilm ont déjà signalé l'existence de variations, à savoir des différences entre les souches au sein de cette espèce. **Bassi et al. (2017)** ont rapporté que la souche *S. thermophilus* UC8547, connue pour ses propriétés d'acidification est dotée d'une capacité élevée à former un biofilm sur de l'acier inoxydable dans des conditions environnementales semblables à l'environnement laitier.

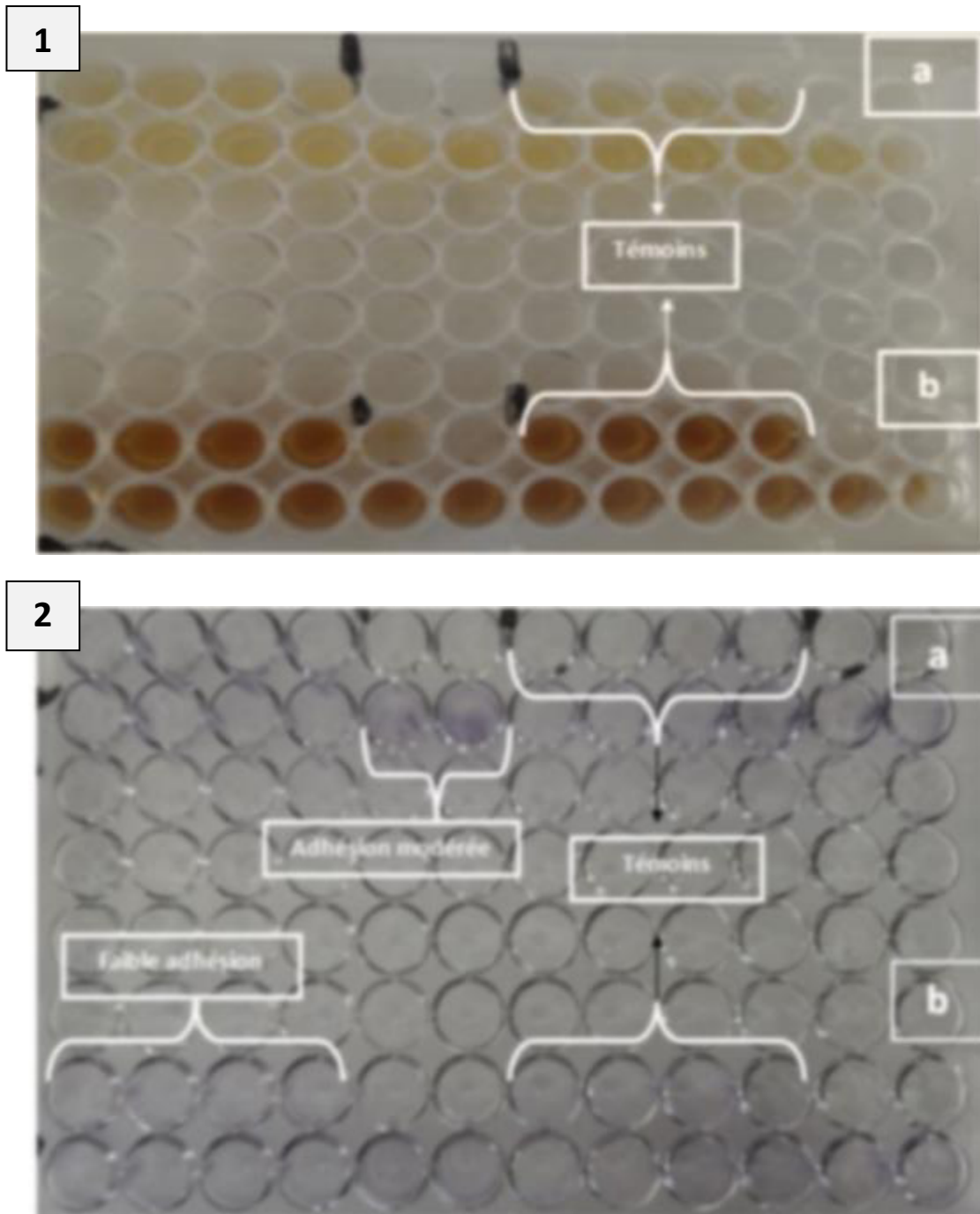


Fig. 15 : Résultats montrant l'aspect des microplaques en absence du lait après 18h d'incubation à 42°C. **1** : avant coloration au cristal violet; **2** : Après récupération du cristal violet.

(a): Milieu saccharosé; **(b)**: Milieu lactosé.

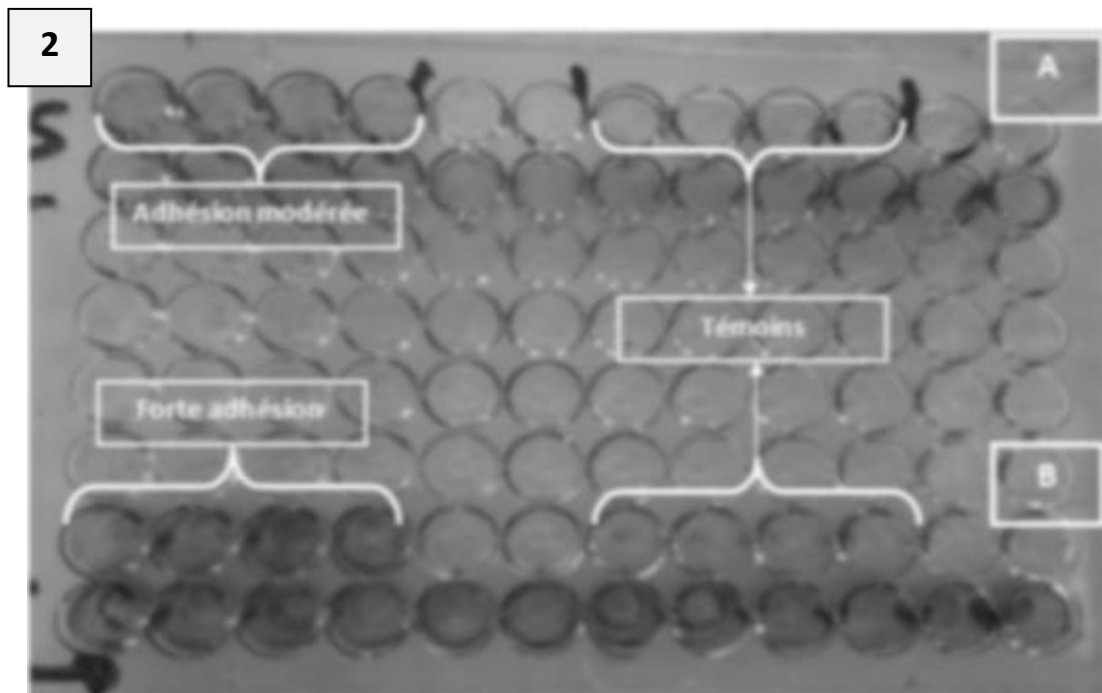
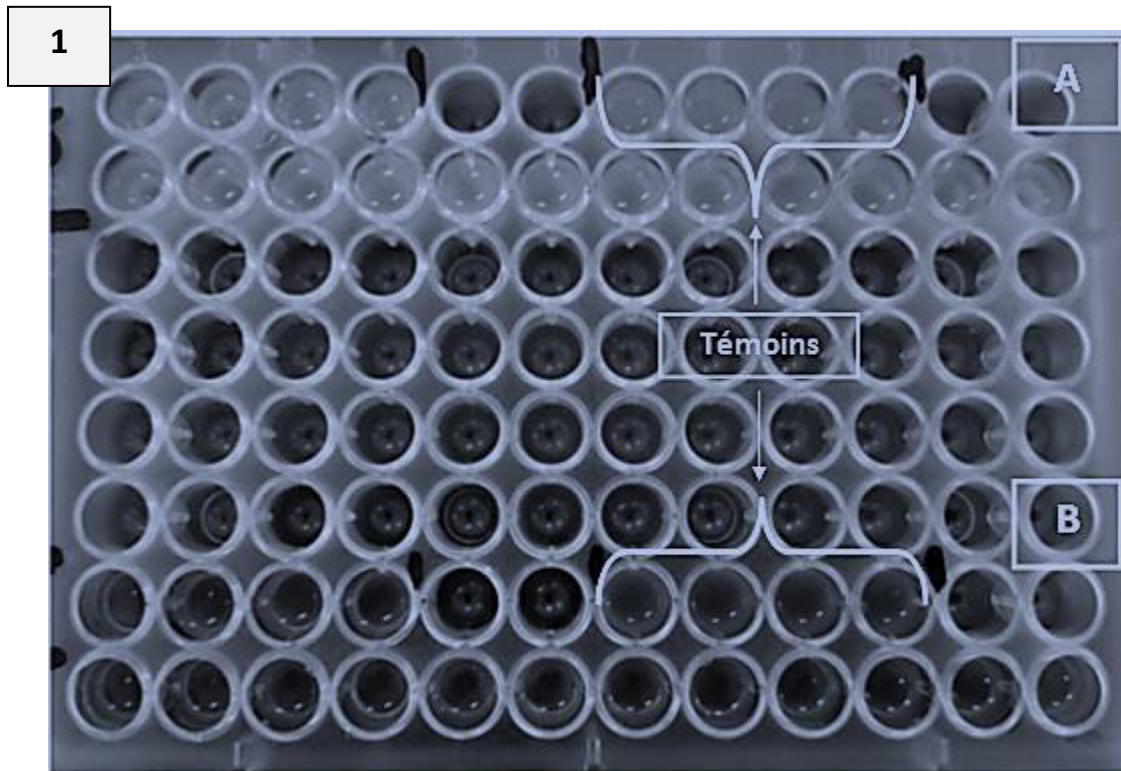


Fig. 16 : Résultats montrant l'aspect des microplaques en présence du lait, après 18h d'incubation à 42°C. **1** : avant coloration au cristal violet; **2** : Après récupération du cristal violet.

(A): Milieu saccharosé; **(B)**: Milieu lactosé.

Les valeurs de la densité optique obtenues avec le cristal violet récupéré, sont indiquées dans les figures **17**, **18**, **19** et **20**. L'analyse de la variance portée sur ces valeurs a permis de révéler quelques différences significatives entre les souches étudiées.

Les résultats observés indiquent clairement que la formation du biofilm varie d'une souche à une autre. Cette variabilité est associée directement à la composition du milieu. En présence du saccharose dépourvu du lait. Les souches E2, B03, E17 et B34 ont montré une différence significative (**p<0.05**) avec les autres souches. La souche E11 s'avère la meilleure formatrice de biofilm (**Fig. 17**).

Quand le milieu saccharosé est additionné de lait, les souches E12, E14, E17, E2 et E20 affichent une différence significative par rapport aux autres souches (**P<0.05**). La souche E14 apparaît une forte formatrice de biofilm (**Fig. 18**). Une nuance significative (**P<0.05**) est observée en milieu lactosé dépourvu de lait entre les souches E2, E17, B03, B05 et B34 d'une part et les autres souches d'autre part. La souche E8 s'est montrée comme étant la meilleure formatrice de biofilm (**Fig. 19**).

Lorsque le milieu lactosé est additionné de lait, les souches E2, E6, E12, E17, E19, E20, B05 et B34 ont présenté une variabilité significative avec les autres souches (**P<0.05**) (**Fig. 20**). La souche B34 est signalée comme étant une meilleure formatrice de biofilm.

Par ailleurs, il apparaît nettement que la composition du milieu de croissance a une influence sur l'adhérence des souches (**Fig. 18 et Fig. 20**). Les souches ont en effet, exhibé une forte adhérence dans le milieu additionné de lait, en présence de saccharose et du lactose.

Les résultats de cette étape ont montré que le lait stimule l'adhérence en présence du saccharose et du lactose. La souche E19 s'est montrée une forte formatrice de biofilm, vu qu'elle a été la seule qu'a eue la capacité d'adhérer sur les microplaques, en donnant les valeurs de la DO les plus élevées et ce dans la majorité des conditions établies, suivie par les souches E8, E12, E14, E17 et E20. Ces souches ont affiché une forte adhésion dans les deux conditions (quelle que soit la nature de la source de carbone (lactose ou saccharose), et en présence ou en absence du lait.

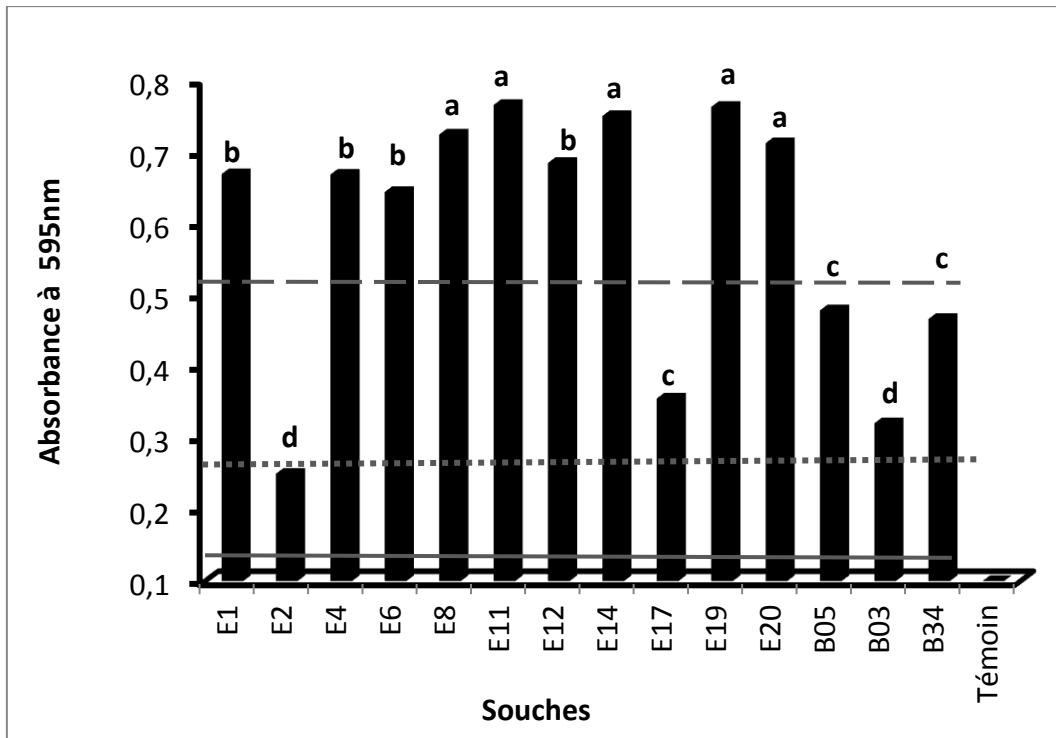


Fig. 17 : Capacité de formation de biofilm par les souches de *S. thermophilus* sur microplaque en polystyrène, après 24h d'incubation en bouillon M17 saccharosé et en absence de lait.

Les lettres a, b, c, d et f représentent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

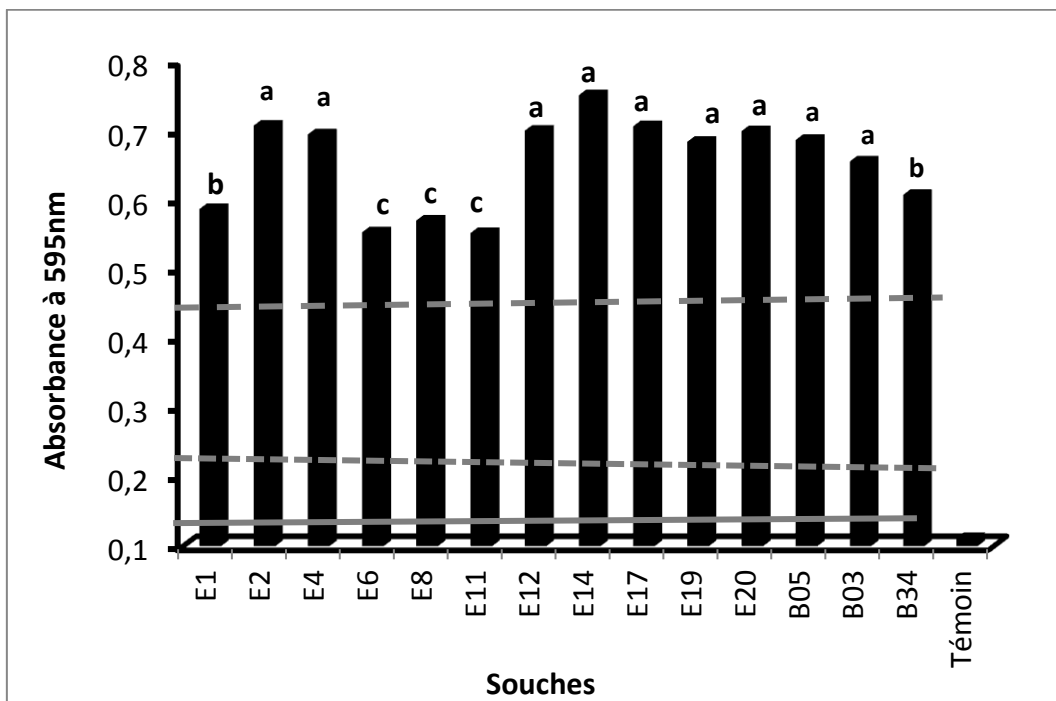


Fig. 18 : Capacité de formation de biofilm par les souches de *S. thermophilus* sur microplaque en polystyrène, après 24h d'incubation en bouillon M17 saccharosé additionné de lait.

Les lettres a et b représentent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

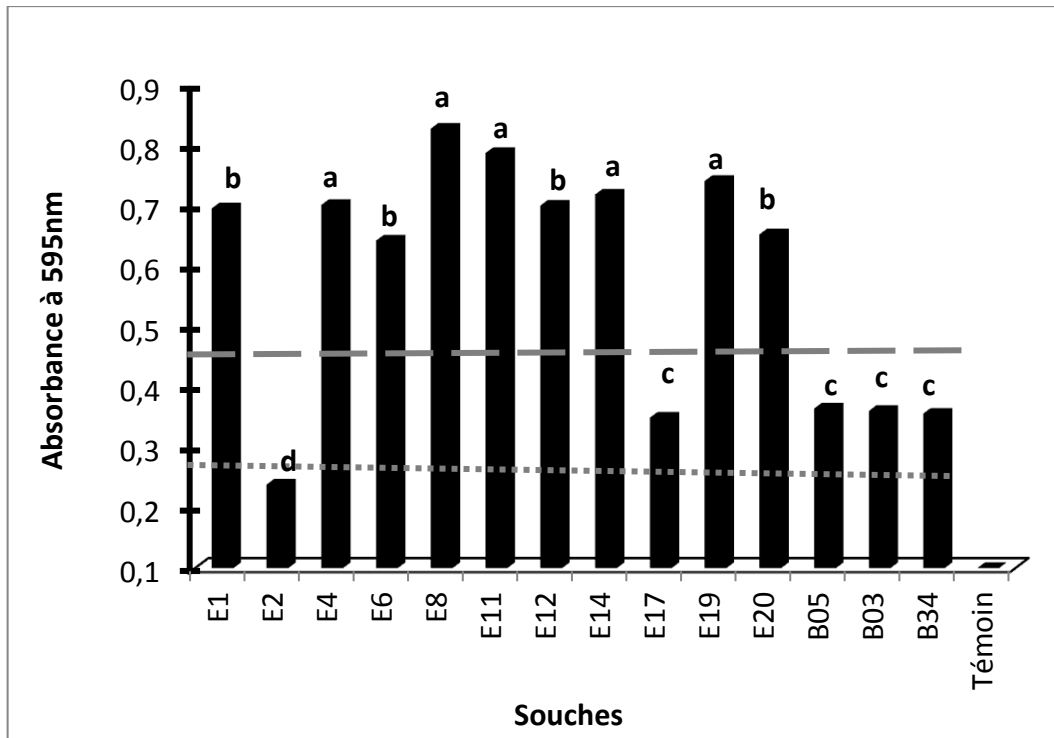


Fig. 19: Capacité de formation de biofilm par les souches de *S. thermophilus* sur microplaque en polystyrène, après 24h d'incubation en bouillon M17 lactosé et en absence de lait.

- Les lettres a, b, c, représentent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

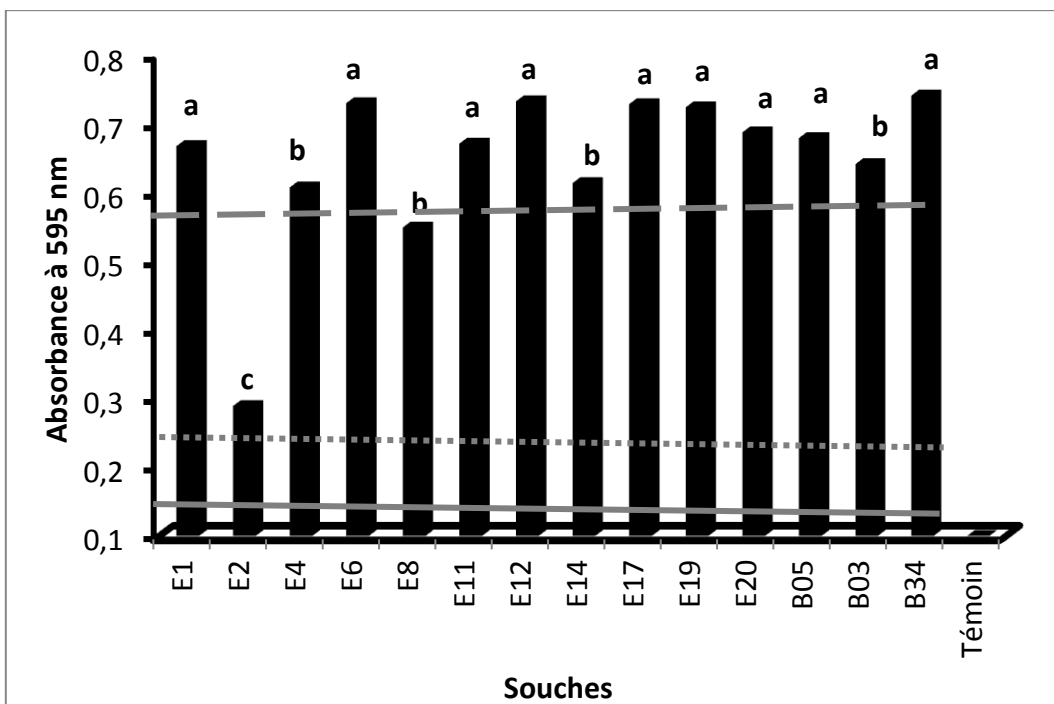


Fig. 20 : Capacité de formation de biofilm par les souches de *S.thermophilus* sur microplaque en polystyrène, après 24h d'incubation en bouillon M17 lactosé en présence de lait.

- Les lettres a, b, c, d et f représentent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

Selon **Diaz et al. (2016)**, certaines bactéries lactiques (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus parabuchneri*), ont une adhérence alternant entre l'aspect fort et faible. En outre, les résultats d'une autre étude ont trouvé que toutes les espèces de *Lactobacillus* testées sont de fortes formatrices de biofilm, sur des microplaques en polystyrène (**Gomez et al., 2016**). **Chen et al. (2017)** ont constaté que la capacité de formation de biofilm par certaines bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc citreum*) est influencée par la composition du milieu (NaCl et saccharose), son pH initial ainsi que certaines conditions de culture en relation avec la concentration de l'inoculum et la température d'incubation.

Par ailleurs, comme il a été signalé plus haut, la détermination de la valeur seuil (OD_c), a permis de classer les souches en catégories, tel il est indiqué dans le **tableau VII**. Les souches testées alternent généralement entre forte adhérente ou modérée. Cette classification a révélé la variabilité liée à la composition du milieu de culture. L'adhérence des souches de *S. thermophilus* à la surface du polystyrène a été fortement modulée par le milieu saccharosé additionné de lait. Parallèlement, le milieu lactosé additionné de lait a exercé les mêmes effets, tout en favorisant une forte adhérence de la majorité des souches testées. Ce n'est pas le même constat en absence du lait (quelle que soit la source de carbone), où l'adhérence des souches varie entre l'aspect fort (9 souches), modéré (4 souches) et faible (1 souche).

Tableau VII. Classification de l'adhérence des souches sélectionnées de *S. thermophilus* par la méthode de microplaque en polystyrène.

Source de carbone	Lait	Valeur seuil	Adhérence	Nombre de souches
Lactose	+	OD ≤ 0.144	Non adhérente	0
		0.144 < OD < 0.289	Faible adhérente	0
		0.289 < OD ≤ 0.578	Adhérente modérée	2
		OD ≥ 0.578	Forte adhérente	12
Lactose	-	OD ≤ 0.133	Non adhérente	0
		0.133 < OD < 0.267	Faible adhérente	1
		0.267 < OD ≤ 0.533	Adhérente modérée	4
		OD ≥ 0.533	Forte adhérente	9
Saccharose	+	OD ≤ 0.112	Non adhérente	0
		0.112 < OD < 0.223	Faible adhérente	0
		0.223 < OD ≤ 0.447	Adhérente modérée	0
		OD ≥ 0.447	Forte adhérente	14
Saccharose	-	OD ≤ 0.130	Non adhérente	0
		0.130 < OD < 0.261	Faible adhérente	1
		0.261 < OD ≤ 0.523	Adhérente modérée	4
		OD ≥ 0.523	Forte adhérente	9

+ : avec lait; - : sans lait.

4.2. Méthode d'évaluation en Tubes (TM)

Cette méthode présente une technique classique pour la mise en évidence de la formation de biofilm, basée sur l'appréciation visuelle de l'adhérence cellulaire à une surface lisse par la mention présence/absence. Après une période d'incubation de 24h à 42°C et après coloration, nous avons remarqué et pour la majorité des souches une adhérence faible, avec formation d'un film à peine visible à la surface interne des tubes à hémolyse. Cette adhérence a été quand même remarquable en présence du lactose comme source de carbone, ce qui n'est pas le cas avec le saccharose. En absence du lait, nous avons constaté une diminution nette du pouvoir d'adhérence des souches. L'intensité de cette adhérence diminue encore plus, quand la source de carbone est changée du lactose au saccharose. La formation du biofilm est considérable dans les milieux contenant du lait; sachant que le lactose et le lait induisent la formation de la capsule et du biofilm par l'augmentation de la production du polysaccharide intercellulaire adhésine "PIA" (Poutrel *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 2014). Comparativement aux autres souches, la souche E8 sur le LM17 additionné de lait a présenté un aspect différent, elle s'adhère fortement au fond du tube par la formation d'un agrégat important (Fig. 21). Par ailleurs, les souches E4, E6, E17, E20 et B05 ont montré une adhésion modérée, sauf que la souche B05 s'adhère plus en se localisant dans une zone de la périphérie du tube (Fig. 21). Cette souche a aussi présenté un aspect remarquable sur le milieu saccharosé additionné de lait. En outre, testées dans les mêmes conditions de culture et en absence de lait, les souches ont exprimé une faible adhérence par rapport à celle obtenue avec le lait. En milieu lactosé (Fig. 23), seulement quatre souches (E1, E12, E17 et B03) ont montré une adhérence faible à modérée par rapport aux autres souches, qui ont affiché une très faible adhérence. En milieu saccharosé (Fig. 24), une faible adhérence a été notée sur les souches E6, E17 et B03. Le reste des souches ont été qualifiées comme de très faibles adhérentes. L'adhérence faible observée en absence de lait, confirme la théorie que le lait stimule l'adhérence aux surfaces, tout en favorisant la formation de biofilm par certaines souches de *Streptococcus uberis* (Vanhimo *et al.*, 2011). Selon les mêmes auteurs les composants du lait stimulent la formation de biofilm, en augmentant l'expression des protéines de surface. Un autre travail a confirmé ce fait, puisque la formation de biofilm est faible en absence du lait, et que cette formation est induite par des nutriments contenus dans le lait (Vanhimo *et al.*, 2011; Mohd Yusof *et al.*, 2017).

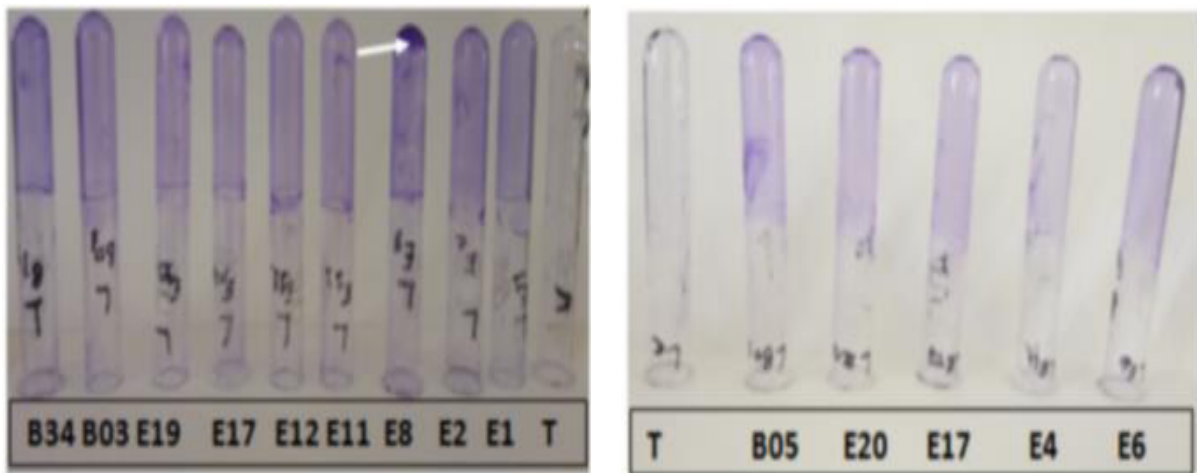


Fig.21: Formation de biofilm par les souches sélectionnées de *S. thermophilus*. Évaluation par la méthode en tubes sur le LM17 avec lait, après incubation à 42°C pendant 24h.

T : témoin. La flèche indique une forte adhérence.

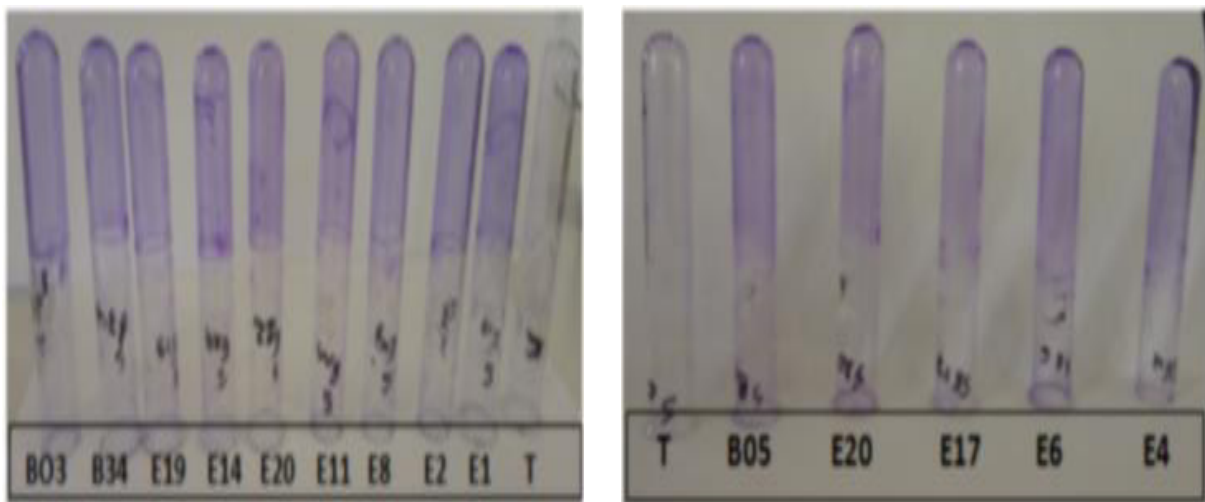


Fig. 22: Formation de biofilm par les souches sélectionnées de *S. thermophilus*. Évaluation par la méthode en tubes sur le SM17 avec lait, après incubation à 42°C pendant 24h.

T : témoin.

Il est vrai que l'inconvénient majeur de cette méthode réside dans la difficulté à distinguer une formation modérée d'une formation faible de biofilm (**Bakir et Ali, 2016**). Des études ont montré que la méthode en tubes n'est pas proposée comme étant un test de choix pour cribler et identifier les souches formatrices de biofilm (**Christensen et al., 1995; Mathur et al., 2006; Hassan et al., 2011**). **Ruzicka et al. (2009)** ont signalé que la méthode en tubes est meilleure par rapport à la gélose au rouge Congo. L'avantage de cette méthode est qu'elle n'exige pas une mesure de la densité optique par le spectrophotomètre. La TM reste quand même utiliser comme une méthode pour la détection de la formation de biofilm par les bactéries.

L'adhésion faible exprimée par cette méthode est liée aux propriétés hydrophiles de la surface en verre des tubes à hémolyse. L'adhérence de *S. thermophilus* est très substratum-dépendante (**Boulangé-Petermann et al., 1993**). Les microorganismes hydrophobes adhèrent fortement aux surfaces hydrophobes non polaires, comme le plastique et le téflon, alors que les microorganismes hydrophiles adhèrent plus fortement aux surfaces hydrophiles comme le métal et le verre (**Fletcher et Loeb, 1979; Boulangé-Petermann et al., 1993; Grivet et al., 2000; Briandet et al., 2001**). Selon le fournisseur "Greiner Bio-One", la surface en polystyrène est hydrophobe, sachant que la surface cellulaire de *S. thermophilus* est ainsi hydrophobe, ce qui permet une bonne adhérence, par rapport à celle observée sur des surfaces hydrophiles comme le verre (**Couvignyet et al., 2015**).

Jusqu'à présent, les deux méthodes testées, nous ont permis de mettre en évidence la capacité de nos souches à adhérer à des surfaces différentes (verre et polystyrène). La méthode en microplaque à faciliter l'appréciation de l'adhérence de chaque souche, en déterminant quantitativement quatre catégories de souches. Cependant, la méthode en tubes a seulement permis de décrire l'adhérence des souches, car il est difficile comme il a été signalé précédemment, de distinguer les souches adhérentes faibles, des souches adhérentes modérées. Cette technique demeure limitée à une détection qualitative.

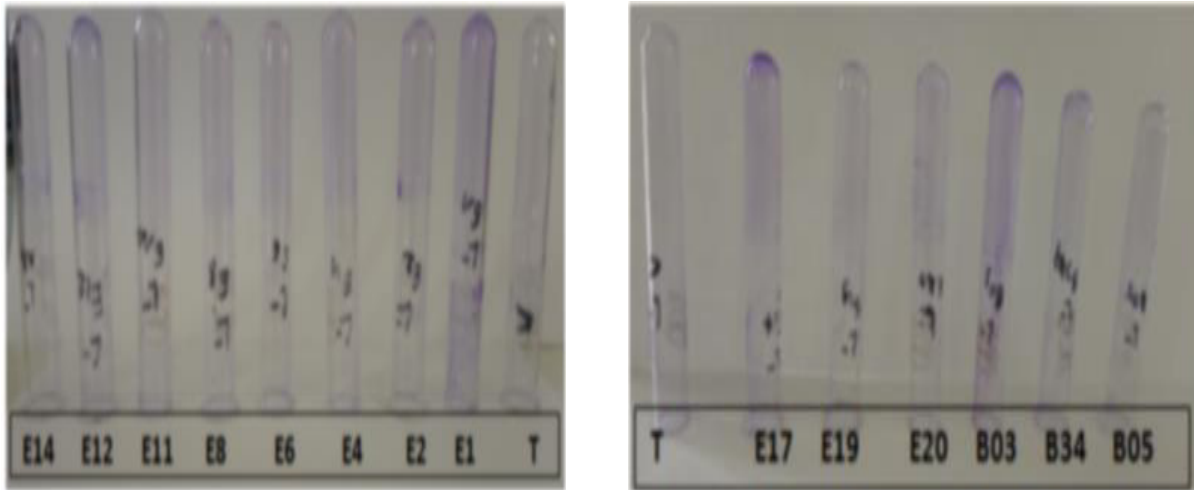


Fig.23 : Formation de biofilm par les souches sélectionnées de *S.thermophilus*. Évaluation par la méthode en tubes sur le LM17 sans lait, après incubation à 42°C pendant 24h.

T : témoin.

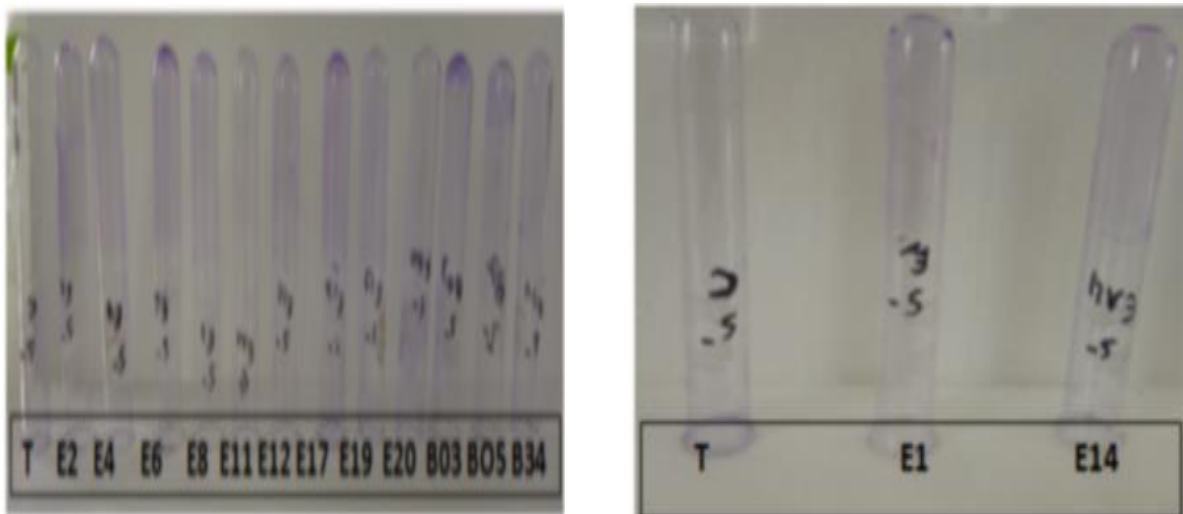


Fig.24: Formation de biofilm par les souches sélectionnées de *S. thermophilus*. Évaluation par la méthode en tubes sur le SM17 sans lait, après incubation à 42°C pendant 24h.

T : témoin.

4.3. Production de "Slime" sur gélose au rouge Congo (RCA)

Chez les bactéries, la production d'une couche mince de nature polysaccharidique, appelée "slime" constitue un facteur majeur dans la formation du biofilm, en jouant un rôle remarquable dans l'adhérence et la colonisation des surfaces (O'Gara et Humphreys, 2001). Chez *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*, le "slime" est composé principalement d'un polysaccharide intercellulaire adhésine (PIA), où il représente probablement le composant majeur de la matrice extracellulaire du biofilm (Joo et Otto, 2012).

La méthode de la gélose au rouge Congo permet de détecter la formation de biofilm par la mise en évidence de la production de "slime" (Freeman *et al.*, 1989). Les souches de *S. thermophilus* évaluées par cette méthode ont développé après 24h d'incubation à 42°C, des colonies d'apparence variable, dont la couleur oscille entre le rose clair, le rouge et le noir (Fig. 25 et 26). Nous signalons qu'aucun changement dans la couleur des colonies n'a été observé après 48h d'entreposage à température ambiante. Cela propose que l'incubation pendant 24h est suffisante pour la production de "slime" par *S. thermophilus*; et que ses étapes de formation de biofilm n'ont pas besoin de métabolites secondaires ou de molécules issus du métabolisme secondaire pendant la phase stationnaire.

En fait, concernant le sens de la couleur de la colonie, de multiples interprétations ont été proposées, et d'ailleurs certaines études montrent que l'aspect sec correspond aux souches productrices de "slime" sans donner d'importance à la couleur (noire, rouge ou rose) (Curarella *et al.*, 2004; Knobloch *et al.*, 2002; Dubravka *et al.*, 2010).

Pour le traitement de ces résultats, nous avons calculé un pourcentage, en se basant sur le nombre de souches positives dans chaque catégorie de couleur. Les résultats relatifs sont illustrés par les figures (Fig. 27 et 28). Il a été remarqué et indépendamment de la source de carbone (saccharose ou lactose) que 42,86% des souches (E2, E4, E6, E11, E17, B03 et B34) développent des colonies noires sèches sur le RCA. Plusieurs auteurs (Darwish et Asfour, 2013; Kaiser *et al.*, 2013; Casagrande-Proietti *et al.*, 2015) indiquent que cet aspect (colonie noire) est un signe majeur d'une forte production de "slime". La couleur noire est due à une association entre la couche épaisse du "slime" et le colorant rouge Congo. La diminution de cette association ou de l'épaisseur du "slime" entraîne un aspect de couleur plus claire (Fabre-klein *et al.*, 2015).

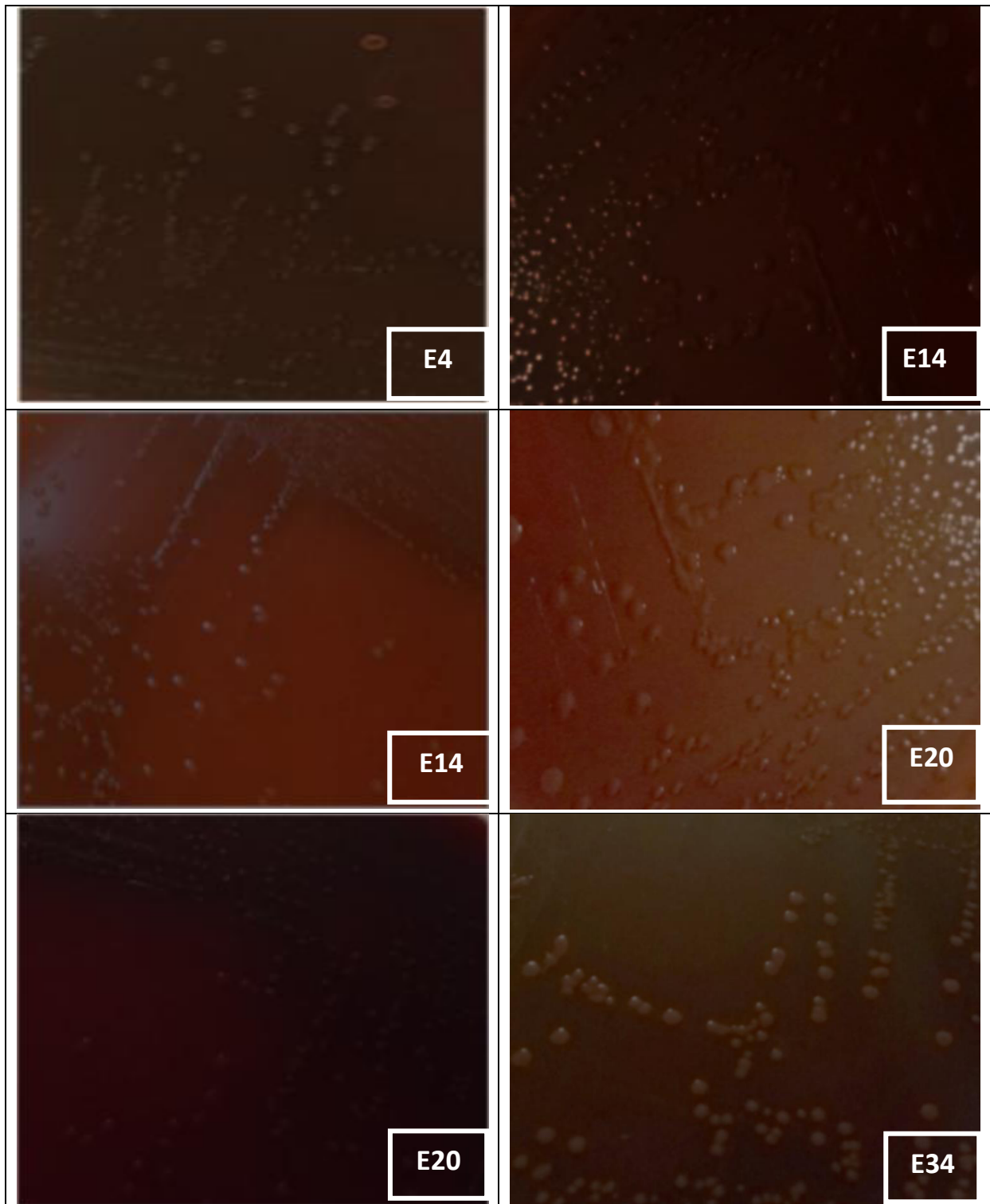


Fig. 25: Aspects des colonies des souches *S. thermophilus* E4, E14 et E20, indiquant la production de "slime" sur le LM17 RCA au lait, après 24h d'incubation à 42°C.

Fig. 26 : Aspects des colonies des souches *S. thermophilus* E14, E20 et E34, indiquant la production de "slime" sur le SM17 RCA au lait, après 24h d'incubation à 42°C.

Par ailleurs, les colonies présentant un aspect noir lisse ou rouge sec sont considérées comme productrices modérées de "slime". Cette description a concerné 35,71% des souches formatrices de colonies noires lisses et 7,14 % des souches avec des colonies rouges sèches sur le RCA saccharosé. Parallèlement, 21,43% des souches ont formé des colonies noires lisses et 21,43% des colonies rouges sèches sur le RCA lactosé (**Fig. 27 et Fig. 28**).

Les autres souches ont donné un aspect de colonies alternant entre le rouge lisse (0% sur le RCA saccharosé et 14,28% sur le RCA lactosé) et rose sec (14,28% sur le RCA saccharosé et 0% sur le RCA lactosé) (**Fig. 27 et Fig. 28**). Elles ont été évaluées comme non productrices de "slime", en se référant aux descriptions faites par **Darwish et Asfour, (2013)** et **Hammadi et Yousif, (2014)**.

D'après la littérature les souches productrices de "slime" sont celles qui forment des colonies noires sèches, mais les colonies rouges lisses/sèches et roses lisses/sèches sont des phénotypes considérés comme étant non producteurs de "slime" (**Freeman et al., 1989; Rajkumar et al., 2016; Kaiser et al., 2013**).

D'autres études considèrent les colonies noires lisses et rouges sèches comme un résultat indéterminé (**Dubravka et al., 2010 ; Hammadi et Yousif, 2014**). Par contre, certains travaux parlent de résultats intermédiaires (**Darwish et Asfour, 2013**). **Los et al. (2010)** ont montré que les colonies roses claires sont non productrices de "slime", alors que les colonies roses foncées sont des productrices modérées de "slime". Les phénotypes (noirs sec, noir lisse, rouge sec et rose sec) sont susceptibles d'être producteurs de "slime" et cette production est plus importante sur un milieu saccharosé chez certaines souches de *Lactobacillus* (**Los et al., 2010; Sharma et al., 2018**).

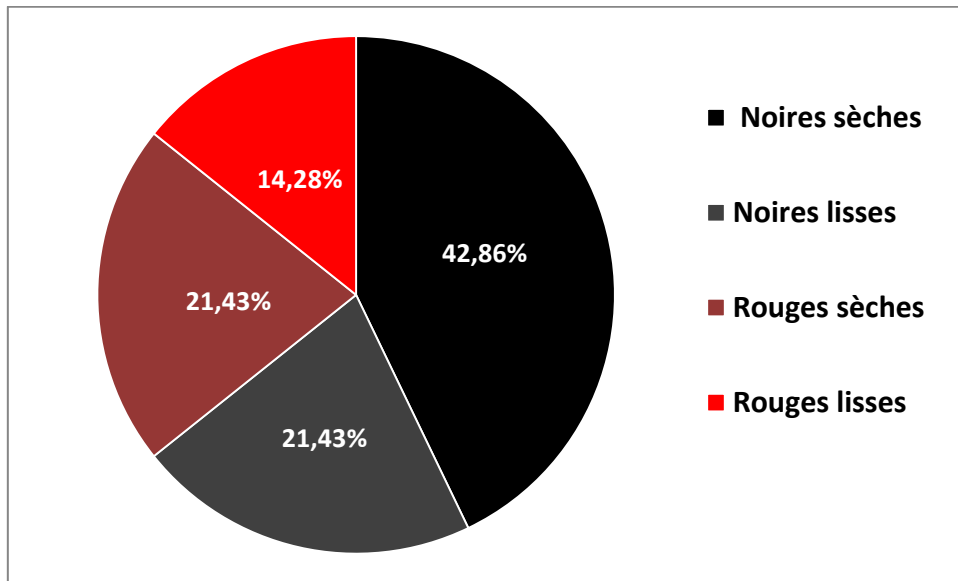


Fig.27 : Fréquence (%) des différents aspects macroscopiques des colonies de *S. thermophilus* développées sur le LM17 RCA.

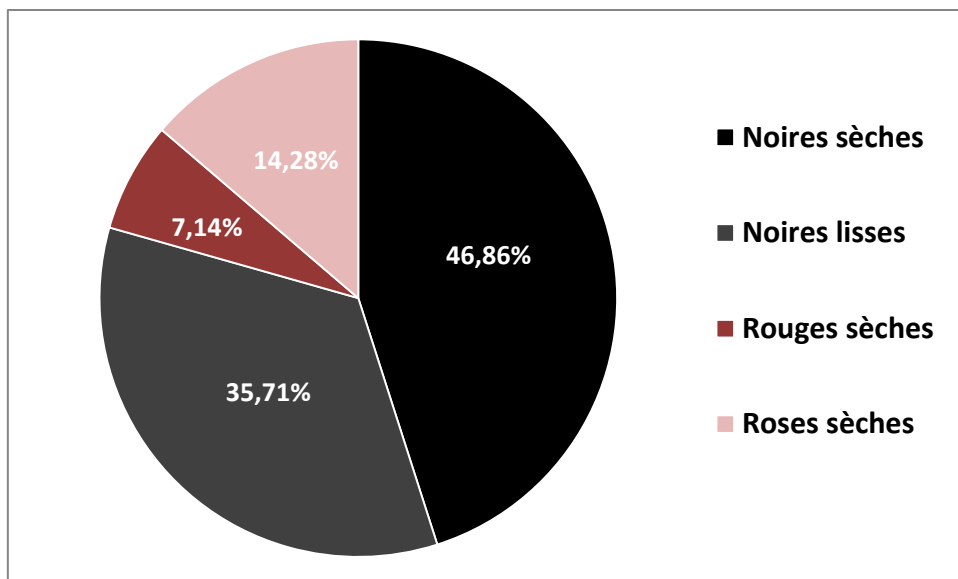


Fig. 28 : Fréquence (%) des différents aspects macroscopiques des colonies de *S. thermophilus* développées sur le SM17 RCA .

Au cours de l'examen macroscopique des colonies développées sur le RCA, nous avons remarqué que la taille des colonies est influencée par la nature de la source de carbone présente dans le RCA. Nous avons aussi noté que la fréquence des colonies noires pour certaines souches était influencée par la densité cellulaire (nombre et condensation des colonies) sur le RCA. C'est-à-dire, les colonies proches disposant d'un espace étroit, génèrent une coloration noire plus foncée (du "slime") (**Fig. 29**), comparativement à celles développées sur un espace évasé (aéré), et ce au niveau de la même boîte. Ces observations font penser au phénomène du "Quorum Sensing", chez certaines bactéries, où les molécules signal (*i.e.* Les AHLs) diffusent dans l'espace extracellulaire en réponse à l'augmentation de la densité cellulaire, tout en contribuant à la formation de biofilms (**Raina et al., 2009**).

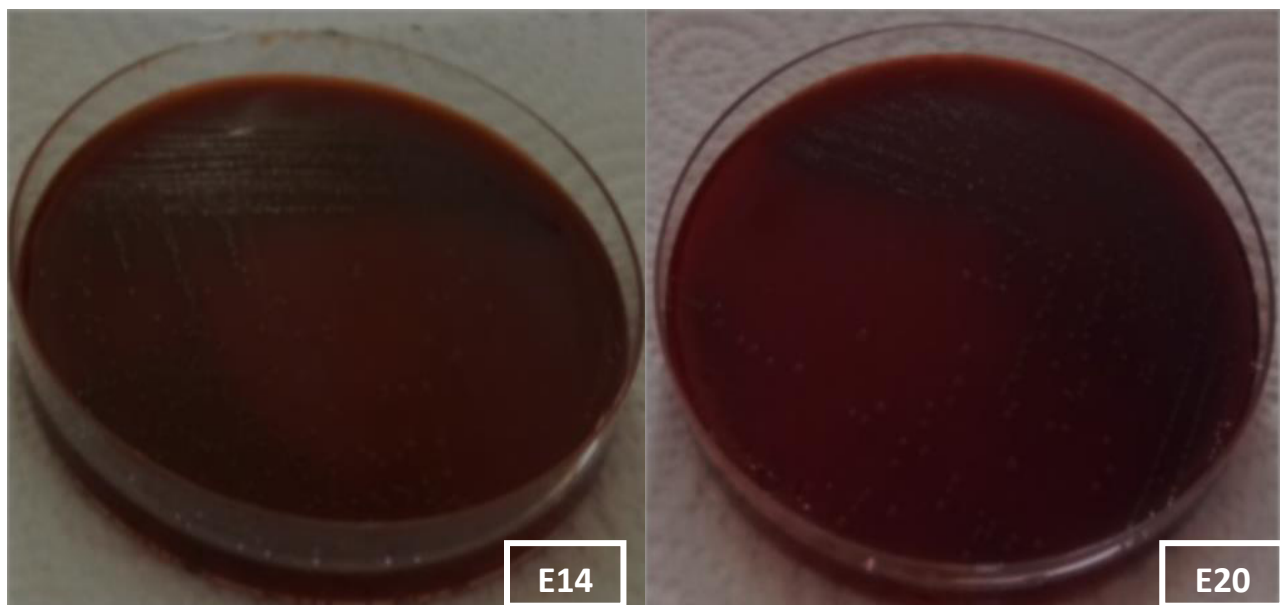


Fig. 29 : Influence de l'espace sur l'intensité de production du "slime" par les *S. thermophilus* E14 et E20, cultivées sur le LM17 RCA au lait.

5. Détection des acteurs impliqués dans la formation de biofilm

Les biofilms sont composés principalement de cellules microbiennes et d'une matrice polymérique extracellulaire. Cette matrice de nature polysaccharidique peut représenter de 50% à 90% du carbone total des biofilms. Généralement, les matrices des biofilms ne sont pas uniformes, elles peuvent varier dans l'espace et temporellement (**Donlan, 2002; Sreeremya, 2017**). Comme il a été signalé plus haut, le "slime", un polysaccharide agrégatif discret, joue un rôle important dans l'attachement aux surfaces dans les premières étapes de la formation du biofilm, il est même appelé le "polysaccharide adhésif" (**Berne et al., 2015**). Dans les autres étapes de la formation de biofilm, par la plupart des espèces bactériennes, d'autres acteurs moléculaires outre que le "slime" sont impliqués. C'est le cas des EPS (polysaccharide extracellulaire), qui peuvent être vaguement associés ou même libérés de la surface cellulaire. Les EPS participent dans la maturation et l'architecture du biofilm (**Costerton et al., 1987; Berne et al., 2015**). Dans le présent travail, nous avons effectué une petite démonstration relative à la détection de la production des EPS par les *S. thermophilus* étudiés.

5.1. Mise en évidence de la production des EPS

Nous rappelons que cette détection a été effectuée à l'aide du colorant, le rouge de ruthénium. Le rouge de ruthénium est un colorant cationique, empêche la coloration des colonies EPS+, qui apparaissent blanches par le masquage de la coloration en présence d'une production en EPS. Le rouge de ruthénium a été utilisé par de nombreux auteurs (**Mora et al., 2002; Dabour et La pointe, 2005; Bennama et al., 2012**) dans la détection des souches lactiques mucoïdes à phénotype EPS+.

Après incubation, nous avons noté l'absence totale des colonies rouges. La plupart des souches testées développent des colonies blanchâtres de type mucoïde (muqueux) (**Fig. 30**), révélant ainsi une production probable en EPS. Par ailleurs, les colonies roses, indiquent une production très faible en EPS. Les comparaisons effectuées entre les souches, ont montré que 57.14% des souches (E2, E4, E6, E11, E12, E14, E17 et E20) forment des colonies blanchâtres sur le RRLM17 (**Fig. 31**). Par contre, 64.29% des souches (E4, E6, E11, E12, E1, E20, B05, E19 et B34) ont présenté un aspect blanchâtre sur le RRSM17 (**Fig. 32**). Les souches E6, E4, E11, E12 et E17 ont la capacité de produire des EPS en présence des deux sources de carbone (lactose et saccharose). En effet, il est connu que la production des EPS est

influencée par le type de sucre présent dans le milieu de culture (**Gancel et Novel, 1994a; Paulo et al., 2012**).

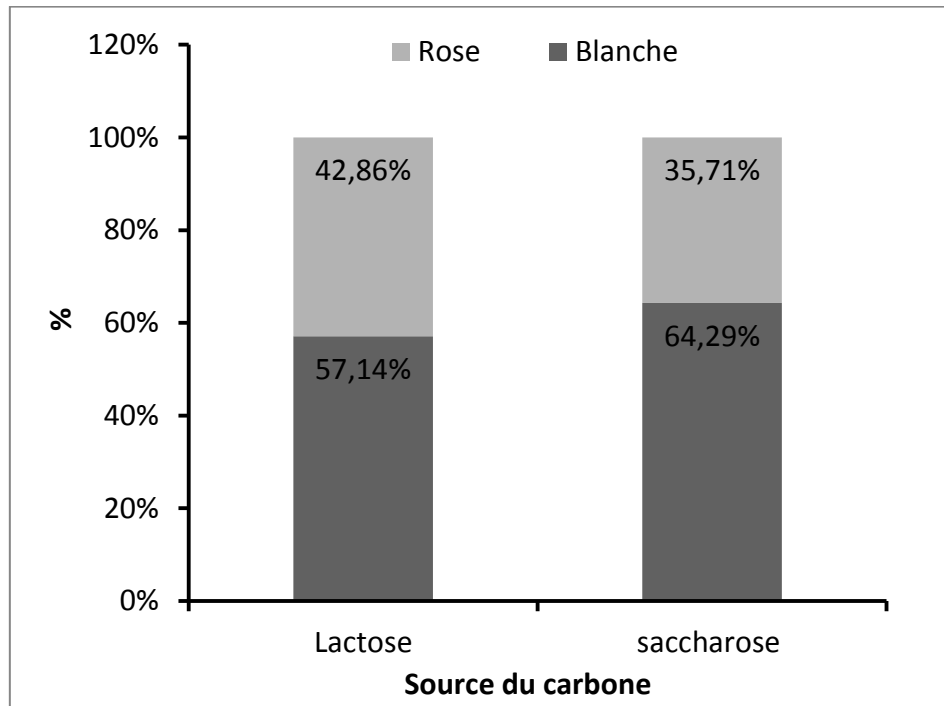


Fig. 30: Fréquences (%) relatives à la couleur des colonies formées par les souches sélectionnées de *S. thermophilus* sur la gélose RRM17.

En outre, nous avons remarqué que la taille de la colonie est plus importante lorsque le milieu est saccharosé. Ceci révèle que le saccharose est une source de carbone importante pour la biosynthèse de ce type de polymère. Ce constat est confirmé par d'autres études rapportant que le M17 hypersaccharosé est le meilleur milieu pour détecter l'aspect mucoïde (**Kersani et al., 2017; Sharma et al., 2018**).

La production des EPS n'a pas été démontrée comme conférant un avantage évident pour la croissance ou la survie des *S. thermophilus* dans le lait. Cependant, la production des EPS *in situ*, par cette espèce ou d'autres démarreurs de bactéries lactiques donne généralement une texture "ropy" ou visqueuse désirée aux produits laitiers fermentés (**Hassan et al., 1996a, 1996b; Laws et Marshall, 2001; Zeidan et al., 2017**).

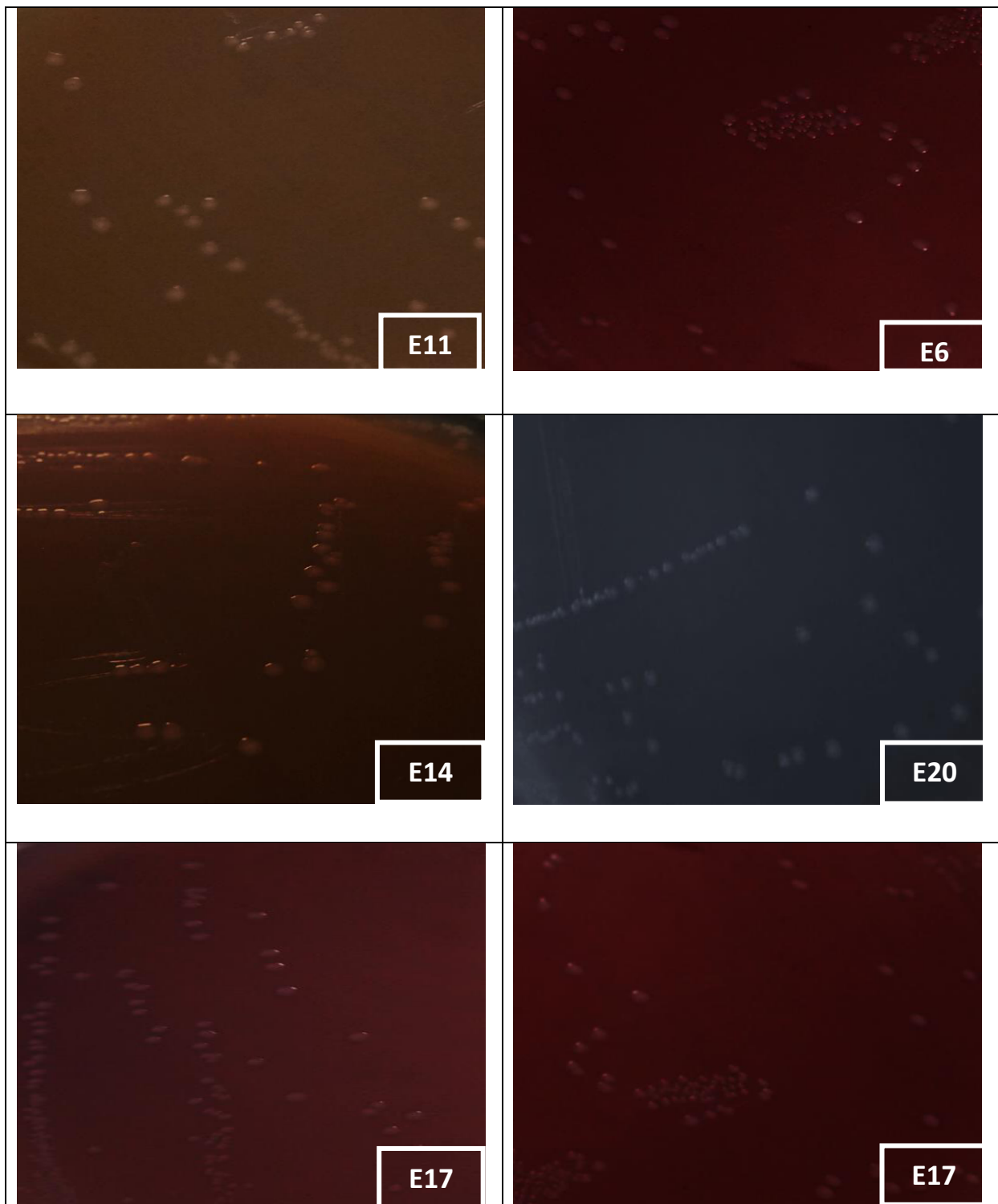


Fig. 31 : Aspects des colonies de *S. thermophilus* E11, E14 et E17 développées sur le RRSM17 agar, après 24h d'incubation à 42°C.

Fig. 32 : Aspects des colonies de *S. thermophilus* E6, E20 et E17 développées sur le RRLM17 agar, après 24h d'incubation à 42°C.

Dans le processus de formation des biofilms, les EPS pourraient conduire au pré-conditionnement des surfaces, en favorisant l'adhérence et facilitant ainsi la colonisation de nombreux écosystèmes (Oliveira *et al.*, 1994; Flint *et al.*, 1997; Atlan *et al.*, 2008). Il a été rapporté que les bactéries lactiques thermophiles productrices des EPS sont capables de former des biofilms (Mostefaoui *et al.*, 2015).

5.2. Mise en évidence des EPS capsulaires

Les polysaccharides capsulaires (CPS) constituent l'enveloppe la plus externe et forment une structure bien définie autour des bactéries (Whitfield, 2006). Les bactéries dotées d'une capsule donnent naissance à des colonies d'aspect muqueux (Gotschlich *et al.*, 1981; Kandi, 2015). La capsule confère une résistance à la dessiccation, ce qui assure de meilleures conditions de survie pour les bactéries dans le milieu extérieur (Ophir et Gutnick, 1994). Elle joue de ce fait, un rôle fondamental dans le développement de la structure du biofilm (Qin *et al.*, 2013); tout en augmentant sa résistance (Schembri *et al.*, 2005).

La limite de distinction des CPS par rapport aux EPS sécrétés dans le milieu extracellulaire, est souvent très floue dans la pratique. Ils se distinguent par des liaisons faibles de type hydrogènes et électrostatiques non covalentes, les EPS sécrétés peuvent être séparés des cellules par une simple centrifugation contrairement aux CPS (Whitfield, 1988; Branda *et al.*, 2005).

Lors de l'observation microscopique des lames traitées par la méthode à l'encre de Chine, nous avons remarqué la présence d'un halo transparent qui entoure la surface cellulaire (Fig. 33 et 34), indiquant la formation de la capsule par les souches étudiées de *S. thermophilus*. Les EPS capsulaires se visualisent en microscopie par la présence de capsule autour de la paroi bactérienne (Hassan *et al.*, 1995). Cette propriété de formation de la capsule est par ailleurs, exploitée dans la rétention d'humidité dans les fromages, comme avec le mozzarella (Low *et al.*, 1998; Luis-arroyo *et al.*, 2014).

En effet, le fromage constitue un écosystème laitier à part, où les bactéries lactiques sont gérées par des interactions positives ou négatives (Accolas *et al.*, 1971; Charlet *et al.*, 2009). Il est l'exemple connu de l'association de *S. thermophilus* avec certains lactobacilles thermophiles. Cette association se traduit par un effet synergique notable sur l'activité acidifiante, dans le processus de fabrication des fromages à pâte cuite (Accolas *et al.*, 1971; Charlet *et al.*, 2009).

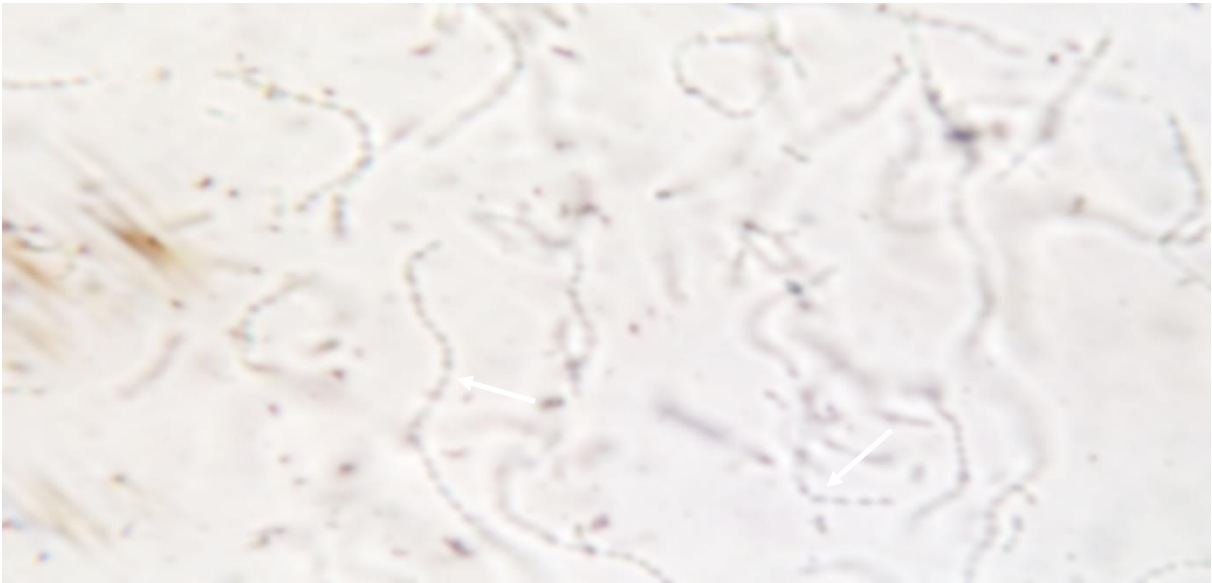


Fig. 33 : Aspect microscopique de la souche *S. thermophilus* E20, après coloration négative à l'encre de Chine indiquant la présence d'un halo entourant le corps cellulaire,
- Observation effectuée à l'objectif 100.



Fig. 34 : Aspect microscopique de la souche *S. thermophilus* E17, après coloration négative à l'encre de Chine indiquant la présence d'un halo entourant le corps cellulaire,
- Observation effectuée à l'objectif 100.

En revanche, la croissance de *S. thermophilus* à l'échelle pilote, au niveau de l'équipement de pasteurisation du lait pour la fabrication du fromage a été signalée par certaines études (**Hup et al., 1979; Knight et al., 2004**). Le nombre des streptocoques thermophiles augmente progressivement, ce qui est en faveur à la formation rapide de biofilms au niveau des installations de pasteurisation. Cette organisation en biofilms de la part des streptocoques thermophiles dans l'environnement industriel pourrait avoir un effet positif, par inhibition de la croissance des germes pathogènes (**Hup et al., 1979; Devine et al., 2015**).

Conclusion

Conclusion

Dans l'ensemble ce travail a concerné la réalisation d'un protocole expérimentale cible la mise en évidence de la capacité de la formation du biofilm chez le *Streptococcus thermophilus* liée à leur aptitude de produire des exopolysaccharides.

Les souches de *S.thermophilus* étudiées ont été isolées à partir de produits laitiers fermentés (yaourt et fromage à pâte cuite incluant le gruyère et l'emmental, les souches ont été identifiées pour confirmer leur appartenance.

La mise en évidence de la formation du biofilm a été évaluée en premier temps par la méthode de microplaque en polystyrène. Toutes les souches ont été testées afin de présélectionner celles présentant un pouvoir d'adhésion visible, chaque souche a subi 4 tests sur le milieu M17 (saccharosé, lactosé, additionné ou non u lait) . A l'issu de cette étape, une 14^{aine} de souches a été (E1, E2, E4, E6, E8, E11, E12, E14, E17, E19, E20, B03, B05 et B34) retenue pour refaire le test d'adhésion en microplaque dans les mêmes conditions établies.

En second temps, une évaluation de formation du biofilm par la méthode en tube a eu lieu pour tester l'aptitude d'adhésion des souches sur différente surface (verre) en respectant les mêmes conditions.

Nous avons passé par une détection de production du slime par la méthode de la gélose au rouge Congo additionné de 3% (P/V) de source de carbone (lactose ou saccharose), 5% du lait écrémé et 0.08% de rouge Congo.

Finalement, une détection de certains acteurs impliqués dans la formation du biofilm (EPS et EPS capsulaire) a été réalisée, concernant la détection de la production d'EPS est effectuée sur le milieu M17 additionné du 3% (p/V) de source de carbone(saccharose ou lactose), du 5% du lait écrémé et 0.08% de rouge de ruthénium. Parallèlement, les EPS capsulaires ont été mis en évidence par la technique de coloration à l'encre de Chine.

La majorité des souches de *S.thermophilus* ont montré une adhésion considérable sur microplaque dans toutes les conditions établies, cette adhésion a été de plus en plus importante en présence du saccharose et le lait. La méthode en tube a montré que le pouvoir d'adhésion des souches s'améliore en présence du lactose et du lait. En comparant les deux méthodes, la surface en polystyrène favorise l'adhésion des souches contrairement la surface en verre.

Un pourcentage de 42.86% des souches de *S.thermophilus* présentant des colonies noires sèches quelle que soit la source de carbone indique une forte production de slime. Le reste des souches ont présenté des phénotypes alternent entre (noir lisse, rouge sec/lisse et rose sec) avec différentes ratios.

Toutes les souches sont des productrices de slime dont cette production varie entre faible et forte. La majorité des souches ont présenté des colonies blanches en présence du lactose et du saccharose indiquant une forte production des polysaccharides le saccharose a favorise plus cette aptitude. Finalement, toutes les souches de *S.thermophilus* ont l'aptitude à former des capsules qui apparaissent en halo transparent entourant le corps cellulaire.

Références Bibliographiques

Accolas J.P., Veaux M., et Auclair J., 1971. Étude des interactions des diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le lait*, 249-272.

Aktypis A., Kalantzopoulos G., Huis Intveld J. H. J., et Ten Brink B., 1998. Purification and characterization of thermophilin T: a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA- DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*, **84** :568–576.

Allison D.A., et Sutherland, I.W., 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of Microbiology*, **133** :1319–1327.

Almir6n-Roig E., Mulholland F., Gasson M.J., et Griffin A.M ., 2000. The complete *cps* gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide. *Microbiology*, **46**: 2793-2802.

Ames B. N., 1999. Micronutrient deficiencies cause DNA damage and cancer. *Food Science and Agricultural Chemistry*, **1**: 1–15.

Aslim B., Beyatli Y., et Yuksekdog Z.N.,2005. Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. *International Journal of Food Science and Technology*, **41** : 973–979.

Atlan D., Béal C., Chouyekh H., Gaudu P., Hols P., Juillard V., Ladero V., Lortal S., Loubière P., Monnet C., Monnet V., et Yvon M., 2008. Bactérie lactiques: Métabolisme et ingénierie métabolique, In : **Corrieu G., et Luquet, F. M. 2008** : Bactéries lactiques: de la génétique aux ferments, Eds. Tec & Doc. Paris (France), 271-509.

Asmahan A. A., 2010. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: A review. *Research Journal of Microbiology*, **5**(12):1213-1221.

Axelsson L., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **Salminen S., Von Wright A.** (eds). *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekka, New York, 1-66.

Ayhan, K., Durlu-Ozkay F. et Tunail N., 2005. Commercial important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *International Journal of Dairy Technology*, **58**(3): 150-156.

Bakir S. H. et Ali F.A., 2016. “Comparison of Different Methods for Detection of Biofilm Production in Multi-Drug Resistance Bacteria Causing Pharyngotonsillitis”. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, **3**(2): 13-22.

Baliarda A., 2003. Evaluation de la réponse au stress chez Les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* Approches physiologiques et génétiques. Thèse de doctorat : L'université Bordeaux 1, France .

Baliarda A., Robert H., Jebbar M., Blanco C., Deschamps A., et Le Marrec C., 2003. Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *International Journal of Food Microbiology*, **84**: 13–20.

- Balsanelli E., De Baura V.A., Pedrosa FO., de Souza E.M., et Monteiro R.A., 2014.** Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *herbaspirillum seropedicae*. *PLOS ONE*, **9**(10):1-10.
- Baljeet S.Y., Simmy G., Ritika Y., et Roshanhal ., 2015.** Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. *International Food Research journal*, 2594-2600.
- Baselga R., Albizu I., et Amorena B ., 1994.** *Stapylococcus aureus* and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Veterenary Microbiology*, **39**: 195–204.
- Bassi D., Cappa F., Gazzola S., Orru L., et Cocconcelli P.S., 2017 .**Biofilm formation on stainless steel in milk environment is mediated by the proteinase PrtS in *Streptococcus thermophilus* UC8547. *Applied Environnement Microbiology*, 1-28.
- Bellifa S., 2014.** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat .Université abou bekr belkaid, Tlemcen.
- Bennama R., Fernandez M., Ladero V., Alvarez M., Rechidi-Sidhoum N., et Bensoltane A., 2012a.** Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk. *European Food Research Technology*, **234**:119-125.
- Bennama R., Rechidi-Sidhoum N., et Bensoltane A., 2012b.** Effects of some fermentation substrates and growth temperature of exopolysaccharides production by *Streptococcus thermophilus* BN1. *Internationnal journal of biochemistry and bioinformatics*, **2**(1):44-47.
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M., 2001.** Recent advances in cheese microbiology. *Interntionnal dairy journal*, 11:259-274.
- Berne C., Ducret A., Hardy G.G., Brun Y.V., 2015.** Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-Négative Bacteria. *Microbiology spectrum*, **3**(4): 1-45.
- Bintsis T., 2018.** Lactic acid bacteria : their applications in food. *Journal of Bacteriology and Mycology*, **5**(2) :1-5.
- Boulangé-Petermann L., Baroux B., et Bellon-Fontaine M.N., 1993.** *The Influence of Metallic Surface Wettability on Bacterial Adhesion*. *Journal of adhesion science and technology*, **7**(3): 221-230.
- Boulangé-Petermann L., 1996.** Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability :a review with special reference to food industry. *Biofouling*, **10**(4): 275-300.
- Bourgoin F., Pluvinet A., Gintz B., Decaris B., et Guedon G., 1999.** Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Genetic* , **233**:151–161.
- Branda S.S., Vik Å., Friedman L., et Kolter R., 2005.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, **13** : 20-26.

Branger A., Richer M-M., et Roustel S., 2007. Quelque système microbien : les biofilms. In : Microbiochimie et alimentation. Educagri édition, Dijon. 131-164.

Briandet R., Herry J., et MN B.F., 2001 . Determination of the van der waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static gram positive microbial biofilms. *Colloids and Surface B: Biointerface*, **21** : p. 299-310.

Broadbent J. R., McMahon D. J., Welker D. L., Oberg C. J., et Moineau S., 2003. Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus* : A Review1. *Journal Dairy Science*, **86** : 407–423.

Brul S., et Coote P., 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, **50**(1-2): 1-17.

Burton E., Yakandawala N., et Lo Vetri K., Madhyastha M.S., 2007. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal Indian of microbiology and biotechnology*, **34**: 1-4.

Casagrande-Proietti P., Stefanetti V., Hyatt D.R., Marenzoni M.L.,Capomaccio S., Coletti M., Bietta A., Francioni M.P., et Passamonti F., 2015. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation. *Journal of Veterinary Medecin and Science*, **77**(8):945-951.

Cerning J., 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**: 113-130.

Cerning J., 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria . *Lait*, **75**: 463-472.

Cerning J., Bouillanne M., Desmazeaud M., et Landon M., 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnological letter*, **8**: 625- 628.

Cerning J., Bouillanne M., Desmazeaud M., et Landon M., 1988. Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnological letter*, **10**:255- 260.

Charlet M., Duboz G., Faurie F., Le Quéré J., et Berthier F., 2009. Multiplque interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **131**: 10-19.

Chen Q., Sa R., Jia J., et Xu R., 2017. Research on Biofim Formation Ability of Lactic Acid Bacteria under Different Condtions. *Advances Journal of Food Sciene and Technogy*, **13**(2): 77-82.

Christensen G.D., Simpson W.A., et Younger J.A., 1995. Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal Clinical Microbiology*, **22**: 996-1006.

- Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., et Beachey E.D., 1985.** Adherence of coagulase –negative Staphylococci to plastic tissue culture plates :a quantitative model for adherence of Staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, **22**(6): 996-1006.
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., et Thomas M. L. 2001.** Chikindas. Bactériocines : safe, naturel antimicrobial for food preservation. *Ital. Journal of Food and Science*, **71**: 1-20.
- Corsetti A., Rossi J. et Gobbetti M., 2001.** Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* ,**69**: 1-10.
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., et Marrie T.J., 1987.** Bacterial biofilm in nature and disease. *Annual Review of microbiology*, **41**:435-464.
- Costerton J.W., Stewart P.S., et Greenberg E.P., 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318–1322.
- Couvigny B., Thériat C., Gautier C., Renault P., Briandet R., et Guédon E., 2015.** Streptococcus thermophilus Biofilm Formation: A Remnant Trait of Ancestral Commensal Life? *PLoS ONE*, **10**(6): 1-23.
- Cui Y., Xu T., Qu x., Hu T., Jiang X .,et Zhao C., 2016.** New Insights into Various Production Characteristics of *Streptococcus thermophilus* Strains, *International Journal Of Molécular Science*, 1-17.
- Cucarella C., Tormo M.A., Ubeda C., Trotonda M.P., Monzón M., Peris C., et al., 2004.** Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus. *Infection and Immunity* , **4**:2177–85.
- Czajkowski R., et Jafra S., 2009.** Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica* ,**56**(1): 1-16.
- Dabour N., et la Pointe G ., 2005.** Identification and molecular characterisation of the chromosomal exopolysaccharides Biosynthesis gene cluster from Lactobacillus lactis subsp .cremoris SMQ-461.*Applied and environmental microbiology*, **27**(11):7414-7425.
- Darwish S.F., et Asfour H.A.E., 2013.** Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World*, 1-9.
- De Jong P., Te Giffel M. C., et Kiezebrink E. A., 2002.** Prediction of the adherence, growth and release of microorganisms in production chains. *International Journal of Food Microbiology*, **17**, 13–25.
- Delarras C., 2007.** Microbiologie pratique pour laboratoire d’analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier, 128-271.
- Delarras C., 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier, 143-203.

- Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., et Janssens D., 1994.** Caractéristique générale des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques **1** : 25-116. In : **De Roissard H., Luquet F.M.** (ed) Bactéries lactiques. **1** : Loriga : Uriage, Paris, France.
- Delrome C., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms : *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, **126** : 274–277.
- Derzelle S., Bolotin A., Mistou M. Y., et Rul F., 2005.** Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** : 8597–8605.
- Devine G., Doran G., et Mullan W.MA., 2015.** Growth of thermotolerant lactic acid bacteria in milk pasteurizers. A summary report. [on-line]. Available from: <https://www.dairyscience.info/index.php/student-projects/265-free-starter.html>.
- De Vuyst F., Vanderveken S., De Vin F., et Degeest B., 1998.** Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal Applied Microbiology*, **84** : 1059-1068.
- Diaz M., Ladero V., del Rio B., Redruello B., Fernandez M., Martin M.C., et Alvarez M.A., 2016.** Biofilm-Forming Capacity in Biogenic Amine-Producing Bacteria Isolated from Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, **7**:1-10.
- Donlan R.M., 2002.** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **8**(9):881-890.
- Donlan R.M., et Costerton J.W., 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 67-193.
- Driessen F. M., Vries J. D., et Kingma F., 1984.** Adhesion and growth of thermoresistant streptococci on stainless steel during heat treatment of milk. *Journal of Food Protection*, **11**: 836–901.
- Elyajouri A., 2012.** Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie – Rabat.
- Endo A., et Dicks L. M.T., 2014.** Physiology of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy. **Holzappel W.H. et Wood B.J.B.** ed John Wiley & Sons, Ltd, 13-26.
- Faber E.J., Zoon P., Kamerling J. P., et Vliegthart J. F. G., 1998.** The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrates Research*, **310** : 269–276.
- Fabres-Klein M.H., Caizer Santos M.J., Contelli Klein R., de Souza G.N. et Andrea de Ribon O.B., 2015.** An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus* BMC, *Veterinary Research*, **1**: 1-10.

- Facklam R., 2002.** What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, **15** : 613–630.
- Flemming H.C., et Wingender J., 2010.** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 623-633.
- Fletcher M., et Loeb G.I., 1979.** Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonas to solid surfaces. *Applied and Environmental microbiology*, **37**(1) : 67-72.
- Flint S.H., Brooks J.D. et Bremer P.J., 1997.** The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel, *Journal of Applied Microbiology*, **83**: 508–517.
- Florou-Panari P., Chistaki E., et Bonos E., 2013.** Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In: Lactic acid bacteria- D&Rf for food, Health and Livestock purposes, 590-614.
- Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., 1989.** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, **42**:872–4.
- Fuqua W. C., Winans S. C., et Greenberg E. P., 1994.** Quorum sensing in bacteria: the LuxRLuxI family of cell density -responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, **176**(2): 269-275.
- Fuqua C., et Greenberg E. P., 2002.** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Molecular cell Biology*, **3**: 685-695.
- Gad S., 2018.** Assessment of biofilm advantages and disadvantages. *Journal of Scientific And Engineering Research*, **5**(4): 231-237.
- Garcia, E., et R. Lopez., 1997.** Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, **149** :1–10.
- Germond J.E., Delley M., D’Amico N., et Vincent S. J. F., 2001.** Heterologous expression and characterization of the exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *European . Journal of Biochemistry* . **268** : 5149–5156.
- Gilbert P., Das J., et Foley I., 1997.** Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances of Dental Research*, **11**(1): 160-167.
- Gilbreth S.E., Somkuti G.A., 2005.** Thermophilin 110: a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *Current Microbiology* , **51**: 175–182.
- Gómez N.C., Ramiro J.M.P., Quecan B.X.V., et de Melo Franco B.D.G., 2016.** Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 1-15.

- Gotschlich E.C., Fraser B.A., Nishimura O., Robbins J.B., et Liu T.Y., 1981.** Lipid on capsular polysaccharides of gram-negative bacteria. *Journal of Biology and Chemistry*, **256**: 8915-8921.
- Gotz F., Sedewitz B., et Elstner E. F., 1980a.** Oxygen utilization by *Lactobacillus plant arum*, 1. Oxygen consuming reactions. *Archives of Microbiology* , **125**: 209-214.
- Grivet M., et al., 2000.** *Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys.* *journal of material science : Materials in medicine*, **11**: 637-642.
- Grasser F., 1994.** safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections .*Bulletin Institute Pasteur*, **92**: 45-67.
- Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire, DUNOD, Paris , 80-291.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P., 2004.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology*, **2**(2): 95–108.
- Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M., 2011.** “Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates”, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **15**(4): 305-311.
- Hassan A.N., Frank J.F., Famer F.A., Schmidt K.A., et Shalabi S.I., 1995.** Formation of yogurt microstructure and three dimensional visualization as determined by confocal scanning microscopy. *Journal of Dairy Science*, **78** : 2629-2636.
- Hassan A.N., Frank J.F., Schmidt K.A., et Shalabi S.I. 1996a.** Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, **79**: 2091-2097.
- Hassan, A.N., Frank J.F., Schmidt K.A., and Shalabi S.I., 1996b.** Textural properties of yogurt made with encapsulated non ropy lactic cultures. *Journal Dairy Science*, **79**: 2098–2103.
- Hassan A. N., 2008.** ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, **91**: 1282–1298.
- Hebert E.M., Raya R.R., et De Giori G. S., 2000.** Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5316–5321.
- Hentzer M., Eberl L., Givskov M., 2005.** Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofouling*, **2**: 37-61.
- Hols P., Hancy F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond- Bourget, N., et al., 2005.** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, **29** : 435–463.
- Horvath P., Coute-Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., et Barrangou R., 2009.** Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*, **131** (1): 62–70.

- Huck J. R., Sonnen M., et Boor K. J., 2008.** Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *Journal of Dairy Science*, **91**: 1218–1228.
- Hup G., Bangma A., Stadhouders J., Bouman S., 1979.** Growth of thermoresistant streptococci in cheese milk pasteurisers (1) Some observations in cheese making, *Zuivelzicht*, **71**: 557-562.
- Iyer R., Tomar S. K., Kapila S., Mani J., et Singh, R., 2010.** Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International*, **43**: 103–110.
- John R. T., Philip A. W., et Jeremy P. B., 2012.** *Streptococcus*: A Brief Update on the Current Taxonomic Status of the Genus. In: Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. CRC Press, 4^{ème} (ed), 123-138.
- Joo HS., et Otto M., 2012.** Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry and Biology*, **19**: 1503–13.
- Kaiser T. D. L., Pereira E. M., Santos K. R., Maciel E. L. N., Schuenck R. P., et Nunes A. P. F. 2013.** Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **75**(3): 235-239.
- Kalschne D.L., Womer R., Mattana A., Sarmiento C.M.P., Colla L.M., et Colla E., 2015.** Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “sliced vacuum packed cooked ham”. *Brazilian journal of microbiology*, **46**(1): 173-181.
- Kanamarlapudi S.L.R.K., Muddada S., 2017.** Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Research International*, 11p
- Kandi V., 2015.** Bacterial capsule colony morphology, functions, and its relation to virulence and diagnosis. *Annals Of Tropical Medicine And Public Health*, **8**(4):151-153.
- Kaplan J.B., 2010.** Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, **89**: 205–218.
- Karatan E., Watnick p., 2009.** Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73**: 310–347.
- Kawamura Y., Hou X.G., Sultana F., Miura H., et Ezaki T., 1995b.** Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**: 406–408.
- Kersani I., Zadi-karam H. et Karam N., 2017.** Screening of exopolysaccharides-producing coccal lactic acid bacteria isolated from camel milk and red meat of Algeria. *African Journal of biotechnology*, **16** (18): 1078-1084.
- Klaenhammer T.D., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **12**(1-2): 39-85.

- Kleerebezem M., Quadri L. E. N., Kuipers O. P. et De Vos W. M., 1997.** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, **24**(5): 895-904.
- Klein G. L., Soum-Soutéra E., Guede Z., Bazire A., Compère C., et Dufour A., 2011.** The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling*, **27**(8): 931-940.
- Knight G. C., Nicol R. S., et Mcmeekin T. A., 2004.** Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot-scale cheese-milk pasteurisation plant. *International Journal of Food Microbiology*, **93**: 305–18.
- Knobloch J.K., Horsetkotte M.A., Rohde H., et Mack D., 2002.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, **191**(2) : 101-6.
- Kukavica-Ibrulj I., 2007.** Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèse électroniques .Université Laval. Québec, Canada.
- La Pointe G., 2009.** Métabolismes des bactéries lactiques :la production d'exopolysaccharides *In* : **Dridier D., Prevost H., 2009.** Bactéries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economisa 49 rue Harica 75015 Paris : 381- 427.
- Lahtinen S.,Salminen S., Ouwehand A., Wright AV., 2011.** Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects. 4th ed. Boca Raton : CRC Press.
- Latorre A.A., Van Kessel J.S., Karns J.S., Zurakowski M.J., Pradhan A. K., Boor K. J., Jayarao B. M., Houser B. A., Daugherty C. S., et Schukken Y.H., 2010.** Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, **93**: 2792–802.
- Laws, A.P., et Marshall V.M., 2001.** The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **11**: 709–721.
- Laws A., Gu Y.C., et Marshall V.M., 2001.** Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, **19**: 597–625.
- Lazizzera B. A., et Grossman A. D., 1998.** The ins and outs of peptide signaling. *Trends in Microbiology*, **6**(7): 288-294.
- Lee M. W., Knight G., et Nicol R.S., 1997.** Development of biofilm of thermotolerant streptococci. Chemica 97 – The 25th Australian and New Zealand Chemical Engineers' Conference and Exhibition, Rotorua, 29 September–1 October 1997.

- Licitra G., Ogier J.C., Parayre S., Pediliggieri C., Carnemolla T.M., et Falentin H., 2007.** Variability of bacterial biofilms of the "tina" wood vats used in the ragusano cheese-making process. *Applied and environmental microbiology*, **73**(21): 6980–6987.
- Liesse Iyamba J.M., 2012.** Étude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- Linares D.M., Arboleya S., Ross R.P., et Stanton C., 2017.** Complete génome sequence of the Gamma-Aminobutyric Acid-producing Strain *Streptococcus thermophilus* APC151. *Génome Announcements*, **5**(17): 1-2.
- Liu W., Pang H., Zhang H., et Cai Y., 2014.** Biodiversity of lactic acid bacteria, Chapter 2: In: **Zhang H. et Cai Y., 2014.** (eds), *Lactic acid bacteria*, Springer science +Business Media Dordrecht.
- Lluis-Arroyo D., Flores-Najera A., Cruz-Guerrero A., Gallardo-Escamilla F., Labato-Calleros C., Jimenez-Guzman J., et Garcia-Garibay M., 2014.** Effect of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* on yield and texture of Mexican Manchego-type cheese. *International Journal Of Food Properties*, **17**(8): 1680-1693.
- Lortal S., Di Blasi A., Madec M.N., Pediliggieri C., Tuminello L., Tanguy G., et al., 2009.** Tina wooden vat biofilm: a safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *International journal of food microbiology*, **132**(1): 1–8.
- Los R., Sawick R., Juda M., Stankevic M., Rybojad P., Sawick M., et al., 2010.** A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiology Letter*, **310**: 97-103.
- Low D., Ahlgren J.A., Horne D., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R., 1998.** Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** : 2147-2151.
- Low D., Ahlgren A.J., Horne D., McMahon D.J., Oberg C.J., et Broadbent J.R., 1998.** Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C Capsular Exopolysaccharides in cheese Moisture Retention. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(6): 2147-2151
- Maeda Y., Goldsmith C.E., Coulter W.A., Mason C., Dooley J.S.G., Lowery C.J., Moore J.E., 2010.** The viridans group streptococci. *Reviews in medical microbiology*, **21**(4): 69-79.
- Mahasneh A.M., Mahasneh S.A., 2017a.** Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from local fermented vegetables (Makdoos). *International journal of current microbiology and Applied sciences*, **6**(2): 1673-1686.
- Mahasneh A.M., Mahasneh S.A., 2017b.** Probiotics: A promising role in dental health. *Dentistry journal*, **5**(25): 1-10.
- Maqsood S., Hasan F., et Masud T., 2013.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from indigenous dahi samples for potential source of starter culture. *African Journal of Biotechnology*, **12**(33): 5226-5231.

- Marciset O., Jeronimus-Stratingh M. C., Mollet B., et Poolman B., 1997.** Thermophilin 13, a non typical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 14277–14284.
- Mathot A. G., Beliard E., et Thuault D., 2003.** Streptococcus thermophilus 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of Clostridium tyrobutyricum in hard cheese. *Journal of Dairy Science*, **86**: 3068–3074.
- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A., 2006.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screenin methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **24**: 25-29
- Mc Kenney D., Hubner J., Muller E., Wang Y., Goldmann D.A., et Pier G.B., 1998.** The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsularPolysaccharide /adhesin. *Infectiology and Immunology*, **66**: 4711-4720.
- Michaylova M., Isawa K., Vlachkova L., 2002.** Study on yogurt bacteria isolated from plants in Bulgaria. Book of Abstracts of the 7th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, 40.
- Miller M. B., et Bassler B. L., 2001.** Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**(1): 165-199.
- Mohd Yusof A.F., Prabhakaran P., Azli N.D., Sani N.A., et Aqma W.S., 2017.** Analysis of Biofilms Formation by *Cronobacter* sp. during Growth in Infant Formula Milk, *Sains Malaysiana* , **46**(6): 903–908.
- Mora D., Fortina M. G., Parini C., Ricci G., Gatti M., Giraffa G., et al., 2002.** Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, **93**: 278–287.
- Mora D., Ricci G., Guglieletti S., Daffonchio D., et Fortina M.G., 2003.** 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology*, **149**: 807-813.
- Mora D., Maguin E., Masiero M., Parini C., Ricci G., Manachini P. L., et al., 2004.** Characterization of the urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, **96** : 209–219.
- Moschetti G., Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F., Deiana P., Coppola S., 1998.** Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism : powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology* ,**85** : 25–36.
- Mostefaoui A., Hakem A., Yabrir B., Boutaiba S., Badis A., 2015.** Evaluation of biofilm formation by exopolysaccharrides-producer strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian camel milk. *Emerates Journal of Food and agriculture*, **17**(6): 513-521.

- Mounier J., Monnet C., Vallaey T., Arditi R., Sarthou A., Hélias A., et Irlinger F., 2008.** Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied environmental Microbiology*, **74**: 172-181
- Mozzi, F., Torino M. I., et Font de Valdez. G., 2001.** Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. A method for the isolation of polysaccharides in milk cultures, *In* F. Spencer and A. Ragout (ed.), Food microbiology protocols. Methods in biotechnology. Humana Press, Inc., Totowa, N.J. 183–190.
- Muhsin J., Ufaq T., Tahir H. et Saadia A., 2015.** Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **4**: 1-14.
- Nathanon T., 2002.** Yogurt: The fermented milk. *Lait*, **4** (24): 727-736.
- Naves P., Del Prado G., Huelves L., Roderiguez –cerrato V., Ruiz V., Ponte M.C., et Soriano F., 2010.** Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-l-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Hospital Infect*, **76**: 165-170.
- Noda M., Shiraga M., Kumagai T., Danshiitsoodol N., et Sugiyama M., 2018.** Characterization of the SN35N strain –specific exopolysaccharide encoded in the whole circular génome of pant –derived *Lactobacillus plantarum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **41**: 536-545.
- Norma M.D., José C.C.R., Blanca E.G., Dennis K.B., Ruben S., et José E.B., 2015.** Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache ,tow traditional fermented beverages in Mexico, *Food Science and Nutrition*, **3**(5):434-442.
- O’Gara J.P., et Humphreys H., 2001.** *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology*, **50** : 582-587.
- Okada M., Sato I., Jeong Cho S., Iwata H., Nishio T., Dubnau D et Sakagami Y.,2005.** Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*, **1**: 23-24.
- Oldak A., Zielinska D., 2017.** Bacteriocins from lactic acid bacteria as alternative to antibiotics .*Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, **71**:328-338.
- Oliveira R., Melo L., Oliveira A., et Salgueiro R., 1994.** Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* : effects of pH and surface material. *Colloids and Surfaces, B : Biointerfaces*, **2** : 41–46.
- Ophir T.,et Gutnick DL., 1994.** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied Environment Microbiology*, **60**: 740-745.
- Orla-Jensen., 1919.** The lactic acid bacteria.E.Munksgaad,Kobenhavn.
- Ortakci F., Broadbent R.F., Oberg C.J., et Mcmathon D.J., 2015.** Growth and gas production of a novel heterofermentative cheddar cheese nonstarter lactobacilli specifies on ribose et galactose.*Journal Of Dairy Science*, **98**:3645-3654.

Parsek M., et Singh PK., 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews of Microbiology* , **57**: 677–701.

Paulo E.M., Vasconcelos M.P., Oleveira I.S., Affe H.M.D., Nascimento R., Melo I.S., Roque M.R., et De Assis S.A., 2012. an alternative method for screening lactic acid bacteria for production of exopolysaccharides with rapid confirmation, *Food science and Technology Campinas*, **32**(4): 710-714.

Perry D. B., McMahon D. J., et Oberg C. J., 1997. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low-fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, **80**: 799–805.

Petersen B. L., Dave R. I., McMahon D. J., Oberg C. J., et Broadbent J. R., 2000. Influence of capsular and rpy exopolysaccharide- producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey. *Journal Dairy Science*, **83**: 1952–1956.

Pivat K., Thonat P., 2011. Action des cultures protectrices : cas des germs lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnology, Agronomy, Society and environment journal*, **15** (2): 339-348.

Pombert J.F., Sistek V., Boissinot M., et Frenette M., 2009. Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, *recA*, *secA*, and *secY* gene sequences. *BMC Microbiology*, **9**: 232.

Pontigo F., Moraga M., et Flores S.V., 2015. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. *Genetic and Molecular Research*, **14**(3): 10905-10918.

Poolman B., 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, **12**: 125–147.

Poutrel B., Gilbert F.B., et Lebrun M., 1995. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**: 166–71.

Qin L., Imamura Y., et Hiroshi W., 2013. Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lowers virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of infection and chemotherapy*, **19**(2): 261-271.

Raffa R.B., Lannuzzo J.R., Levine D.R., Saeid K.K., Schwartz R.C., Sucic N.T., Terleckrey K.K., et Young J.M., 2005. Bacterial communication (“Quorum sensing”) via ligands and receptors: A novel pharmacologic Target for the design of antibiotic drugs. *The Journal of Pharmacology And Experimental therapeutics*, **312**: 417-423.

Raina S., De Vizio D., Odell M., Clements M., Vanhulle S., et Keshavarz., 2009. Microbial quorum sensing : a tool or a target for antimicrobial therapy? *Applied Biotechnology and Biochemistry*, **54**(2): 65-84.

- Rajpal H., Joykutty L., Golden C., 2017.** Assaying the formation of beneficial biofilms by lactic acid bacteria and the effect of ayurvedic plant extract on their enhancement. *Journal of Emerging Investgators*, 1-7.
- Reps A., 1993.** Bacterial surface-ripened cheeses. In: **Fox P. F., 2012.(ed.).** Cheese: chemistry, physics and microbiology, volume 2. Major cheese groups (2nd Ed.). Chapman & Hall, London, UK 137-172.
- Rivera C.L.E., Ramos A.P., et Desgarenes C.P., 2007.** Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología RevMex*, **51**: 57-67.
- Roberts, I. S., 1996.** The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Reviews Microbiology*, **50** : 285–315.
- Ruzicka F., Hola V., Votava M., et al., 2004.** Biofilm detection and clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiology (Praha)*, **49** (5): 596-600.
- Salvadori del Prato O., 1999.** Il re delgi erhorinati: il gorgonzola. *Latte*, **24**: 34-46; 70-8.
- Salvadori del Patro O., 2005 .** Il re delgi erborinati: il gorgozola. *Latte*, **24**: 34-46; 70-78.
- Sharma K., Sharma N., Sharma R., 2018.** Study on optimization of exopolysaccharides from a potentiel *Lactobacillus casei* KL14 KX774469. *International Journal Of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**(2):3410-3418.
- Sauer FG., Remaut H., Hultgren SJ., et Waksman G., 2004.** Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochimica Biophysica Acta*, **1694**: 259-267.
- Schembri M.A ., Blom J ., Krogfelt K.A ., et Klemm P., 2005.** Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, **73**: 4626- 4633.
- Schleifer K. H., Ehrmann M., Krusch U., et Neve H., 1991.** Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex. Orla- Jenson, 1919) nom. review of *Systematic and Applied Microbiology*, **4** : 386-388.
- Sherman J.M., 1937.** The streptococci. *Bacteriological Reviews*, **1**: 3–97.
- Sherman J.M., et Stark P., 1931.** Streptococci which grow at high temperatures. *Journal of bacteriology*, **22**: 275-285.
- Siezen R. J., Kok J., Abee T., Schaafsma G., Siezen, J. Kok R. J.,et Abee T. G., 2002 .**Lactic Acid Bacteria_ Genetics, Metabolism and Applications_ Proceedings of the seventh Symposium,Schafsma (eds.)
- Somers E.B., Johnson M.E., et Wong A.C.L., 2001.** Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science* **84**: 1926-1936.

Sreeremya S., 2017. A review on microbial biofilm. *International Journal Of Advance Research And Development*, **2**(1): 7-10.

Straka R.P., Stokes J.L., 1956. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. *Applied Microbiology*, **5**:21-25.

Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M., 2000. A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, **40**: 175–179.

Stiles M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**: 331-345.

Stiles M.E., et Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of food and their taxonomy. *Int.J.Food Microbiol.*36:1-29 *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen ,1919) non. *Reviews Systematic Applied Microbiology*, **14**:229-234.

Stingle, F., Neeser J.R., et Mollet B., 1996. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*. **178**: 1680–1690.

Stingle F., Newell J.W., et Neeser J.R., 1999. Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, **181**: 6354–6360.

Sutherland I.W., 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, **9**: 222-227.

Svjetlana M., et Jasmina V., 2007. characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum of Biologorum*, **109**(2): 5354-5362 .

Tailliez P., 2001. Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, **8**: 1-11.

Tamime A.Y., Deeth H.C., 1980. Yogurt : technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, **43**: 939-977.

Terzaghi B.E.,et Sandine W.E., 1975. Improved medium for lactic Streptococci and their Bacteriophage. *Applied Microbiology*, **6**(29) : 807-813.

Thomas T.D., 1973. Agar medium for differentiation of *streptococcus cremoris* from the other bacteria. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology*, **8** :70-71.

Toyofuku M., Inaba T., Kiyokawa T., Obana N., Yawata Y., et Nomura N., 2016. Environmental factors that shape biofilm formation, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **80**: 1, 7-12.

Valle J., Da Re S., Henry N., Fontaine T., Balestrino D., Latour-Lambert ., Ghigo J.M., 2006. Broad-sepectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **103**: 12558-12563.

- Van den Bogaard P. T., Hols P., Kuipers O. P., Kleerebezem M., et de Vos W. M., 2004.** Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 10–17.
- Vaningelgem F., Zamfir M., Adriany T., et De Vuyst L., 2004.** Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST111 in milk-based medium. *Journal of Applied Microbiological*, **97**: 1257-1273.
- Van Kranenburg R., Marugg J. D., van Swam I. I., Willem N. J., et de Vos. W. M., 1997.** Molecular characterization of the plasmidencoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, **24**: 387–397.
- Van Kranenburg R., van Swam I. I., Marugg J. D., Kleerebezem M., et de Vos W. M., 1999a.** Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: Functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *Journal of Bacteriology*, **181** :338–340.
- Van Kranenburg R., Vos H. R., van Swam I. I., Kleerebezem M., et de Vos. W. M., 1999b.** Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: Complementation, expression, and diversity. *Journal of Bacteriology*, **181**: 6347-6353.
- Varhimo E., Varmanen P., Fallarero A., Skogman M., Pyorala S., Iivanainen A., et al., 2011.** Alpha- and β -casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology*, **149**: 381–9.
- Vermeiren L., Devlieghere F., et Debevere J., 2004.** Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International journal of food microbiology*, **96**: 149–164.
- Vinodkumar C.S., Kalsurmath S., et Neelagund Y.F., 2008.** Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, **51** (3): 360-366.
- Wadstrom T., 1988.** Adherence traits and mechanisms of microbial adhesion in the gut. *Baillier's Clinical Tropical Medicine Communicable*, **3**: 417-433.
- Waters C. M., et Bassler B. L., 2005.** Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21**(1): 319-346.
- Wessels S., Axellon L., Hansen E.B., De Vuyst L., Laulund S., Lihteenmili L., Lindgen S., Mollet B., Salminen S., et von Wright A., 2004.** The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulations. *Trends in Food Science and Technology*, **15**: 498-505.
- Whiley, R. A., et Hardie J. M., 1988.** *Streptococcus vestibularis* sp. nov. from the human oral cavity. *International Journal Systematic Bacteriology*, **38**: 335–339.

- Whitfield C., 2006.** Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* **75**: 39-68.
- Whitfield C., 1988.** Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal Microbiology* ,**34**: 415-420
- Whittenbury R., 1978.** Biochemical characteristics of *Streptococcus* species. In: *Streptococci*. Ed. Skinner (F. A.) and Quesnel (L. B.), London. *Academie Press*.
- Wijman J. G. E., De Leeuw P. P. L. A., Moezelaar R., Zwietering M. H., et Abee, T., 2007.** Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 1481–1488.
- Wu Q., Tun H.M., Leung F.C., et Shah N.P., 2014.** Génomic insights in high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC1275. *Scientific Reports*, 1-8.
- Xue T., Chen X., et Shang F., 2014.** Short communication : effects of lactose and milk on the expression of biofilm –associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *Journal of dairy Science* , **97**: 6129-6134.
- Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. 2014 .** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **78**: 110-116.
- Yuksekdag N.Z., Aslim B., 2008.** Influence of different carbon sources on exopolysaccharides production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp.bulgaricus (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, **53**(3): 581-585;
- Zarate G., Morata De Am Brosini V.I., Perez Chaia A., et Gonzalez S.N, 2002.** Adhesion of dairy probionibacteria to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo. *Journal of Food Protection*, **65**(3): 534-539.
- Zeidan A., Poulsen V.K., , Janzen T., Buldo P., Derkx P.M. F., Oregaard G., et Neves A.R., 2017.** Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews* ,1-33.
- Zisu B., Shah N.P., 2003.** Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*, **86**: 3405–3415.
- Zourari A., Accolas J.P., et Desmazeaud M.J., 1992.** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *A review. Lait* , **72**: 1-34 .

Annexes

Annexe 01**Le milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975).****Composition en (g /l)**

Tryptone	05.00
Peptone de soja.....	05.00
Glycérophosphate di-sodium.....	19.00
Extrait de viande	05.00
Extrait de levure.....	02.50
L'acide ascorbique	00.50
Magnésium du sulfate.....	00.25
Lactose.....	20.00
Agar.....	20.00
pH= 6.9±0.2 à 25°C	

Annexe 02**Milieu Naylor et Sharpe (Naylor et Sharpe, 1958)**

Glucose	05.00
Peptone	10.00
Extrait de viande.....	10.00
NaCl.....	65.00
pH =7.00 ±0.2 à 25°C	

Annexe 03**Peptone saline (Straka et Stokes, 1957)**

Tryptone.....	
NaCl.....	08.50

Annexe 04**Tampon phosphaté (en g/ml)**

NaCl.....	0.876
Na ₂ HPO ₄	0.709
Eau.....	100.0
pH =7.00 ±0.2 à 25°C	

Annexe 05**Solution de rouge Congo (g/ml) (Kaiser *et al.*, 2013)**

Rouge Congo.....	8.0
L'eau distillée stérile.....	100

Annexe 06**Solution de rouge de ruthénium (g/ml) (Stingele *et al.*, 1996)**

Rouge ruthénium	8.0
L'eau distillée stérile	100

Annexe 07**Galerie API****Préparation de l'inoculum :**

Un volume de 1ml de préculture a été pris et mis en tube à Eppendorf pour subir une centrifugation à 10000rpm pendant 2min, on récupère le culot puis on ajoute 1ml d'un diluant simple avec une bonne agitation.

API 20 Strep

Selon le fournisseur (Api 20 Strep, biomérieux) la galerie API20 Strep comporte 20 microtubules contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.

Pour la réalisation des tests enzymatiques une suspension dense, réalisée à partir d'une pure est utilisée comme étant un inoculum, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisant par des virages colorés spontanés ou révélés par des réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. la fermentation des carbohydrates entraine une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue ou d'un logiciel d'identification.

Tableau de lecture

Tests	substrats	Réactions /enzymes	Résultats				
			Négatif		Positif		
VP	Pyruvate	Production d'acétoïne	VP 1+VP 2 / jusqu'à 10min(3) Incolore				Rose-rouge
HIP	Hippurate	Hydrolyse	NIN/jusqu'à 10 min Incolore/Bleu pale				Bleu foncé/Violet
ESC	Esculine	β -glucosidase	4h	24h	4h	24h	
			Incolore Jaune pale	Incolore Jaune pale Gris clair	Noir gris	Noir	
PYRA	Pyrrolidonyl 2 naphtylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	ZYM A +ZYM B/ 10min (PYRA ou LAP) (1) Besoin décoloré par éclaircissement intense Incolore ou orange très pale				Orange
α GAL	6-Bromo-2-naphtyl α - D-galactopyranoside	α galactosidase	Incolore		Violet		
β GUR	Naphtol AS-BI β -D-Glucuronate	β glucuronidase	Incolore		bleu		
β GAL	2-naphtyl β -D-galactopyranidase	β galactosidase	Incolore ou Violet très pale		Violet		
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	Incolore ou Violet très pale		Violet		
LAP	L-leucine 2-naphtylamide	Leucine aminopeptidase	Incolore		Orange		
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune		Rouge		
RIB	Ribose	acidification	4h	24h	4h	24h	
			rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
ARA	Arabinose	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
MAN	Mannitol	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
SOR	sorbitol	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
LAC	Lactose	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
TRE	Trehalose	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
INU	Inuline	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
RAF	Raffinose	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
AMD	Amidon (2)	acidification	rouge	Orange – rouge	Orange – jaune	Jaune	
GLYC	Glycogène	acidification	Rouge ou orange		Jaune franc		

- (1) Lors d'une deuxième lecture après 24heures d'incubation on peut remarquer un dépôt dans les tubes ou ont été les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal ne doit pas être pris en considération.
- (2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.
- (3) Une coloration rose pale obtenue après 10minutes doit être considéré négative.

API 20E

Cette galerie (biomérieux, Inc.) est utilisée pour identifier bacilles entériques gram négatifs, elle comporte 20 compartiments des tests séparés déshydratés, une suspension bactérienne est utilisée pour les réhydrater.

Tableau de lecture

Tests	substrats	Réactions /enzymes	Résultats	
			Négatifs	positif
ONPG	Ortho- nitro- phényl- galactoside	β galactosidase	Incolore	Jaune (1)
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé (2)
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé(2)
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	jaune	Rouge- /orangé(2)
CIT	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pale	Bleu vert /bleu(3)
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production de H ₂ S	Incolore /grisâtre	Dépôt noir/fin de liseré
URE	urée	Uréase	jaune	Rouge /orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	JAMES immédiat ou IND/2min	
			JAMES Incolore vert pale-jaune	JAMES rose
			IND jaune	IND Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1 +VP2 /10min	
			incolore	Rosé-Rouge
GEL	Gélatine de Kohn	gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	glucose	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
SAC	saccharose	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
MEL	melibiose	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
ARA	arabinose	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation(4)	Bleu /Bleu vert	Jaune

- (1) une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) une couleur orange apparaissant après 24h doit être considérée négative.
- (3) lecture dans la cupule (zone aérobie).
- (4) fermentation commence dans la partie inférieure des tubes alors que l'oxydation commence dans la cupule.