République Algerienne Démocratique et Populaire

Ministere de L'Enseignement Superieure et de la Recherche Scientifique

Université Dr. Yahia Fares –Médéa-

Faculté des Sciences

Mémoire de Master

Département : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

par

Mlle OULD ROUIS Yousra et Mlle KEBAILI Lyna

L'évaluation de l'éfficacité des désinfectants sur des souches d'entérobactéries productrices de biofilm isolées des mammites bovines

Devant le jury proposé, composé de :

Dr. AINES Mahfoud	MCA	Univ Médéa	Président
Dr. HOCEINI Amina	MCB	Univ Médéa	Examinatrice
Dr. FOUDIL Mohammed	MCB	Univ Médéa	Examinateur
Dr. NABI Ibrahim	MCB	Univ Médéa	Promoteur
Dr. ACHEK Rachid	MCA	Univ Khemis Meliana	Co-Promoteur

Médéa, 2021/2022

Remerciement

Nous tenons tout d'abord remercier « ***Dieu*** » le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donner la force et la patience d'accomplir ce modeste travail

En seconde lieu, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos Encadrants ***Mrs. NABI Ibrahim et ACHEK Rachid*** pour l'enthousiasme de chaque instant, leur confiance, leur aide durant toute la période du travail ainsi que pour leurs précieux conseils et le leurs orientations qui nous ont permis de bien avancer dans notre travail.

On remercie chaleuresement **l'équipe des ingénieurs** de laboratoire de notre faculté pour leurs efforts et leur patience toute la période de stage

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par ***Mr AINES Mahfoud*** Qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail, A ***Mlle .HOCEINI Amina*** qui a accepté d'analyser notre travail; tout on espérant des critiques et des orientations qui nous seront utiles dans notre vie professionnele ultérieurement INCHALLAH .

NOTRE profondes remerciement vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant les cinq ans

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi à tous ceux qui nous ont Prêté main forte pour la réalisation de ce mémoire



Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour

A mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon Enfance. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais. Je ne vous déçoive.

A ma belle-sœur ,

Je te remercie infiniment pour ton soutien moral et ton encouragement permanent

A mon cher frère,

Je te remercie beaucoup pour tes encouragements.

A toutes mes amies , surtout **Yousra**, Bouchra, **Meriem**, Maroua**, Raihana**, Amina et **Asma**

Je ne peux trouver les mots pour exprimer mon affection, merci pour l'encouragement que j'ai recue de votre part.

A mon cher binôme Yousrati, chère soeurette,pour notre sincère et profonde amitié et des moments agréables et difficiles que nous avons passé ensemble. Je te souhaite que du Bonheur, succés et prosspérité.

A toute ma famille pour votre soutien tout au long de mon parcours universitaire. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fuit de votre soutien infaillible.

A toute la promo de Microbiologie Apliquée (2020-2021)

Merci d'être toujours là pour moi ;

LYNA



Dédicace

Ce modeste travail est dédié spécialement à vous mes très chers parents :

A Mon cher Papa

Je te remercie pour tout. Je veux te dire que tu es plus qu'un père pour moi . Que dieu te garde pour nous.

Je t'aime BABA

A ma chére maman

Pour commencer je demande à tous ceux et celles qui liront ce paragraphe d'avoir une pensée à ma très chère defeinte mère que je n'oublierais jamais au si longtemps que je vivrais .priez pour moi pour que notre rencontre soit au paradis , que dieu m'arme de patience et de courage a fin que je puisse continue ma vie . Tous les mots ne peuvent exprimer mon amour éternel et ma gratitude, tu me manques tellement.

Je t'aime yama

Je vous promets de donner le meilleur de moi-meme pour ce aue vous soyez toujours fiere de moi. A Mes chères soeurs « **IMENE** ,NAWEL ,**MARWA** R,ANFEL,**MARWA B** ,FELLA , **MARWA O** et MOUNIRA». Je vous remercie de m'avoir soutenue et de m'avoir encouragé pleinement surtout dans les moments difficiles.

Mes chèrs frères « ABD EL HAK ,HCEN,WAFIK et ABD EL RAHIM »

Merci beaucoup pour votre amour et encouragement ,vous êtes mon soutien ,je vous aime .

À ma soeur et mon binôme lyna

Avec qui j'ai passé les moments les plus beaux et les plus fous , je te remercie pour ta bonté, ta confiance, ta sincérité et ton amitié qui conte tellement .

YOUSRA

Résumé :

La capacité de certains microorganismes à former des biofilms ne cesse d'augmenter ces dernières années. En effet, les biofilms sont définis comme étant un mode de vie qui permet aux bactéries de survivre et de résister dans des environnements hostiles. Par conséquent cette forme de survie représente un problème majeur pour les différentes industries alimentaires, y compris l'industrie laitière. Le but de cette étude est de tester la capacité des souches d'entérobactéries responsables de mammites cliniques isolées de différentes régions à former un biofilm par la méthode de Plaque de Culture de Tissu (TCP) et déterminer l'influence de quelques désinfectants (povidone- iodine, chlorhexidine, acide peracétique). Nous avons déterminé la concentration minimum inhibitrice (CMI) par la méthode de microtitration et la concentration minimum bactéricide (CMB) par culture en spot sur gélose MH. La résistance aux différentes classes d'antibiotiques été aussi étudié. Notre étude est faite sur 3O souches dans les quelles 100% des souches sont formatrices de biofilm par TCP mais a des degrés variables et pour l'étude de l'influence des désinfectants est menée sur huit souches (8/ 30) qui ont été choisies selon le potentiel de formation du biofilm a donné des résultats différents :en termes de puissance CHX est le plus fort que PVP-I et A.P car avec des concentration faible du CHX peut inhiber croissance bactérienne . Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques indiquent que toutes les souches étaient résistantes à au moins un antibiotique testé. Cette étude révèle que le lait de vache nécessite, avant toute utilisation, la mise en œuvre d'un programme de vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène afin d'assurer un produit sain pour le consommateur.

Mots- clés : Désinfectants, Chlorhexidine, Povidone iodine, Acide peracétique, Biofilm, Entérobactéries, MIC, MBC, antibiorésistance

ABSTRACT

The ability of some microorganisms to form biofilms continues to increase these years. Indeed, biofilms are defined as a way of life that allows bacteria to survive and resist in hostile environments. Therefore, this form of survival represents a major problem for the various industries the dairy industry. The purpose of this study is to test the strains of enterobacteria responsible for clinical mastitis isolated from different regions to form a biofilm by the Tissue Culture Plate (TCP) method and determine the influence of some disinfectants (povidone- iodine, chlorhexidine, peracetic acid) Regarding minimum inhibitory concentration (MIC) on microtitration plates and minimum bactericidal concentration (MBC) per spot culture on MH agar. The resistance to the different classes of antibiotics has been determined also. Our study is made on 3O strains in which 100% of strains are biofilm producers by TCP but has varying degrees and for the study of influence disinfectants are carried out on eight strains (8/ 30) which have been selected according to the potential of biofilm formation has given different results:in terms of power CHX is stronger than PVP-I and A.P because with low CHX concentrations can inhibit bacterial growth . Results of antibiotic susceptibility indicate that all strains were resistant to at least one antibiotic tested. This study reveals that milk from cow requires, before any use, the implementation of an extension program good hygiene practices to ensure a healthy product for the consumer.

Keywords: Disinfectants, Chlorhexidine, Povidone iodine, Peracetique acid, Biofilm, Enterobacteria, MIC, MBC, antibio-resistance, Biofilm, Enterobacteria,

الملخص:

زادت قدرة بعض الكائنات الحية الدقيقة على تكوين الأغشية الحيوية في السنوات الأخيرة .في الواقع، يتم تعريف الأغشية الحيوية على أنها طريقة حياة تسمح للبكتيريا بالبقاء والمقاومة في بيئات معادية .لذلك، فإن هذا الشكل من البقاء يمثل مشكلة رئيسية لمختلف الصناعات الغذائية، بما في ذلك صناعة الألبان

لغرض من هذه الدراسة هو اختبار قدرة سلالات البكتيريا المعوية المسؤولة عن التهاب الثدي السريري المعزول من مناطق مختلفة، لتشكيل غشاء حيوي بواسطة صفيحة زراعة الأنسجة (TCP)وتحديد تأثير بعض المطهرات (يود بوفيدون، كلورهيكسيدين، حمض بيراسيتيك ، فيما يتعلق الحد الدنى من التركيز المثبط CMI على الصفائح الدقيقة و الحد الأدنى من التركيز القاتل CBM على وسط الزرع MH وتحديد تأثير المطهرات عن طريق التركيزات المثبطة ,CMI) بالإضافة إلى تحديد مقاومة الفئات المختلفة من المضادات الحيوية تم إجراء دراستنا على 30سلالة حيث 100% من السلالات قامت بتكوين الأغشية الحيوية بواسطة TCP ولكن بدرجات متفاوتة ويتم إجراء دراسة تأثير المطهرات على 8سلالات 30/8 التي تم اختيارها وفقًا لإمكانية تكوين الأغشية الحيوية حيث أعطت نتائج مختلفة:من حيث الفعالية : CHX أقوى من PVP-I و AP لأنه ب تركيزات منخفضة يمكن أن يمنع نمو البكتيريا تشير نتائج قابلية المضادات الحيوية إلى أن جميع السلالات كانت مقاومة لمضاد حيوي واحد على الأقل تم اختباره تكشف هذه الدراسة أن حليب البقر يتطلب، قبل أي استخدام، تنفيذ برنامج لتوسيع ممارسات النظافة الجيدة من أجل ضمان منتج صحي للمستهلك.

الكلمات الرئيسية : الاغشية الحيوية ,البكتيريا المعوية, المطهرات، طريقة صفيحة زراعة الأنسجة , PVP-I , A.P ,CMI ,CBM .

Liste des abréviations.

ABDAC : Chlorure de Benzalkonium

AP : Acide peracétique

API20NE : Appareillage et Procédés d'Identification des Non Entérobactéries (galerie biochimique)

ATB : Antibiotiques

AI : Auto-Inducteur

ATP : Adénosine Triphosphate

AI : Auto-Inducteur

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

BN : Bouillon Nutritif

CHX : Chlorhexidine

CV : Cristal Viole

DO : Densité Optique

EDS : Eau Distillée Stérile

DIDAC : Chlorure de Didecylméthylammonium

E. coli : Escherichia Coli

EPS : Exo-poly-Saccharides.

GN: Gélose Nutritive

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HLD : High –Level Désinfectant

HOCI : Hypochlorus Acid/ Acide hypochloreux

H2O2 : Peroxyde D'hydrogène

ICEs : Eléments D'intégration et de Conjugaison

IQS : Inhibiteurs Quorum Quenching

K.P: Klebsiella Pneumoniae

LLD : low level Désinfecta

LPS : Lipo-polysaccharides

MBC : Concentration Minimum Inhibitrice

MH : Mueller-Hinton

MIC : Concentration Minimum Bactéricide

MLD : Medium Level Désinfectant

NaOCI : Hypochlorite de Sodium

PIA : Polysaccharide Intercellulaire Adhésine

PKA : Primary Knock –on Atom.

PGA : Poly-β-1,6-Nacétylglucosamine

PVP : Povidone-Iodine

QQ : Quorum Quenching

QS : Quorum Sensing

RCA : Rouge Congo Agar

RND : Résistance-Nodulation -Division

S. aureus : Staphylococcus aureus

SDS : Dodécylsulfate de Sodium

SI : Séquence d'insertion

TCS : Substrats comprennent le Triclosan

TCP : Plaque de Culture de Tissu

TSB : Trypticaseib Soy Broth

Liste des figures

Figure 1 : Représentation histologique de la structure tubulo-alvéolaire de la mamelle **(Hanzen, 2016)**…… …….3

Figure 2 : Physiopathologie des mammites …..……..……...….6

Figure 3 : Différents aspects de biofilms bactériens **(Donlan, 2002)** …….....11

Figure 4 : LES étapes de formation de biofilm……...…….....14

Figure 5 : étapes de formation du biofilm par *E. coli* ……..……16

Figure 6 : Mécanismes de détection du quorum sensing de *Salmonella* et des principales voies bactériennes régulées par chacun de ces mécanismes……..…..…..20

Figure7 : Schéma récapitulatif des mécanismes du QS bactérien et des différentes stratégies duQQ**(Mion,2019**)……..…21

Figure 8 : Diagramme d'illustration des différents mécanismes de tolérance aux désinfectants **(Tong et *al*., 2021)**…….....27

Figure 9 : éléments génétiques horizontaux mobilisés lors du transfert de gènes intracellulaires et intercellulaires entre cellule donneuses et receveuses **(Partridge et *al* 2018**)……..…….32

Figure10 : enrichissement dans le milieu BHIB……...…..…38

Figure 11:ensemencement sur mileu Hektoen…….…..38

Figure 12 : les étapes de la méthode de formation de biofilm TCP ……..40

Figure 13 : Principe des techniques de quantification des biofilms **(Laurent, 2011)** ….....**41**

Figure 14: les désinfectants utilisés ……..…… ……**43**

Figure 15: essai avec 0.1A.P ……..…**45**

Figure 16 : essai avec 1.5% PVP-I…….……....**45**

Figure 17 : essai avec 0.000025% CHX…….……....…**45**

Figure 18 : photo représente l'interprétation des CMI ……..…**45**

Figure 19 : détermination la CMB ……....**46**

Figure 20 : Préparation l'étalon de 0.5 Mac Farland …….....…48

Figure 21 : Ensemencement avec l'écouvillon. …… ...…**48**

Figure 22 : Application des disques d'antibiotiques ……..…**49**

Figure 23 : Conservation des souche…….**50**

Figure 24 : Les différents aspects des colonies d'entérobactéries trouvées…….…..55

Figure 25 : Photographie personnelle présentant les résultats exemplaires de MIC (96-puits) et MBC (culture en spot)……..…60

Figure 26 : La susceptibilité aux désinfectants (PVP-I, CHX, AP) en terme du potentiel de production de biofilm (MBP *vs* WBP)…….62

Figure 27 : La susceptibilité aux désinfectants sur les isolats d'*K. oxytoca* en terme du potentiel de production de biofilm (MBP *vs* WBP)…….63

Figure 28 : La susceptibilité aux désinfectants sur les isolats d'*E. coli* en terme du potentiel de production de biofilm (MBP *vs* WBP)……64

Figure 29 : Photos de test de synergie pour recherche de BLSE ……...68

Liste des tableaux

Tableau 1 : Symptomes locaux et généraux des mammites……7

Tableau 2 : Espèces d'entérobactéries responsables de mammites cliniques……..…..8

Tableau 3 : Spectre d'activité des antiseptiques et désinfectants **(CCLIN, 2000**)……..…..25

Tableau 4 : mécanismes d'action des antiseptiques et désinfectants **(CAPP, 2007**)……26

Tableau 5 : les pompes efflux pour les désinfectants et agents antimicrobiens **(Tong et *al.*, 2021**)……...29

Tableau 6 : Le nombre et les origines des souches utilisée (30 souches)…….37

Tableau 7 : Classification de la formation de biofilm selon Stapanovic et al., 2007.....41

Tableau 8 : Les souches utilisées pour tester l'efficacité de désinfectants sur la formation du Biofilm……42

Tableau 9 : Description des échantillons de lait de mammites prélevés……..51

Tableau 10 : Répartition des souches d'entérobactéries isolées et identifiées…….53

Tableau 11 : Caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries isolées. ……..…….57

Tableau 12 : MIC (minimum inhibitrice concentration) des différents désinfectants ..….58

Tableau 13 : MBC (minimum bactericid concentration) des différents désinfectants……59

Tableau 14 : Résultats de sensibilité aux antibiotiques…… ……66

Tableau 15: Interaction entre capacité de formation de biofilm et l'antibiorésistance…..68

SOMMAIRE

Résumé…… I

Liste des abréviations…… IV

Listes des figures ……VI

Liste des tableaux…… VIII

Sommaire……IX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction……..…1

Chapitre I : Les Mammites Bovines à Entérobactéries…….…… ..3

1.Rappel anatomique…….3

2.Généralité sur les mammites bovines…….3

2.1. Définition……..…3

2.2. Pathogénie……...…4

2.2.1. La phase d'invasion……...…4

a. Exposition de la mamelle à l'agent pathogène……..…4

b. Pénétration des microorganismes…….…5

2.2.2. La phase d'infection……..…… 5

2.2.3. La phase d'inflammation……..…....5

3.Classification des mammites…….…....6

3.1. Mammites cliniques……...…6

3.1.1. Mammites Suraigues……..…....6

3.1.2. Mammites aigues…….…..… 7

3.1.3. Mammites chroniques……...…… 7

3.2. Mammites Subcliniques……..….... 7

4.Les Mammites à entérobactéries…….…..… 8

Chapitre II : Les Biofilms bactériens chez les entérobactéries…….…..…. 10

1.Généralité sur le biofilm……....…. 10

1.1. Historique…….…..... 10

1.2. Définition et caractéristiques…….....10

2. Les mécanismes de fonction de biofilm……...…..10
2.1. Conditionnement de la surface…….....11
2.2. Phase d'adhésion…….....12
2.2.1. L'adhésion réversible…….... 12
2.2.2. L'adhésion irréversible……. . 12
2.3. L'agrégation des micro-colonies…… 12
2.4. La maturation du biofilm…… 12
2.5. Le détachement des bactéries…….. 13
3. La formation de biofilm chez les entérobactéries…… 14
3.1. Klebsiella Pneumoniae…….. 14
3.2.Klebsiella Oxytoca…….....15
3.3. Escherichia coli…….....15
4. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm…….....16
4.1. Caractéristiques de la surface…….....16
4.1.1. Rugosité de la surface…….....16
4.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface…….16
4.1.3. Présence de films protéiques sur la surface…….....17
4.2. Caractéristiques du milieu…….17
4.2.1. Température…….17
4.2.2. Le Ph……17
4.2.3. Sources de carbone et concentrations en nutriments…….……17
4.2.4. Concentrations en certain cations……..17
4.2.5 Hydrodynamique du fluide…….…….....18
4.3.Propriétés des cellules……..……18
5.Support génétique de la formation de biofilm……..……..…18
6. Transfert d'information génétique au sein du biofilm……..……19
7. Mécanismes régulateurs de la formation de biofilm…….……. 19
7.1. Quorum Sensing…….…….19
7.2.Quorum Quenching…….……..20

8. Importance de biofilm dans le secteur laitier…….……21

8.1. Dans l'industrie agro-alimentaire……..……21

8.2. Biofilm et mammites bovines…….. 22

8.3.Impact des biofilms sur la qualité du lait…….…… .23

Chapitre III : Impacts/ Réponses entre Désinfectants et Biofilms……. 24

1.Définition…….…...24

- L'eau de Javel……..24
- Le glutaraldéhyde…….24
- L'acide péracétique……..24
- Le DIDAC……....24

2. Le mécanisme d'action des désinfectants……..……24

3.La tolérance aux désinfectants……26

3.1.Limitation de la diffusion par formation de biofilms…….... 27

3.2.Effet de blocage de la membrane……...27

3.3. Système pompes efflux…….…....28

3.4.Inactivation des enzymes…….…….....29

4.Support moléculaire et aquisition de la tolérance aux désinfectants…….....30

4.1. Les transposons composites (Tn), séquaces d'insertion (IS) et tronsposons unitaires ……30

4.2. Les intégrons et les cassettes de gènes……...31

4.3. Les ilots génomique ICE (éléments conjugatifs)…….….31

4.4. Le rôle de la régulation des gènes dans la résistance aux désinfectants…..……...32

5. Les liaisons biofilm et tolérance aux désinfectants…….33

5.1. La limitation de la diffusion/réaction des désinfectants dans matrice de biofilm..33

5.2. L'adaptation phénotypique…….…33

5.3. Le transfert et mutation de gènes de résistance à l'état de biofilm……34

PARTIE PRATIQUE

Chapitre IV : Matériels et Méthodes……35

1.Contexte et concept de l'étude……...……..35

2. Lieu et période d'étude……..…….36

3. Matériel utilisé.....……. 36

3.1. Matériel non biologique…….……...…….…..…..... 36

3.2. Matériel biologique……..…….…..... .36

3.2.1. Origine des souches……..…..…. 36

4. Méthodologie de travail.……..….. .38

4.1. Revivification des souches…….……..... 38

4.2. Etude de la formation du biofilm……..…….……. 38

- Mode opératoire……..…….. .39
- Lecture de la microplaque…….…….……... .41

4.3. Etude de l'efficacité de de quelques désinfectants sur la formation du biofilm…..42

4.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)……...…….42

- Mode opératoire…….……....….43

4.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)…….....46

- Mode d'opératoire..……..…...46

4.3 .3. Détermination des effets sous-inhibiteurs d'un désinfectant…..…….…47

4.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)……..……...…47

- Technique de l'antibiogramme……..…..…47
- Application des disques d'antibiotiques…….…….48
- Méthode de lecture……...…….……..48

4.5. Recherche des β-lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries….. 49

4.6. Conservation des souches…… 50

Chapitre V : Résultats et Discussion…….…... 51

1.Caractères épidémiologiques des échantillons analysés…….…….…. 51

2. Analyses bactériologiques et identification des espèces bactériennes…….……..52

3. Résultats du potentiel de formation de biofilm…….…..….55

4. Détermination de la susceptibilité aux désinfectants (MIC/MBC)…….……....58

5.Susceptibilité aux désinfectants et potentiel de production de biofilm/espèces….....61

6. Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques……..….66

7.Relation entre potentiel de production de biofilm et profil de l'antibiorésistance…...68

Conclusion et recommandations ……....70

Références bibliographiques.

Annexes.

INTRODUCTION



En élevage laitiers, la mammite est la maladie la plus courante et qui responsable d'importante pertes économiques, du fait à la diminution de la production laitière, l'augmentation des coûts des soins et l'augmentation des taux d'abattage et de mortalité (Melchior *et al*. 2006). De plus, la mammite constitue, pour la santé humaine, un risque potentiel de propagation d'agents infectieux de multirésistance, de zoonoses, ou de toxines alimentaires (Fernandes *et al.* 2011).

Classiquement, les mammites peuvent être classées -en fonction du mode de transmission- comme « contagieuse » ou « environnementale ». Les principaux micro-organismes contagieux sont les *S. aureus* et *Streptococcus* ; D'autre part, les agents pathogènes environnementaux sont d'origine de l'habitat de la vache comme les *Streptococcus* et les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Klebsiella*) (Bogni *et al.* 2011). Ces derniers, sont connus pour être responsable à des mammites dites récurrente de nature sub-clinique à potentiellement clinique.

Les infections récurrentes sont souvent attribuables aux biofilms (Vasudevan *et al.* 2003). De ce fait, les mammites d'environnement sont un problème préoccupant puisque 40 % des cas de mammites résultent de la récidive d'une mammite précédente ou après échec thérapeutique (Hillerton *et* Kliem 2002). Le lien entre les infections récurrente/échec thérapeutique mènent à des adaptations de micro-organismes entraînant, entre autres, une perte de sensibilité à pratiquement toutes les classes d'antibiotiques (Melchior *et al.* 2006).

La désinfection est une stratégie courante -dans les élevage industriels- pour contrôler la contamination bactérienne dans les élevages laitiers ; et qui est utilisé d'une manière intensive. Elle peut être appliqué à toute l'environnement de la vache, en commençant par la désinfection des mamelons, au traitement des surfaces, jusque nettoyage des tanks de lait. L'utilisation intensive des biocides expose les microorganismes à des stress qui pourrait augmenter leur adaptabilité à l'échappement et générer de la résistance (Marquez *et al* 2017). De plus, des rapports cumulatifs démontrent que l'exposition bactérienne à des concentrations sous-inhibitrices de désinfectants induisent des tolérances à des larges classe de produits chimique (phosphate trisodique, chlorite de sodium acidifié, acide citrique, dioxyde de chlore ou acide peroxyacétique) et également induit une sensibilité réduite à divers antibiotiques (Marquez *et al* 2017).

En Algérie, le caractère de la production laitière est basé sur des petites entreprises de production, voir sur des élevages traditionnels. La maitrise hygiénique de l'environnement des ces élevage est qualifié « précaire » ; néanmoins, l'occurrence des mammites et son aspect récurent est constaté fortement. L'utilisation des désinfectants par les éleveurs algériens est mal maitrisée, les doses sont non respectées et son application est souvent non durable.

Par conséquent, il nous a apparu très intéressant d'établir une investigation pour explorer la tolérance aux désinfectants (les plus utilisés) des isolats d'entérobactéries responsables de mammites cliniques prélevé sur de petites et moyennes entreprises locales d'élevage laitier ; et d'analyser la résistance aux antibiotiques.

Pour ce faire, ce mémoire -ci-présent- a pour objectifs :

1. Identifier les espèces d'entérobactéries responsables de mammites cliniques par galerie API20E, sur 70 échantillons de lait.
2. Déterminer le potentiel de production de Biofilm par microtitration (30 isolats).
3. Déterminer le niveau de la tolérance aux trois désinfectants (Povidone-iodine, Chlorhexidine et Acide peracétique). En termes de concentration minimum inhibitrice (MIC) et concentration minimum bactéricide (MBC).
4. Déterminer l'effet des concentrations sub-ihibitrices (MIC, ½ MIC, ¼ MIC, 1/8 MIC) sur le potentiel de production de biofilm.
5. Déterminer la résistance aux différentes classes d'antibiotiques

CHAPITRE 1

Les Mammites Bovines à Entérobactéries

1. Rappel anatomique:

Chez les mammifères, la mamelle est une glande exocrine tubulo-alvéolaire ; chez la vache, elle est composée de quatre quartiers indépendants, situés sur la face ventrale de l'animal **(Frandson, 2009).** Les alvéoles, organisés en grappes, sont entourés d'un tissu conjonctif appelé -stroma- et s'ouvrent sur des arborisations canaliculaires : les canaux galactophores qui drainent chaque alvéole se rejoignent pour former des canaux tertiaires. Ces derniers se rassemblent en canaux secondaires puis primaires qui aboutissent à une citerne. Au moment de la traite, 60% du lait se trouve dans les alvéoles, 20 % dans les canaux et 20 % dans la citerne.

A la base de la citerne de la glande mammaire se trouve le trayon (ou pis) qui représente un conduit ouvert envers le milieu extérieur. À l'extrémité inférieure du trayon se trouve le canal du trayon ; à cet endroit, les fibres musculaires lisses associées aux fibres élastiques et à celles de collagène se condensent à l'apex du trayon en un sphincter assurant normalement l'occlusion du canal **(Hanzen, 2016) (Figure 01)**.

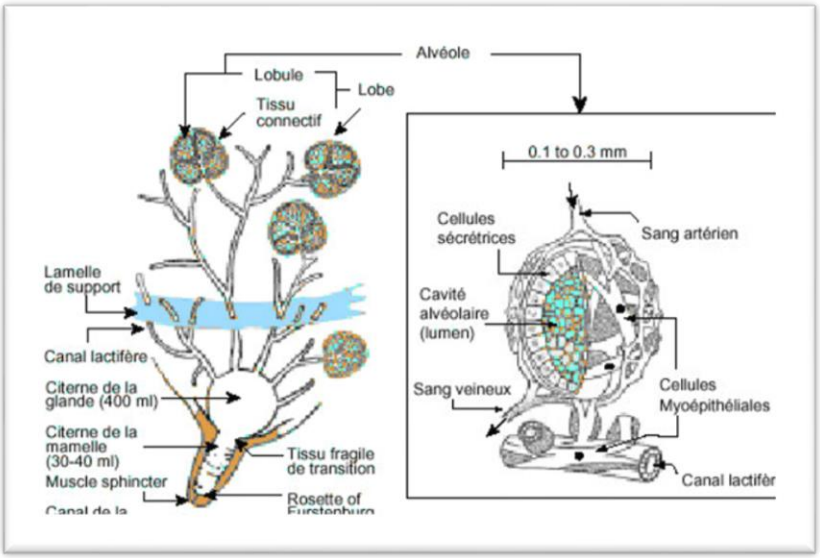


Figure 01 : Représentation histologique de la structure tubulo-alvéolaire de la mamelle **(Hanzen, 2016).**

2. Généralité sur les mammites bovines :

2.1. Définition :

La mammite est un état inflammatoire de la mamelle **(Hanzen, 2016)**. La mammite est dite bactérienne, lors à la présence et/ou à la multiplication dans le parenchyme mammaire d'une (ou plusieurs) espèce(s) bactérienne(s) pathogène(s). La réaction inflammatoire, envers

l'agent pathogène, à l'origine de lésions tissulaires néfastes et une augmentation de la perméabilité entre le compartiment sanguin et le lait, ce qui a pour conséquences des modifications physico-chimiques de la composition du lait et une augmentation du nombre de cellules inflammatoires **(Bouaziz, 2021).**

L'inflammation mammaire se développe lorsqu'un agent pathogène réussit à traverser les barrières du canal du trayon et à se multiplier au sein du parenchyme mammaire. Lorsque les mécanismes de défenses immunitaires combattent cette infection de façon efficace, la mammite sera de faible intensité et transitoire. Par contre, lorsque les mécanismes de défense sont affligés, lors de la période de parturition par exemple, ou lorsque l'agent pathogène possède des facteurs de virulence et des mécanismes d'évasion face au système immunitaire, la mammite sera plus sévère ou chronique. L'intensité de la réponse inflammatoire déterminera le type de mammite, sub-clinique ou clinique.

Classiquement, les mammites sont classées, selon l'origine de l'agent infectieux, en deux grandes catégories : contagieuses et environnementales. Les agents pathogènes qui sont considérés comme étant contagieux sont ceux qui possèdent une affinité aux glandes mammaires et sont adaptés pour survire et multiplier dans ce compartiment de l'hôte. Le mode de transmission se fait principalement d'un quartier infecté vers un quartier sain et d'une vache à l'autre lors du moment de la traite.. Alors que, les microorganismes pathogènes de l'environnement sont des agents opportunistes qui infectent occasionnellement la glande mammaire, se multiplient en engendrant aussi une réponse immune mais sont rapidement éliminés **(Julie-Hélène, 2014).**

2.2. Pathogénie :

Plusieurs étapes se succèdent le processus infectieux lors des mammites **(Figure 02).**

2. 2.1. La phase d'invasion : Elle se déroule en deux étapes :

a. Exposition de la mamelle à l'agent pathogène :

L'infection de la mamelle par voie endogène est exceptionnelle, cependant l'excrétion de microorganismes viables dans le lait sans qu'il y ait réellement une mammite clinique, est parfois rencontrée dans certaines pathologies : Brucellose, Tuberculose, Para-tuberculose, Salmonellose et Chlamydiose **(Poutrel, 1985).**

En général, le processus infectieux commence par la contamination de l'extrémité du trayon surtout au moment de la traite. Les facteurs de l'environnement tels que le type de stabulation, le climat, et la litière jouent un rôle déterminant. En second, il a été démontré que la contamination du trayon est largement influencée par la morphologie ; les mamelles pendulaires, les longs trayons et les trayons cylindriques réduisent les distances par rapport au sol et augmentent les risques de traumatismes accidentels. Or, les lésions ainsi créées constituent des réservoirs de microorganismes qui augmentent les probabilités d'infection. **(Poutrel, 1985).**

b. Pénétration des microorganismes :

Les bactéries peuvent franchir le sphincter du canal du trayon, notamment lors d'une traite où un vide trop important qui provoque la destruction partielle de la kératine du canal du trayon en favorisant l'impact de gouttelettes de lait chargées de bactéries. D'autre part, les trayons à diamètres plus larges, seraient plus favorables au passage des agents infectieux, ainsi que ceux qui présentent des lésions ou des coupures profondes qui transforment les trayons en des réservoirs importants pour les microorganismes pathogènes **(Poutrel, 1985).**

2.2.2. La phase d'infection :

C'est le stade où les germes passent de la partie inférieure du sinus du trayon au sinus de la mamelle, aux canaux et canalicules lactifères et finalement aux acini mammaires. Les germes vont coloniser la mamelle ainsi, les enzymes et les toxines qui sont élaborées lors de leur multiplication vont d'une part entraîner des lésions du tissus sécrétoires avec pour conséquence des modifications quantitatives et qualitatives de la production lactée, d'autre part, initier une réaction inflammatoire dans la composante principale du parenchyme mammaire est l'afflux de polynucléaires neutrophiles vers le site d'infection **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).**

2. 2. 3. La phase d'inflammation :

L'inflammation est en fonction à mettre un ensemble de mesures bien adaptées à la virulence de l'agent agresseur, et aux dommages cellulaires et tissulaires résultants. Cette réaction est caractérisée par la sécrétion locale de substances immuno-modulatrices (cytokines) et par l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium des alvéoles, préalable à l'afflux dans le lait de cellules phagocytaires et de diverses substances effectrices (immunoglobulines, complément, lactoferrine…) en provenance de la circulation sanguine

(Faroult, 2000.) L'inflammation peut s'accompagner de signes cliniques locaux tels que la présence de grumeaux dans le lait, de quartiers durs, enflés ou douloureux, mais, le plus souvent, l'inflammation est sub-clinique sans aucune anomalie directement perceptible du lait, de la mamelle ou de l'état général de l'animal **(Faroult, 2000).**

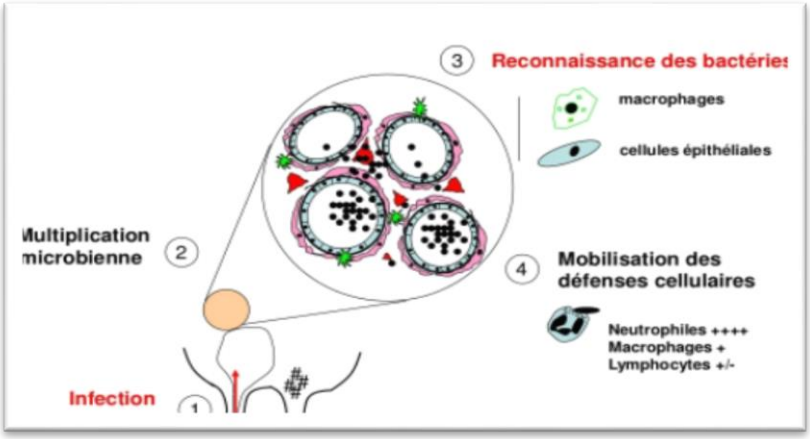


Figure 02 : Physiopathologie des mammites.

3. Classification des mammites :

Les mammites sont classées, selon les modifications de la mamelle (chaleur, douleur, rougeur, gonflement) et de la composition du lait (grumeaux, couleur) ou non en mammites cliniques et sub-cliniques (**Tableau 01**) **(Ledu, 1985 ; Blains, 2004).**

3.1. Mammites cliniques :

Les mammites cliniques s'accompagnent parfois d'une très forte réaction inflammatoire et de symptômes graves qui peuvent être spectaculaires (congestion, œdème, sécrétion de lait décomposé ou purulent, abcès, fistule, gangrène…) et parfois sont associés à des signes généraux plus moins intenses (hyperthermie, troubles nerveux, amaigrissement…) **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).**

3.1.1. Mammites Suraiguës :

Elles sont rares mais généralement mortelles. Elles sont caractérisées par une inflammation violente d'apparition brutale, due à des germes toxinogènes, responsables de symptômes généraux graves : fièvre, abattement, état de choc pouvant conduire à la mort. Parmi ces mammites, on peut distinguer les mammites gangreneuses, qui apparaissent chez la vache en lactation. Elles se traduisent par un syndrome d'hyperthermie intense voir une fièvre

(40-41°C), et de signe de gangrène due le plus souvent aux *Staphylococcus aureus* productrices de l'hémolysine α. Cette toxine provoque de la vasoconstriction locale prolongée qui empêche l'irrigation sanguine de la partie distale du quartier infecté, entraînant la nécrose des tissus mammaires **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).**

3.1.2. Mammites aiguës :

Elles surviennent subitement, avec des symptômes généraux marqués : syndrome fébrile, abattement plus ou moins profond. Les symptômes locaux sont importants (forte inflammation), quartiers atteints sont tuméfiés, rouges, chauds et douloureux **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).**

3.1.3. Mammites chroniques :

Elles surviennent suite à un passage d'une forme subaiguë sans guérison bactériologique. Les mammites chroniques sont caractérisées par des symptômes locaux discrets, tardifs ; des symptômes fonctionnels, et absence de symptômes généraux **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).**

3.2.Mammites subcliniques :

Contrairement aux mammites cliniques, les mammites subcliniques ne s'accompagnent d'aucun symptôme, ni général, ni local, ni fonctionnel. Il n'y a pas d'inflammation macroscopique évidente, mais l'examen du lait révèle l'existence d'une infection, par une augmentation du comptage cellulaire et par une altération des propriétés chimiques du lait **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).**

Tableau 01 : Symptomes locaux et généraux des mammites

	Normal	**Subclinique**	**Clinique**		
			1	**2**	**2**
			Chronique	**Aiguës**	**Suraiguë**
Etat général	-	-	-	-	+
Etat de la glande	-	-	-/+	+	++
Aspect du	-	-	+	++	+++
Cellules	-	+	+	++	+++
Germes	-	+	+	++	+++

4. Les mammites à entérobactéries :

Les infections mammaires provoquées par les entérobactéries sont dues à de nombreuses espèces, avec une prédominance d'*Escherichia coli* **(Tableau 02)**. Ces espèces, commensales du tube digestif élimineés par les matières fécales se caractérisent par leur capacité à se multiplier dans les litières, qui constituent leur principal réservoir de contamination dans l'élevage. La contamination de la peau et des trayons se fait essentiellement lors du couchage, par contact avec la litière ou les déjections souillants l'animal . Le passage à travers le canal du trayon peut s'effectuer à l'occasion de la traite, dans l'intervalle entre les traites ou pendant la période sèche. Ces bactéries se multiplient aisément dans les sécrétions mammaires, sauf dans la mamelle involuée, où l'augmentation du rapport lactoferrine/citrate compromet leur survie en rendant l'acquisition du fer difficile. Classiquement, *Escherichia coli* constitue le paradigme du germe "opportuniste" en pathologie mammaire **(Serieys & Blanche, 2016).**

Tableau 02 : Espèces d'entérobactéries responsables de mammites cliniques.

Espéces	% d'implication dans les mammites cliniques
E. coli	34,7
Serratia sp	2,7
Klebsiella sp	2,4
Citrobacter sp + *Enterobacter* sp + *Morganella* sp	1,2
Total des entérobactéries	40,9
Autres espéces	59,1
Total	100

Une divergence en pathogénicité des mammites à entérobectéries est liée à des différences entre espèces et entre les souches d'une même espèce. Quelques espèces d'entérobactéries peuvent coloniser la mamelle en début de tarissement. L'exemple du *Klebsiella* sp et de *Serratia* sp qui présentent une aptitude particulière à se multiplier *in vitro* dans la sécrétion de la mamelle tarie et à survivre en présence de concentration élevée de lactoferrine.

La présence d'une capsule polyosidique autour de la paroi de certaines espèces d'entérobactéries, comme *Klebsiella* sp, ou de quelques souches d*'E. coli*, paraît jouer ici un rôle déterminant en protégeant les bactéries de l'action des immunoglobulines. Les bactéries

capsulées sont moins sensibles à la phagocytose par les leucocytes polynucléaires neutrophiles et à la lyse par le complément. La capsule pourrait permettre à la bactérie de mieux résister aux anticorps naturels de la vache, dirigés contre ses systèmes d'acquisition du fer à haute affinité, notamment à entérobactine. Les bactéries pourraient ainsi continuer à se multiplier dans les sécrétions de la mamelle tarie en présence de concentration élevées de lactoferrine.

L'existence ou non d'une phase subclinique longue dans la pathogénie des infections à *E. coli* est liée aux caractères d'adhésion et d'internalisation des souches dans les cellules épithéliales mammaires. Les *E. coli* d'origine mammaire ont une capacité d'adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales mammaires plus élevée que des souches d'autres origines . Les souches issues d'infections mammaires chroniques sont internalisées, alors que celles issues de mammites cliniques aiguës ne le sont pas **(Serieys & Blanche, 2016).** Par ailleurs, les souches *d'E. coli* isolées de mammites cliniques récurrentes ont des capacités d'adhésion ou d'invasion des cellules épithéliales mammaires en culture plus importantes et plus rapides que les souches isolées de mammites cliniques non répétitives. L'expression par les bactéries de protéines de surface qui interviennent dans leur adhésion aux cellules épithéliales mammaires et dans leur internalisation dépend de leur environnement. Ce phénomène pourrait expliquer une certaine évolution temporelle conduisant à la persistance des infections mammaires chez la vache. **(Serieys & Blanche, 2016).**

La sévérité de l'expression clinique (subaiguë, aiguë, suraiguë) et sur leur issue, est en interaction complexe entre l'espèce bactérienne, les facteurs de virulence de la souche, le moment où la bactérie peut s'implanter dans la mamelle et l'immunité naturelle de la vache. **(Serieys & Blanche, 2016).** Manifestement, dans les mammites cliniques aiguës avec bactériémie, l'endotoxine libérée ne suffit pas à expliquer l'évolution et l'issue de l'infection. Il existe une liaison évidente entre le degré de gravité des infections et leur persistance. Ainsi, les mammites suraiguës à entérobactéries ne sont pas précédées d'une phase subclinique, alors que les infections les plus persistantes, si elles passent à l'état clinique, donnent plus volontiers le type subaigu. Ceci peut être due à une liaison entre les facteurs de virulence qui déterminent la persistance et la sévérité des infections. d'autre part, l'état subclinique stimule l'immunité naturelle de la vache *vis-à-vis* des antigènes communs de l'endotoxine. Cela favoriserait ainsi une expression particulièrement discrète de l'infection lors de la lactation suivante sous forme subclinique, avec d'éventuels épisodes cliniques subaigus **(Serieys & Blanche, 2016).**

CHAPITRE 2

Les Biofilms Bactériens Chez les Entérobactéries

1. Généralité sur le biofilm :

1.1. Historique :

La découverte des biofilms est attribue à l'inventeur du microscope, **Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723**), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de micro-organismes à la surface des dents **(Donlan, 2002).** En 1933, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. **Henrici** observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries vivantes en milieux aqueux sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface, et non pas sous forme planctonique **(Henrici, 1933).**

Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé. **Claude E. Zobell**, démontra vers 1936 que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. En 1943, il montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation de communautés bactériennes fixées sur les surfaces **(Costerton, 1963).**

Jones (1969), travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, confirma non seulement les agrégats mono ou poly-microbiens, mais aussi l'existence d'une matrice poly-osidique. **Characklis (1973)** démontre que des dépôts microbiens installés dans des conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent résistants aux désinfectants. Puis, en **1978, Costerton** et son équipe proposèrent les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes. Ils proposèrent pour la première fois le terme de « biofilm », en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes **(Harold et *al*., 1997 ; Rodney et *al*., 2002; Branger, 2007).**

La capacité à former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique microbienne universelle **(Tremblay et *al*., 2014).** Plusieurs techniques et outils technologiques, ont permis de découvrir des informations surprenantes sur ce mode de vie imposant ; à savoir, la microscopie à balayage, la microscopie confocale et les outils du génie génétique. Ces derniers sont par exemple applicables à l'étude des gènes impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm **(Donlan, 2002).**

1.2. Définition et caractéristiques :

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, fixée à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésives et protectrice qu'ils secrètent **(Figure 3) (Costerton,1999).**

La structure et l'architecture d'un biofilm est très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales **(Roux & Ghigo, 2006)** et peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (**Gilmore, 2008).** Le mode de vie du biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries de ce dernier peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques **(Costerton, 1999; Espinasse, 2010).**

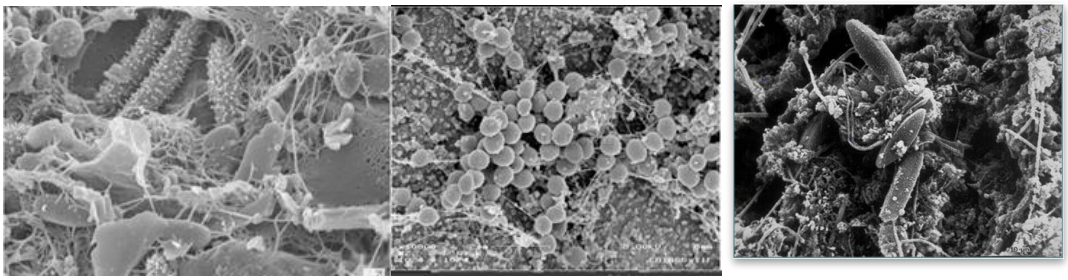


Figure 04 : Différents aspects de biofilms bactériens **(Donlan, 2002).**

2. Les mécanismes de fonction de biofilm :

Les microorganismes semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, comme : l'indisponibilité en oxygène ou en nutriment **(Branger, 2007).** On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms **(Figure 04).**

2.1. Conditionnement de la surface :

La première étape est la formation du film primaire ou « film conditionnant » et transport des microorganismes à proximité de la surface. Ce film constitue une base sur lequel le biofilm pousse, par ce qu'il augmente la capacité des microorganismes à se fixer à une surface (**Branger, 2007 ; Garrett et *al*., 2008 ; Percival et *al*., 2011).**

Le film conditionnant est composé de plusieurs substances (protéines, glucides et minéraux) issus du milieu environnant. Ce film va modifier les propriétés physico-chimiques de surface ainsi qu'inhiber ou au contraire stimuler l'adhésion microbienne **(Branger, 2007 ; Garrett et *al*., 2008 ; Percival et *al*., 2011).** Après le conditionnement très rapide de la surface, l'étape suivante correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface. Ce transport est effectué grâce à des propriétés dynamiques du milieu ainsi qu'aux propriétés physicochimiques de la surface du support. Différents appendices bactériens tel que les flagelles et les cils sont également nécessaires **(Rodney et *al*., 2002 ; Agnès et *al*., 2006 ; Branger, 2007 ; Percival et *al*., 2011).**

2.2. Phase d'adhésion :

Zobell (1943) a montré que l'adhésion est composée de deux étapes alternatives: l'adhésion réversible fait intervenir un processus physicochimique et constitue une étape non spécifique, et l'adhésion irréversible fait intervenir un phénomène biologique, qui est considéré comme une étape spécifique.

2.2.1. L'adhésion réversible :

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide **(Hoibey, 2011).** La fraction des cellules atteignant la surface s'adsorbe de manière réversible et interagit avec le film conditionnant **(Garrett et *al*., 2008).**

Elles s'y attachent par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques et s'adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire **(Beloin, 2008).**

2.2.2. L'adhésion irréversible :

Durant cette phase d'adhésion correspond à une fixation spécifique des micro-organismes sur un support. Cette adhésion stable est rendue possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules **(Branger, 2007 ; Beloin, 2008 ; Hoibey, 2011).**

Un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées et deviennent irréversiblement adsorbées. Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion devient plus solide et elles se différencient, en modifiant leur schéma d'expression génique de manière à favoriser leur survie **(Garrett et *al*., 2008 ; Philips et *al*., 2011).**

2.3. L'agrégation des micro-colonies :

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des polymères extracellulaires (EPS). Elles s'agrègent entre elles et forment des micro- colonies, qui sont protégées par la matrice EPS **(Jacobsen, 2008).**

2.4. La maturation du biofilm :

Lorsque l'attachement des bactéries à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et

l'environnement liquide. Ceci mène à la formation des micro-colonies qui s'élargissent à partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies commencent à sécréter une matrice extracellulaires environnante **(Philips et *al*., 2011 ; Tremblay et *al*., 2014).** Ces substances jouent un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, physiques, chimiques ou cellulaires ainsi que dans l'ancrage des cellules à la surface.

La croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel **(Costerton,1995).** Pendant cette étape on peut considérer que le biofilm est en équilibre dynamique entre l'accroissement de l'épaisseur par multiplication des bactéries déjà fixées et par l'agrégation des bactéries encore libres dans le milieu aqueux suite à l'arrachement des bactéries dû aux mouvements des fluides environnants **(Branger, 2007).**

2.5. Le détachement des bactéries :

Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant et retournent à l'état planctonique. Ce phénomène complexe de dispersion représente l'étape ultime de formation des biofilms et il est induit par des événements extérieurs tels que les perturbations mécaniques et l'appauvrissement en nutriment **(Tremblay et *al*., 2014).**

Les bactéries peuvent se détacher du biofilm aussi de façon passive par érosion **(**détachement continu de cellules individuelles ou de petits agrégats**).**, abrasion **(**la collision de particules**)** et desquamation **(**détachement massif et rapide de quantités importantes de bactéries**).**

Les agrégats érodés ou délabrés du biofilm sont susceptibles de conserver certaines caractéristiques du biofilm, telles que les propriétés de résistance aux antimicrobiens **(Donlan, 2002).**

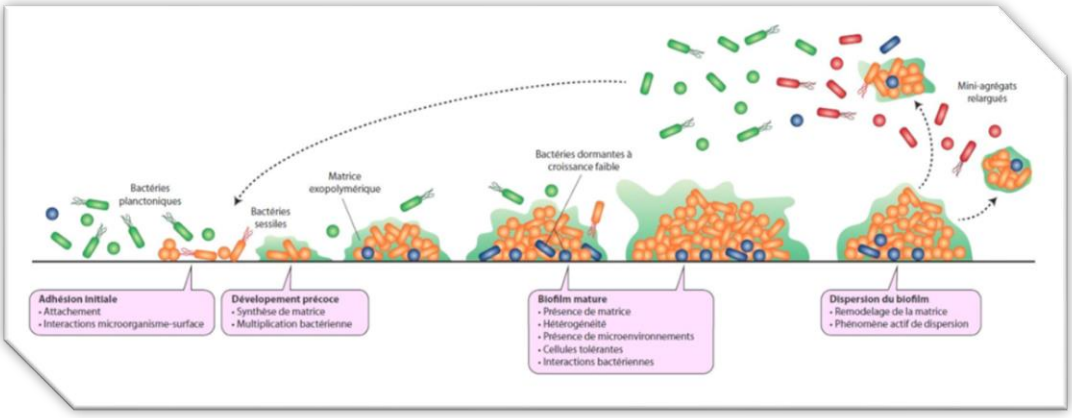


Figure 04 : étapes de formation de biofilm

3. La formation de biofilm chez les entérobactéries:

Plusieurs espèces des entérobactéries possèdent la capacité de former des biofilms **(Harkins et al. 2015).**Toutefois, la grande diversité génétique au sein d'une mème espèce fait en sorte que les gènes et les protéines utilisées lors de la formation de biofilm peuvent varier d'une souche a l'autre **(Giaouris, Heir et al. 2015).** Le biofilm formé par *Escherichia coli* est notamment implique dans les infections sur sonde urinaires ou sur matériel ostéo-articulaire. De nombreux facteurs de virulence sont connus pour avoir un rôle dans la formation de ces biofilm par *Escherichia coli* **(Auger 2012).** *Enterobacter cloacae* est l'un des agents pathogènes entériques nosocomiaux importants qui causent des infections liées au biofilm telles que les infections des voies urinaires.

3.1. *Klebsiella pneumoniae* :

K. pneumoniae peut former un biofilm et s'accumule aux cellules intégrées dans la matrice autogénérée de la substance polymère extracellulaire. Les substances polymères extracellulaires sont des structures complexes contenant des polysaccharides, des protéines et de l'ADN. La plupart des biofilms cliniquement apparents de *K. pneumoniae* se forment sur le cathéter et la surface interne des dispositifs medicaux. Le biofilm de *K. pneumoniae* peut entraîner une colonisation des voies respiratoires, gastro-intestinales et urinaires, ainsi que le développement d'infections invasives. Le développement du biofilm de *K. pneumoniae* à la surface des objets durs passe par l'adhésion de cellules, la formation de petites colonies, la maturation et la propagation en tant que cellules finalement libres **(Wang et al., 2020).**

3.2.*Klebsiella oxytoca* :

La capacité de *Klebsiella oxytoca* à former des biofilms est un puissant outil de survie qui peut perturber ou maintenir la santé de nombreux écosystèmes.

Selon les études antérieures, les *Klebsiella* produisent des biofilms via plusieurs types d'adhésifs retrouvés à la fois chez *Klebsiella pneumoniae* et *K. oxytoca*, comme la capsule, les fimbriae type 1 et de type 3 (encodées par les gènes *mrk*A et *mrk*D qui représentent les principales sous-unités de rattachement) **(Ghasemian et *al*., 2019).**

De nombreux autres facteurs de virulence décrits chez les *Klebsiella* sont connus pour être impliqués à dans la formation de biofilms. Parmi ces facteurs : la présence des polysaccharides capsulaires, l'intervention du système Quorum Sensing à travers une synthèse d'autoinducteurs (AL-2) ainsi que l'antigène PGA (Poly-β-1,6-Nacétylglucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm **(Goller, 2009).**

3.3. *Escherichia coli* :

E.coli est un agent pathogène capable d'infecter la glande mammaire en pénétrant dans la mamelle par le canal du trayon **(Lipman et *al*,.1995).** La mammite clinique à *E. coli* peut evoluer vers maladie grave avec des signes cliniques systématiques provoquant des lésions tissulaires aigues et une perte complète de la production de lait et méme la morte de l'animal infecté.Cette gravité de mammite causée par cette bactérie est liée a la présence des divers facteurs de virulence **(Bradley & green 2001; Burvenich et *al*,. 2003).**

La persistante de *E.coli* dans les glandes mammaires est liée à la capacité de formation de biofilm **(Fernande et *al*,. 2011)**. Parmi les nombreux facteurs de virulence décrits chez *E.coli* , un certain nombre sont connus pour etre impliqués dans la formation du biofilm. On peut citer les flagelles et les fimbriae (ou pili), plutôt impliqués dans les étapes d'adhérance aux surfaces et de développemnt précoce du biofilm **(Dogan et *al*,. 2012).**

Les voies de régulation sont complexes rendant difficilté de compréhension des conditions de formation des biofilms qui sont très dépendantes des conditions environnementales, des Curlis ont été découverts pour la première fois à la fin des années 1980 sur des souches d'*Escherichia coli* isolés de mammite bovine, et elles sont principalement impliquées dans l'adhésion aux surfaces, l'agrégation cellulaire et la formation de biofilm. Les Curlis sont également responsbales de l'adhésion et l'invasion des cellules hotes, et des puissants inducteurs de la réponse inflammatoire de l'hote **(Barnhart et *al*., 2006) (Figure 5).**

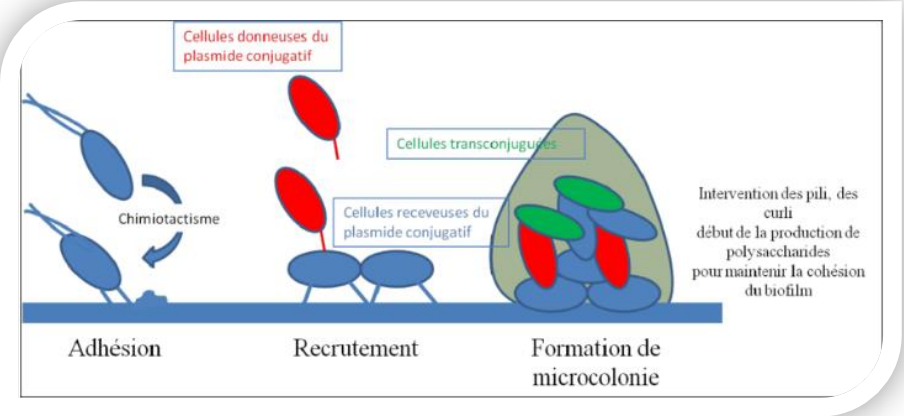


Figure 05 : étapes de formation du biofilm par *E. coli.*

4. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

Le développement d'un biofilm est un processus séquentiel complexe qui fait intervenir de nombreux mécanismes physico-chimiques et biologiques. Ce développement est influencé par trois composants essentiels : la surface, le milieu, et les microorganismes ; ainsi que les interactions existantes entre ces composants **(Branger, 2007).**

4.1. Caractéristiques de la surface :

Le contacte d'un matériau avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm :

4.1.1. Rugosité de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités. Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses **(Donlan, 2002).**

4.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que

sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux **(Donlan, 2002 ; Bendinger, 2003).**

4.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface et influe directement sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires, influence l'attachement de bactéries à une surface, et favorise la formation de biofilms **(Nobbs,.2009).**

4.2. Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessite des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs **(Donlan, 2002).**

4.2.1. Température :

Elle est importante car elle peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion **(Dumas, 2007).**

4.2.2. Le pH :

Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation /déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur PKA (**Hamadi, 2004).**

4.2.3. Sources de carbone et concentrations en nutriments :

Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique **(Martinez, 2007 ; Spormann, 2008).**

4.2.4. Concentrations en certains cations :

L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na+, Calcium Ca2+, ion ferrique Fe3+) influence l'attachement des bactéries sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre **(Fletcher, 1988).**

4.2.5. Hydrodynamique du fluide :

Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de **se** fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide **(Donlan, 2002).**

4.3. Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles et la production d'exo-polysaccharides (EPS), influencent sur la fixation des cellules microbiennes. L'hydrophobicité de la surface cellulaire est importante dans l'adhésion car les interactions hydrophobes ont tendance à augmenter avec une nature non polaire croissante des surfaces impliquées (c'est-à-dire la surface des cellules microbiennes et la surface du substrat). Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques, semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les EPS et les lipo-polysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles **(Donlan,.2002).**

5. Support génétique de la formation de biofilm :

Le biofilm est constitué de 90% de matrice extracellulaire d'exo-polymères et de 5% de microorganismes **(Bellifa, 2014).** La matrice extracellulaire d'exo-polymères incluse également des polymères d'EPS, d'ADN extracellulaire, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice a un rôle structurel et protecteur pour les cellules **(Beloin, 2008).** D'un point de vue structural, les biofilms se forment sur des supports variés. Ils ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de microorganismes **(Costerton, 1995).**

Compte tenu de l'hétérogénéité structurale et microbiologique au sein d'un biofilm, l'expression des gènes peut être très variable. Elle résulte de nombreux facteurs parmi lesquels la limitation de diffusion dans le biofilm des nutriments et de l'oxygène, les variations de pH et la concentration en métabolites bactériens **(Jefferson, 2004).**

6. Transfert d'information génétique au sein du biofilm :

Les transferts horizontaux d'information génétique jouent un rôle important dans l'évolution et la diversité génétique des communautés microbiennes. L'un des principaux mécanismes de transfert génétique est celui de la conjugaison qui permet l'échange direct d'ADN par contact physique entre deux cellules via un pili de conjugaison. Les biofilms, en favorisant le contact des bactéries entre elles, offrent un environnement idéal pour le transfert de gènes par le mécanisme de conjugaison, et de nombreuses études ont montré que la fréquence de transferts génétiques par conjugaison augmentait lorsque les bactéries se développaient sous forme de biofilm **(Roberts et *al*., 1999; Bjorklof et *al*., 2000; Ghigo, 2001).** La relation entre conjugaison et capacité à former un biofilm a de profondes conséquences écologiques en particulier pour les plasmides conjugatifs exprimant des fonctions d'adhésion, favorisent l'accès des bactéries hôtes aux biofilms **(Ghigo, 2001).** Ainsi, l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine ou vétérinaire, en favorisant la sélection de souches porteuses de plasmides vecteurs de résistance aux antibiotiques, pourrait également favoriser la formation de biofilms dont l'élimination pose un grave problème de santé publique **(Hall-Stoodley et *al*., 2004).**

7. Mécanismes régulateurs de la formation de biofilms :

7.1. Quorum Sensing :

Un mode de régulation remarquable a été mis en évidence chez les microorganismes dit quorum sensing (QS). Le QS est un mécanisme de communication inter-microbienne, contrôlant l'expression de gène particulier au sien d'une population microbienne, en fonction de la densité cellulaire. Quand le signal attient une certaine concentration critique, il active un régulateur transcriptionnel qui induit des gènes cibles spécifiques (comme la production d'EPS) (**Jayaraman & Wood, 2008).**

Le quorum sensing a été identifié chez de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif comme un mode de communication et de perception fondé sur la production de petites molécules, qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule **(Mion, 2019).** Le QS est donc un mécanisme de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception de densité cellulaire **(Costerton, 1999).**

Le QS aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm. Il implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signal appelées auto-inducteurs (AI). Chez les bactéries à Gram négatifs, l'auto-inducteur est une homosérine lactone, alors que chezles bactéries à Gram positif, c'est un oligopeptide appelé phéromone (**Figure 06) (Roux et *al*., 2006 ; Tremblay et *al*., 2014).**

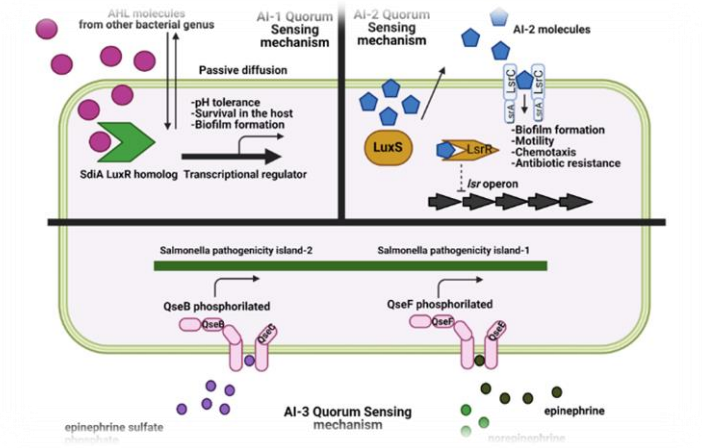


Figure 06 : Mécanismes de détection du quorum sensing de *Salmonella* et des principales voies bactériennes régulées par chacun de ces mécanismes

7.2. Quorum quenching :

L'altération des mécanismes du QS peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou encore des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion **(Irie, 2008).** Différentes stratégies ont été développées pour inhiber ces comportements régulés par le QS en bloquant la communication entre les bactéries. Cette méthode d'inhibition du QS est appelée « quorum quenching » (QQ). La composante principale du QS étant la production et la détection de molécules signal, le QQ peut interférer de différentes manières avec ce système, soit au niveau intracellulaire, soit au niveau extracellulaire. L'utilisation de molécules inhibitrices, nommées inhibiteurs du QS (IQS), permet ainsi d'intervenir au niveau des cellules bactériennes pour inhiber la production ou la perception des AI. D'autres stratégies ciblent directement les molécules de communication sécrétées dans l'environnement avant qu'elles n'atteignent leur cible. Le QQ présente l'avantage de ne pas affecter la croissance des bactéries, contrairement aux antibiotiques, ce qui minimise nettement la pression de sélection et devrait limiter l'apparition de résistance (**Figure 07) (Mion, 2019).** Les molécules IQSs peuvent être soit naturelles, sécrétées par des organismes vivants tels que les bactéries, les

champignons, les algues, les éponges ainsi que les plantes et les animaux, soit chimiquement synthétisées **(Aye, 2015).** Le QQ représente donc une approche idéale pour la prévention et le traitement des infections bactériennes et pourrait constituer une alternative aux antibiotiques **(Mion, 2019).**

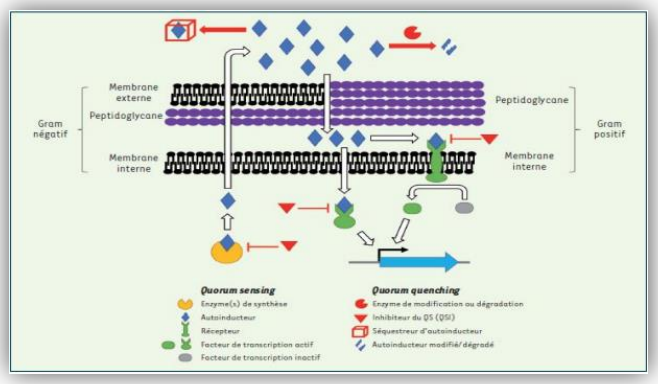


Figure 07 : Schéma récapitulatif des mécanismes du QS bactérien et des différentes stratégies du QQ **(Mion,2019).**

8. Importance de biofilm dans le secteur laitier :

8.1. Dans l'industrie agro-alimentaire :

Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires. Ils sont présents dans tous les secteurs laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. **(Jeyasekeran, 2011).** Des biofilms peuvent aussi se développer dans les réseaux d'alimentation en eau potable et dans les systèmes de climatisation. La présence de biofilms dans les canalisations peut être à l'origine de la détérioration de la qualité organoleptique et microbiologique de l'eau **(Paquin et *al.*, 1992).** De plus, le contact des communautés microbiennes avec la surface des produits alimentaires augmente la probabilité que les cellules adhérant de manière irréversible et restent même dans les surfaces après l'assainissement. C'est l'une des principales raisons de la formation de biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments. Par exemple en industrie laitière, les biofilms microbiens sont la principale source de contamination du lait et des produits laitiers. L'un des groupes les plus communs d'organismes formant des biofilms sur les équipements laitiers est la flore bactérienne aérobie sporulée thermophiles. La persistance de ce groupe de contaminants bactériens dans l'environnement laitier, est attribuée à la résistance de leurs biofilms aux

agents chimiques du nettoyage / désinfection **(Benkhaldi, 2017).** Les biofilms peuvent aussi se révéler très utiles dans le domaine agroalimentaire comme dans la production d'éthanol dans des réacteurs disposés verticalement et dans lesquels des levures de *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm **(Todd & Gerald, 2001**), et également dans la production du vinaigre (acide acétique). De plus l'utilisation de certains microorganismes en forme de biofilm dans les réacteurs à lit fixe a été proposée pour la dégradation des mycotoxines par voie biologique **(Alnnasouri, 2007).**

8.2. Biofilm et mammites bovines :

En médecine vétérinaire, les biofilms semblent être liés à plusieurs maladies, dont la mammite, et cela est soutenu par le changement de la sensibilité aux antimicrobiens **(Fernandes et *al*., 2011 ; Atulya et al., 2014).** La présence de biofilms dans les glandes mammaires entraîne une diminution de l'efficacité de l'antibiothérapie et rend les infections persistantes difficiles à traiter, entraînant un grand préjudice à l'industrie laitière. De plus, la formation de biofilm peut être induite par des concentrations sous-inhibitrices de plusieurs agents antimicrobiens **(Melchior et al., 2006b)**. Comme exemple, **Costa et al. (2012)** ont montré que des concentrations sous-inhibitrices d'enrofloxacine, habituellement utilisée pour traiter une mammite clinique, a favorisé la formation de biofilm d'isolats d'*E.coli* responsable de mammite. Par conséquent, la formation de biofilm a été influencée par la composition du lait, comme l'ont montré **Atulya et al. (2014)** qui ont testé six principaux composants du lait : la concentration du dipotassium hydrogène phosphate et le pH a affecté négativement la formation de biofilm. La diminution du pH favorise la formation de biofilm et cela pose un sérieux problème puisque le traitement actuel de la mammite est basé sur l'administration d'antibiotiques acides. Les auteurs ont suggéré l'utilisation d'agents améliorant le pH en combinaison avec une antibiothérapie afin d'éviter une infections durables **(Atulya et al. 2014).**

Baselga et *al*. (1993) ont prouvé que les isolats de mammite de ruminants étaient capables de produire du mucus (slime) *in vivo* lorsqu'un l'infection expérimentale de la glande mammaire a été induite chez le mouton **(Vasudevan et al. 2003).** Les études *in vivo* de la formation de biofilms par les agents pathogènes de la mammite bovine sont un défi et bien qu'étayée par des études *in vitro*, aucune étude in vivo ne peut directement étayer l'hypothèse selon laquelle la formation de biofilm est responsable de la moindre efficacité de l'antibiothérapie et de la persistance de infections intra-mammaires **(Melchior et *al*., 2006b ; Veh et *al*., 2015).**

De plus, des tests de sensibilité aux antimicrobiens standardisés sont généralement effectués avec des cellules planctoniques sans tenir compte de l'opinion générale selon laquelle les biofilms sont plus tolérants aux agents antimicrobiens **(Nadell et al., 2009).** Parfois, la méthode de détection de la mammite basée sur le nombre de cellules somatiques peut également représentent un risque potentiel de dissémination de la maladie puisque les vaches avec un faible concentrations en cellules somatiques dans le lait peuvent être un potentiel réservoir de bactéries capables de former des biofilms permettant la persistance des pathogènes dans l'élevage **(Cucarella et *al.* ? 2004).** Les biofilms représentent donc un mécanisme de survie des micro-organismes dans la glande mammaire et contribuent à la persistance des agents pathogènes dans l'élevage. Ainsi, il est crucial de comprendre le rôle des biofilms et autres facteurs de virulence impliqués dans la capacité de la majorité des agents pathogènes de la mammite pour coloniser et entretenir les infections.

Les enzymes impliquées dans la production de biofilm et les composants de biofilm tel que la substance polymère extracellulaire (EPS) et d'autres constituants de la matrice pourraient être potentiels de nouvelles cibles pour de nouveaux médicaments anti-mammite utilisés comme stratégies prophylactiques et thérapeutiques dans le traitement de cette maladie **(Gomes et *al.*, 2016).**

8.3. Impact des biofilms microbiens sur la qualité du lait :

La qualité microbiologique du lait est essentielle pour le secteur laitier. La contamination peut survenir durant la production, la récolte, l'entreposage et la transformation du lait. De plus, les caractéristiques des populations microbiennes dans le lait cru au moment de la transformation ont un impact sur les propriétés de transformation du lait, ainsi que sur les qualités organoleptiques et la durée de conservation des produits laitiers. Les bactéries et les biofilms font partie des risques qui sont gérés dans une ferme laitière. Les biofilms, qui sont des couches protectrices qui se forment sur les cellules, peuvent être soit bénéfiques ou nuisibles et peuvent contenir des bactéries infectieuses. Par conséquent, l'identification et le contrôle de la formation de biofilms sont importants pour assurer le maintien de la qualité du lait (**Denis Roy, 2020).**

CHAPITRE 3

Impacts/ Réponses entre Désinfectants et Biofilms

1. Définition :

Les désinfectants sont des agents chimiques 'biocides' utilisés pour inactiver des micro-organismes reconnus comme pathogènes et/ou susceptibles d'être pathogènes (CDC, USA) (**Lecomte, 2020).** Alors que les antibiotiques, sont des molécules à caractère thérapeutique et qui interagissent avec des processus structuraux et métaboliques spécifiques dans la cellule bactérienne ; les désinfectants agissent d'une manière non spécifique **(Bridier et *al.*, 2011).**

Il existe deux grandes familles de désinfectants : 1). Les antiseptiques, qui sont destinés à désinfecter les tissus vivants (épidermes, plaies), et 2). Les désinfectants, qu'on utilise pour les surfaces inanimées (sols, lit, bureau, table d'opération, etc.) **(CCLIN, 2000).**

Parmi les produits les plus couramment utilisés, nous pouvons citer :

- **L'eau de javel** et les autres produits chlorés, qui sont les produits les plus utilisés dans les hôpitaux [Famille des Halogènes].
- **Le glutaraldéhyde,** très utilisé dans la désinfection des appareils d'endoscopie [Famille des aldéhydes].
- **L'acide péracétique**, produit utilisé dans les industries agroalimentaires et de plus en plus utilisé dans les hôpitaux et qui tend à remplacer le glutaraldéhyde [Famille des péroxydes organiques].
- Le **DIDAC** (Chlorure de didecylméthylammonium) et l'**ABDAC** (Chlorure de Benzalkonium), dont les consommations totales en France sont estimées respectivement à 1000 tonnes par an et 700 tonnes/an [Famille des ammoniums quaternaires] **(CCLIN, 2000).**

2. Le mécanisme d'action des désinfectants :

Les antiseptiques et désinfectants sont capables d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostase, fongistase, virustase), ou d'avoir une action létale (bactéricidie, fongicidie, virucidie, sporicidie). Certains antiseptiques et désinfectants présentent ces deux modes d'action en fonction des doses appliquées. D'autres ont toujours une action létale ou toujours une action bactériostatique ou fongistatique quelle que soit la concentration utilisée.

La rémanence désigne l'effet anti-microbien de l'antiseptique persistant sur la peau ou du désinfectant persistant sur une surface. Le mécanisme d'action des produits varie d'une famille d'antiseptiques à l'autre : coagulation des organites intracellulaires, altération de la membrane,…

Selon leur nature et leur concentration, les antiseptiques et désinfectants ont une ou plusieurs cibles à l'intérieur de la cellule. Ils doivent donc traverser la paroi cellulaire pour exercer leur action **(CCLIN, 2000).**

Différents facteurs peuvent influencer l'activité des produits **(Russel et *al.*, 2004)** :

• Temps de contact (activité s'améliore avec augmentation du temps de contact).

• Température (activité se modifié avec augmentation de la température), pH (baisse ou augmentation d'activité selon les familles).

• Liposolubilité (pénétration de la couche cornée des micro-organismes).

• Présence de fluides ou autres matières biologiques (sang, pus) (inclut sur l'activité de toutes les familles à l'exception des phénols)

• Présence de savon (inclut sur l'activité des ammoniums quaternaires, de la chlorhexidine et des produits chlorés).

La plupart des produits ont une activité satisfaisante sur les bactéries et les virus enveloppés (ex. HIV, hépatites B et C, herpes, grippe). Par contre, l'activité sur les virus nus (ex. poliovirus, hépatite A et E, papillomavirus), les mycobactéries (tuberculose), les moisissures ou les spores varie d'un produit à l'autre. Le choix du produit dépendra du type de désinfection envisagée, types de microorganismes **(Tableau 3),** et de l'objectif à atteindre (HLD, MLD, LLD: niveau de désinfection élevé respectivement moyen et bas) **(Tableau 4) (CAPP-INFO, 2007).**

Tableau 03 : Spectre d'activité des antiseptiques et désinfectants **(CCLIN, 2000).**

Familles	Spectre d'activité							
	Gram+	Gram -	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus envelop-pés	Spores
ALCOOLS	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
ALDEHYDES	+	+	+	+	+	+	+	+
AMMONIUMS QUATERNAIRES	+	+/-	-	+	+	+/-	+	-
BIGUANIDES	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-
HALOGENES CHLORES ET IODES	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDANTS : DESINFECTION	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDANTS : ANTISEPSIE	+	+	-	+	+	+/-	+	-

+ produits actifs **+/-** produits inconstamment actifs **-** produits inactifs

Tableau 4: mécanismes d'action des antiseptiques et désinfectants **(CAPP, 2007).**

Familles	Exemples	Cible et mode d'action
ALCOOLS	Ethanol, Isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmatiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
ALDEHYDES	Formaldehyde	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
AMMONIUMS QUATERNAIRES	Benzalkonium	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire → fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule
BIGUANIDES	Chlorhexidine	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire → fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol
HALOGENES CHLORES ET IODES	Hypochlorite de sodium (Javel, Dakin) PVP-iodé	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénation)
OXYDANTS	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN

3. La tolérance aux désinfectants: mécanisme et stratégie de résolution :

La définition de «tolérance» doit être clarifiée car elle change selon que l'on considère les cellules planctoniques ou adhérées en biofilms. Dans le premier cas, une souche bactérienne est définie comme étant tolérante à un biocide si elle n'est pas inactivée par une concentration ou une période d'exposition spécifique qui inactive habituellement la majorité des autres souches **(Langsrud et *al.*, 2003).**

Cette tolérance peut être acquise par plusieurs mécanismes. En interaction avec le désinfectant, la cellule bactérienne réagit cette invasion par la formation de biofilm ; abaisser la perméabilité membranaire ; stress oxydatif ; activation de gène de pompe efflux et changement des récepteurs **(Figure 08) (Tang et *al.*, 2021).**

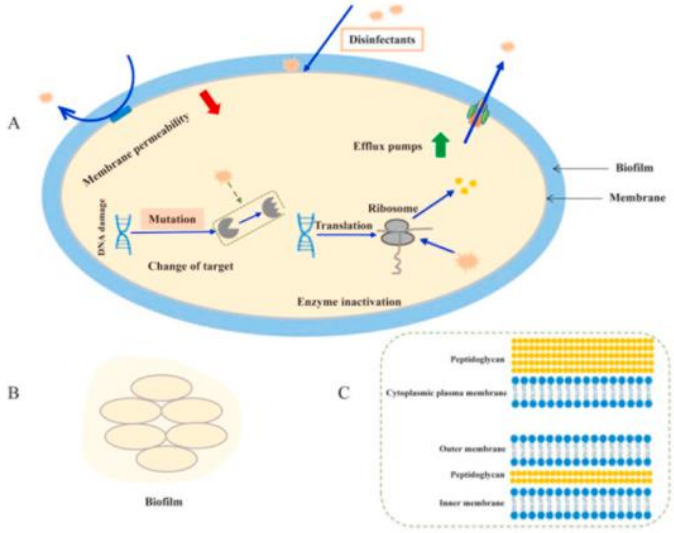


Figure 08 : Diagramme d'illustration des différents mécanismes de tolérance aux désinfectants **(Tong et *al.*, 2021)**

3.1. Limitation de la diffusion par formation de biofilms :

Les biofilms bactériens sont beaucoup plus résistants à la désinfection que les bactéries libres. Le mécanisme de résistance du biofilm est attribué à La matrice extracellulaire constitue une structure complexe et compacte au sein de laquelle les biocides ont du mal à pénétrer des agents antibactériens ; ainsi à la production du glycocalyx, qui est une substance collante sécrétée par les bactéries qui recouvre la surface bactérienne pour fournir un effet tampon **(Tong et *al.*, 2021).** Dans le cas des bactéries *S. epidermidis* et *S. capitis*, la concentration minimale de chlorhexidine nécessaire pour inactiver les bactéries agglutinées en biofilms était au moins 64 fois supérieure à la concentration nécessaire pour inactiver les bactéries libres. Des différences dans la réaction des bactéries aux désinfectants ont été notées. Par exemple, *S. epidermidis* était plus sensible à l'alcool isopropylique que S. capitis **(Taha et *al.*, 2014).**

3.2. Effet de blocage de la membrane :

Une diminution de la perméabilité de la membrane bactérienne réduira ou empêchera le désinfectant de pénétrer dans les bactéries **(Carlie et *al.*, 2019).** Dans l'étude de la membrane externe des bactéries résistantes aux désinfectants, il a été constaté que certaines porines manquaient ou diminuaient d'expression. Par exemple, la résistance adaptative de *Pseudomonas aeruginosa* au BAC se produit principalement au niveau de la membrane

externe bactérienne, attribuant à la diminution de l'expression des porines de *P. aeruginosa* **(Machado et *al.*, 2013).**

3.3. Système de pompes efflux :

Les pompes à efflux sont des éléments de la physiologie bactérienne, et leur expression médie la multirésistance bactérienne fonction pourrait dépasser la réponse aux effets pharmacologiques **(Du et *al.*, 2018).** Les pompes à efflux peuvent être divisées en cinq familles de protéines membranaires, telles que la superfamille résistance-nodulation-division (RND) utilisant la force motrice du proton comme substrat de transport, la superfamille des promoteurs principaux (MFS), la famille des extrusions de composés multidrogues et toxiques (MATE) , la famille des petites résistances multidrogues (SMR) et la super famille des cassettes de liaison à l'ATP (ABC) utilisant l'énergie de liaison à l'ATP et l'hydrolyse pour le transport des substances. **Le tableau 05** présentes les différentes pompes relatives à la résistance des différents désinfectants.

A titre d'exemple, Les pompes d'efflux de la famille MFS favorisant l'efflux désinfectant des substrats courants de tétraphénylphosphonium et de bromure d'éthidium. La pompe MdrL peut activement excréter des antibiotiques et des métaux lourds et aider à s'adapter au BAC chez *L. monocytogenes.* Les principaux systèmes d'efflux RND liés aux désinfectants contribuent à la résistance intrinsèque, des substrats comprennent le Triclosan (TCS) et le dodécylsulfate de sodium (SDS) **(Tong et *al.*, 2021).**

NorB confère une résistance à certains substrats NorA, tels que le cétrimide et le colorant EB, et offre également une résistance aux fluoroquinolones hydrophobes, à la moxifloxacine et à la tétracycline

Tableau 05 : les pompes efflux pour les désinfectants et agents antimicrobiens **(Tong et *al.*, 2021).**

Family	Efflux Pump	Gene location	Substrate
MFS	LmrS	Chromosome	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, tetraphenylphosphonium, dequalinium, chlorhexidine, pentamidine, rhodamine and acriflavine
	MdeA	Chromosome	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, tetraphenylphosphonium and dequalinium
	MdrL	Chromosome	Benzalkonium chloride and ethidium bromide
	NorA	Chromosome	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, tetraphenylphosphonium and rhodamine
	NorB	Chromosome	Ethidium bromide, tetraphenylphosphonium and cetrimide
	QacA	Plasmid	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, tetraphenylphosphonium, dequalinium, biguanidines, chlorhexidine, pentamidine, rhodamine and acriflavine
	QacB	Plasmid	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, tetraphenylphosphonium, dequalinium and acriflavine
RND	AcrAB-TolC	Chromosome	Triclosan, sodium dodecyl sulfate and triton X-100
	MexAB-OprM	Chromosome	Triclosan and sodium dodecyl sulfate
	TriABC-OpmH	Chromosome	Triclosan and sodium dodecyl sulfate
	TtgABC	Chromosome	Nalidixic acid, flavonoids, trichlorobenzene, toluene, isopropylbenzene and p-Xylene
	RaeE-RaeF-RopN	Chromosome	Sodium dodecyl sulfate
SMR	Smr	Plasmid	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, cetrimide, chlorhexidine and diacetate
	QacG	Plasmid	Benzalkonium chloride, ethidium bromide and cetyltrymethylammonium
	QacH	Plasmid	Benzalkonium chloride, ethidium bromide, cetyltrymethylammonium and proflavine
	QacJ	Plasmid	Benzalkonium chloride, ethidium bromide and cetyltrymethylammonium
MATE	MepA	Chromosome	Benzalkonium chloride, cetimidide, ethidium bromide, tetraphenylphosphonium, cetrimide, chlorhexidine, acriflavine, crystal violet, hoechst 33342, 4-6-diamidino-2-phenylindole, dequalinium and pentamidine
ABC	PatA	Chromosome	Cetrimide
	PatB	Chromosome	Cetrimide
	AbcA	Chromosome	Ethidium bromide, tetraphenylphosphonium and rhodamine

3.4. Inactivation des enzymes :

La résistance bactérienne aux désinfectants et aux antibiotiques réside dans les différentes enzymes produites face aux différents agents antibactériens. Des études ont montré que les bactéries pouvaient désactiver les désinfectants, tels que l'acide hypochloreux (HOCl), H2O2, les CAQ et le formaldéhyde par catalyse enzymatique **(Tong et *al.*, 2021).**

Par exemple, *P. aeruginosa* a développé un mécanisme adaptatif en réponse à HOCl. On peut en conclure que dans des conditions de stress HOCl, rcsA codant pour une protéine de type alkyl hydroperoxydase D est fortement exprimée **(Nontaleerak et *al.*, 2020).** Cependant, les résidus d'acides aminés centraux distingués Cys60, Cys63 et His67 de RcsA pourraient être nécessaires pour la dégradation du NaOCl **(Clarke et *al.*, 2011).**

Un autre exemple typique est la haute tolérance de *Bacillus maltophilia* au peroxyde d'hydrogène, qui est liée à l'activité totale accrue de la catalase bactérienne. Cependant, chez *Bacillus maltophilus*, étaient devenues plus résistantes au H2O2 après l'inactivation du gène *ahpC* **(Charoenlap et *al.*, 2018).**

4. Support moléculaire et acquisition de la tolérance aux désinfectants :

L'aspect alarmant de l'émergence des tolérances aux désinfectants, ne pourrait pas être expliquée seulement par l'effet de formation de biofilm ou l'utilisation abusive des désinfectants qui engendre une pression sélective. Néanmoins, la transmissibilité d'éléments génétiques mobiles est un mécanisme d'acquisition ; qui confèrent des changements phénotypiques spécifiques sur capacités métaboliques, l'expression de la virulence et la résistance aux antimicrobiens **(Bridier et *al.*, 2011).**

Les mécanismes de ce transfert restent encore largement méconnus **(Samantha *et al* 2022).** La conjugaison de **plasmides** codant pour la résistance aux désinfectants est le model le plus étudié, surtout mené sur l'*Escherichia coli* et des espèces de staphylocoques **(Wassenaar et *al.*, 2015)**. Par exemple, malgré que les gènes *qac* (codent pour les pompes à efflux) sont les plus étudiés chez les staphylocoques ; on ne sait pas si leurs plasmides portants peuvent être transférés par transduction par des bactériophages ou plus simplement par transformation. Encore, on sait peu de choses sur le rôle des autres éléments qui font partie des transposons, des séquences d'insertion (IS) ou des éléments d'intégration et de conjugaison (ICEs) **(Hamidian & Hall, 2018).**

L'acquisition de gènes par transfert horizontal est le mécanisme principal de résistance aux désinfectants **(Partridge et *al.*, 2018).** Certains éléments peuvent se déplacer à l'intérieur ou entre les molécules d'ADN ; notamment les transposons, les séquences d'insertion, les intégrons et les cassettes de gènes. Alors que d'autres, comme les ICEs et les plasmides, sont capables de se déplacer entre les bactéries. Ces éléments sont ensuite amplifiés en réponse à une pression sélective **(Partridge et *al.*, 2018). La figure 09** schématise ces processus.

4.1. Les transposons composites (Tn), séquences d'insertion (IS) et transposons unitaires :

Les **transposons** et les **séquences d'insertion** sont des morceaux d'ADN mobiles, souvent associés à des gènes de résistance « passagers », capables de se déplacer presque au hasard vers de nouvelles positions sur la même molécule d'ADN ou sur des molécules d'ADN différentes, transportant les gènes de résistance vers un nouvel emplacement. Les séquences d'insertion portent généralement un ou deux gènes de transposase (*tnp*) ; et forment un transposon composite, lorsque deux copies de la même séquence d'insertion ou de séquences d'insertion apparentées flanquent un ou plusieurs gènes **(Partridge et *al.*, 2018).**

Les séquences d'insertion influencent l'expression des « gènes passagers » en incluant un promoteur fort **en amont** de sa localisation ou une translocation **en amont** d'un gène chromosomique essentiel **(Vandecraen et *al.*, 2017)**. Ceci est observé chez les staphylocoques, ou la séquence d'insertion IS257 a été associée au gène de résistance *qac*C. **(Furi et *al.*, 2016).**

Les transposons unitaires sont généralement plus grands que IS, ils peuvent inclure à la fois des gènes passagers et transposases. Chez *Acinetobacter baumannii*, le transposon de type Tn2053 a conférée des îlots de résistance sous forme de gènes de résistance séparés transloqués sur le même squelette de transposon. Par conséquent, il en résulte une structure plus grande abritant plusieurs gènes de résistance **(Partridge et *al.*, 2018).**

4.2. Les intégrons et les cassettes de gènes :

Les **cassettes** de gènes sont de petits segments d'ADN, fréquemment insérés dans un intégron ou dans une structure circulaire libre **(Delihas, 2011).** Les cassettes de gènes sont généralement constituées d'un ou deux gènes, dépourvus régulièrement d'un site de recombinaison (*att*C) et d'un promoteur. Les **intégrons** (IN) peuvent être identifiés par quelques composants dont un gène *int*I, un promoteur (Pc) et un site de recombinaison *att*I.

Les IN permettent le mouvement des gènes de résistance entre des sites définis et subissent une recombinaison spécifique au site. Les cassettes-Puces sont formés lorsque plusieurs cassettes de gènes sont insérées dans le même intégron. Cette voie peut conférer une résistance aux antibiotiques et aux désinfectants ou une co-résistance aux désinfectants et aux antibiotiques **(Zhou et *al.*, 2017 ; Kim et *al.*, 2018).**

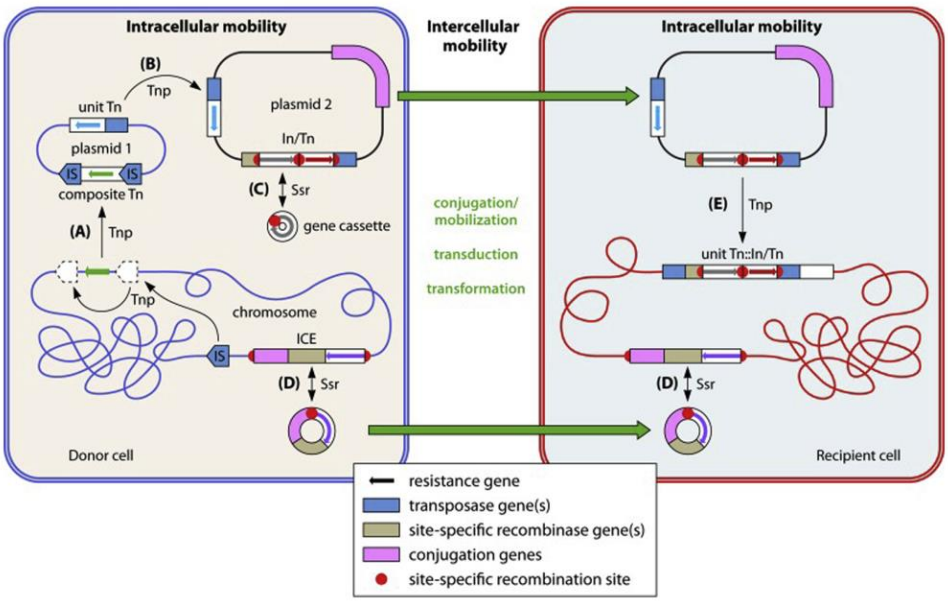


Figure 09 : éléments génétiques horizontaux mobilisés lors du transfert de gènes intracellulaires et intercellulaires entre cellule donneuses et receveuses **(Partridge et *al*., 2018).**

4.3. Les ilots génomique ICE (éléments conjugatifs) :

Un îlot génomique est une partie de chromosome bactérien qui n'est pas d'origine, il a été introduit par transfert horizontal de gène et intégré dans le chromosome hôte par conjugaison médiée par un phage **(Delavat et *al*., 2017).** Lors de l'induction de l'expression du gène ICE, ces éléments sont excisés du chromosome et sont capables de s'auto-transmettre par conjugaison **(Johnson & Grossman, 2015)**. Les ICE semblent également être importants pour la mobilisation des intégrons/transposons de classe 1 conférant une résistance aux désinfectants chez le Pseudomonas aeruginosa **(Martinez et *al*., 2012).**

4.4. Le rôle de la régulation des gènes dans la résistance aux désinfectants :

La résistance aux désinfectants pourrait être à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles exogènes, Mais, aussi par le processus d'adaptation génétique intrinsèque telles que l'expression différentielle des gènes (provoquées par le stress antimicrobien) ou par les mutations **(Kim et *al*., 2018).** Dans des conditions de stress, comme imposées par l'exposition aux désinfectants, de nombreux gènes bactériens voient leur expression modifiée. Cette modification, associée à de nombreuses mutations régulatrices, peut réduire la sensibilité aux agents antimicrobiens en activant des mécanismes de défense latents **(Palmer et *al*., 2018).** La résistance peut être obtenue par des mutations qui modifient l'expression de gènes de

résistance natifs ou transférés horizontalement **(Bragg et *al*., 2018).** Ces gènes comprennent ceux qui ont des fonctions liées à la résistance antimicrobienne telles que les enzymes dégradant les médicaments (β-lactamases), les pompes d'efflux de la membrane externe (*opr*R chez *Pseudomonas aeruginosa*), les gènes de résistance indirectement liés tels que les cibles médicamenteuses (*folA* chez Escherichia coli) ou les porines qui interviennent l'entrée d'agents antimicrobiens dans la cellule (*ompF*) **(Palmer et *al*., 2018).**

5. Les liaisons biofilm et tolérance aux désinfectants

L'insensibilité aux désinfectants dans le biofilm est parfois considérée comme une tolérance plutôt qu'une véritable "résistance" car elle est principalement induite par une adaptation physiologique au mode de vie du biofilm. Les mécanismes impliqués dans la résistance du biofilm aux désinfectants sont variés :

5.1. La limitation de la diffusion/réaction des désinfectants dans matrice de biofilm :

La matrice extracellulaire constitue une structure complexe et compacte au sein de laquelle les biocides ont du mal à pénétrer. Des études précédentes ont démontré que les niveaux de chlore mesurés dans des mélanges à l'aide d'une microélectrode n'ont atteint que 20 % dans les biofilms de *P. aeruginosa et K. pneumoniae* **(De Beer et *al.* 1994).** De même, la présence de matières organiques comme les protéines, les acides nucléiques ou les glucides peut altérer profondément leur efficacité (Lambert et Johnston 2001). Dans un biofilm mixte de *P. aeruginosa et K. pneumoniae*, le temps de pénétration est huit fois plus élevé pour l'hypochlorite alcalin (48 min) que pour le chlorosulfamate (6 min) ; malgré, alors que ce dernier a un poids moléculaire plus élevé **(Stewart et *al.* 2001)** ; la pénétration réduite du biocide alcalin était liée à sa plus grande capacité à réagir avec les constituants de la matrice et non à sa taille moléculaire. L'hydrophobicité de la paroi cellulaire bactérienne pourrait altérer la diffusion des nanoparticules dans un biofilm **(Habimana et *al.* 2011**), suggérant que les composants interfaciaux de la paroi cellulaire tels que le peptidoglycane, les fimbriae, les capsules pourraient également affecter la diffusion des composés dans le biofilm.

5.2. L'adaptation phénotypique :

La limitation de la pénétration des désinfectants dans un biofilm peut avoir de faibles niveaux dans les régions plus profondes du biofilm. Ainsi, les bactéries développent donc des réponses adaptatives aux concentrations sublétales. Une survie accrue après le même choc QAC a été rapportée chez des *Pseudomonas aeruginosa* adaptés aux doses subléthales,

parallèlement à des modifications concomitantes de la composition de la membrane **(Bribier *et al.*, 2011).** Une surexpression des protéines spécifiques impliquées dans le métabolisme énergétique, la biosynthèse des protéines, l'adaptation (CspA) et la détoxification **(Mangalappalli-Illathu & Korber 2006),** ainsi qu'un changement dans la composition en acides gras **(Mangalappalli-Illathu et *al.* 2008)** ont étés observé aux conditions d'adaptation spécifique au biofilm.

Les comparaisons des profils d'expression génique et les analyses protéomiques des états planctoniques et du biofilm chez différentes espèces appuient les résultats des adaptations phénotypiques. Les gènes codant pour les protéines flagellaires ont étés réprimés et d'autres gènes codant pour l'EPS et les protéines d'adhésine telles que curli sont sur-exprimés **(Bribier et *al.*, 2011).**

5.3. Le transfert et mutation de gènes de résistance à l'état de biofilm :

Les biofilms sont des environnements propices aux transferts horizontaux de gènes. Bien entendu, ces échanges sont plus diversifiés dans un biofilm multi-espèces que dans un biofilm mono-espèce. Les échanges de plasmides et l'acquisition d'ADN extracellulaire, présent dans la matrice des biofilms, entraînent une diversification des génomes au sein des biofilms et favorisent l'émergence de résistances **(Hall & Mah, 2017).**

La résistance des bactéries aux agents désinfectants se traduit généralement par des changements du génome, induits par une mutation spontanée sur l'un des chromosomes de la bactérie va conférer à cette bactérie une résistance à un antibiotique ou à un produit désinfectant précis. Différentes études suggérant que les biofilms peuvent constituer un environnement optimal pour l'échange de matériel génétique **(Ando et *al.* 2009 ; Nguyen et *al.*, 2010),** conduisant à la diffusion de cassettes de résistance aux biocides au sein de la population. En effet, une forte densité cellulaire, la présence d'une matrice, la libération de grandes quantités d'ADN ou des conditions nutritives au sein des biofilms peuvent favoriser les processus de conjugaison et de transformation. **Driffield et *al.* (2008)** ont montré que les cellules d'un biofilm de *P. aeruginosa* présentaient une mutabilité jusqu'à 105 fois supérieure à celle d'une culture planctonique.

CHAPITRE 4

Matériels & Méthodes

MATERIELS ET METHODES

1. Contexte et concept de l'étude :

Les mammites constituent la pathologie n°1 des élevages laitiers et touchent plus de 40 % des vaches en production. **(les mammites j'anticipe)**La mammite est une infection de la mamelle causée par des bactéries pénètrent par le sphincter du trayon, cette infection déclenche une réaction inflammatoire associée à un afflux de globules blancs (ou leucocytes) dans la mamelle, ce qui augmente le nombre de cellules somatiques dans le lait. Les trois principales bactéries incriminées dans cette infection sont *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli*. **(les mammites j'anticipe)** Ces bactéries sont dotées de différents facteurs de virulence (protéines, facteurs d'adhésion, toxines) justifiant leur pathogénie et leur rôle comme agents agresseurs du parenchyme mammaire, ajoutant que l'acquisition d'une résistance à diverse molécules d'antibiotiques réduire les choix thérapeutiques.

Les entérobactéries est la collection la plus vaste et la plus hétérogène de bacilles Gram négatif. Plus de 50 genres et des centaines d'espèces et de sous-espèces ont été décrits. Malgré la complexité de cette famille, un nombre réduit de genres et d'espèces est associées aux infections mammaires chez les bovins, comme *E.coli, Klebsiella spp*. Parmi les facteurs de virulence que possèdent ces bactéries, la capacité de formation de biofilm sur surfaces vivantes ou inanimées représente un préjudice inquiétant pour la santé du l'animal et pour les professionnels des industries agro-alimentaires.

Malgré les progrès réalisés dans la connaissance des biofilms, les stratégies de lutte sont jusqu'à présent essentiellement basées sur l'action des agents antimicrobiens, antibiotiques, ou biocides et des détergents et se heurtent encore au problème crucial de la résistance sessile **(Mah et *al*, 2012).**

Dans ce contexte que cette étude a été menée visant comme objectifs :

- Isoler et identifier des entérobactéries responsables des mammites cliniques chez les bovins ;
- Etude la capacité de former un biofilm par des isolats d'entérobactéries responsables de mammites cliniques chez le bovin laitier ;
- Etudier l'efficacité des divers désinfectants sur le biofilm formé par des entérobactéries ;
- Etudier la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques habituellement utilisés en thérapeutiques des mammites bovines

2. Lieu et période d'étude :

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de l'Université de Médéa Dr Yahia Farés durant une période allant du mois de février jusqu'au mois de juin 2022.

3. Matériel utilisé :

3. 1. Matériel non biologique :

On a utilisé différentes catégories de matériel de laboratoire (équipements, petit matériel et instrument), des milieux de culture et réactifs (Annexe…).

3.2. Matériel biologique :

Origine des souches :

Dans ce travail, les souches utilisées ont été isolées, identifiées et analysées précédemment **(Gouita et Talbi, 2021)**. Cette étude représente une continuité en utilisant ces souches isolées (30 souches) comme matériel biologique « support ».

Les souches utilisées pour cette étude ont été isolées à partir du lait de mammite clinique chez les bovins dans divers régions de l'Algérie (tableau6) ; ces souches ont été identifiées en utilisant des techniques de microbiologie classiques comme coloration de Gram et test oxydase, puis par système d'identification miniaturisé API20. Les espèces des souches isolées sont présentées dans le tableau 6 Les souches bactériennes ont été purifiées sur milieu sélectif d'Hektoen puis conservées à la congélation dans un bouillon TSB et glycérol (50/30 vv) jusqu'au moment d'utilisation pour la présente étude.

Tableau 6 : Le nombre et les origines des souches utilisée (30 souches).

Les échantillons ID	Espèces identifiées (API 20^{E})	La région
M01	*Enterobacteriaceae*	SIDI BELABBAS
M02	*Enterobacteriaceae*	SIDI BELABBAS
M09	*Salmonella* spp	SIDI BELABBAS
M10	*Enterobacteriaceae*	SIDI BELABBAS
M11	*Klebsiella pneumoniae*	SIDI BELABBAS
M12	*Raoultella spp*	SIDI BELABBAS
M13	*Klebsiella oxytoca*	SIDI BELABBAS
M15	*Klebsiella oxytoca*	SIDI BELABBAS
M16	*Klebsiella oxytoca*	SIDI BELABBAS
M18	*Klebsiella pneumoniae*	SIDI BELABBAS
M20	*Enterobacteriaceae*	SIDI BELABBAS
M26	*Klebsiella oxytoca*	GUELMA
M27	*Enterobacteriaceae*	GUELMA
M28	*Enterobacteriaceae*	GUELMA
M30	*Klebsiella oxytoca*	GUELMA
M31	*Klebsiella oxytoca*	GUELMA
M34	*Escherichia coli*	GUELMA
M37	*Klebsiella oxytoca*	**Médéa**
M38	*Escherichia coli*	AIN-DEFLA
M46	*Escherichia coli*	AIN-DEFLA
M48	*Serratia liquefaciens*	AIN-DEFLA
M52	*Serratia odorifera*	AIN-DEFLA
M55	*Escherichia coli*	BOUMERDES
M56	*Enterobacteriaceae*	BOUMERDES
M62	*Escherichia coli*	BOUMERDES
M69	*Escherichia coli*	AIN-DEFLA
M70	*Escherichia coli*	AIN-DEFLA
M73	*Serratia marceseme*	GUELMA
M74	*Klebsiella oxytoca*	GUELMA
M77	*Escherichia coli*	GUELMA

4. Méthodologie de travail :

4.1. Revivification des souches :

Les souches précédemment conservés subissent une revivification, après décongélation puis homogénéisation par vortex, un pré-enrichissement a été effectué pour permettre aux bactéries de se revivifier après le stress de la congélation, pour ce fait 200µL d'isolat a été ajouté à 5ml de bouillon BHIB et incubé à 37C° pendant 24H jusqu'au 72H. Après l'incubation, les souches ont été ensemencées dans le milieu Hektoen et incubées à 37°C pendant 24H (figure10, 11)



Figure 10 : enrichissement dans le milieu BHIB



Figure 11 :ensemencement sur mileu Hektoen

4. 2. Étude de la formation du Biofilm :

Dans les laboratoires, différents méthodes in vitro sont utilisés pour étudier la capacité de produire des biofilms par les bactéries. Il s'agit notamment de la plaque de culture en tissue (TCP), la méthode de tubes (TM), et la méthode de Rouge-Congo Agar (RCA) **(Gordon et al., 1985).** Néanmoins, la méthode TCP reste la méthode la plus fiable et la plus utilisé (S**tepavoniç et *al*., 2007).**

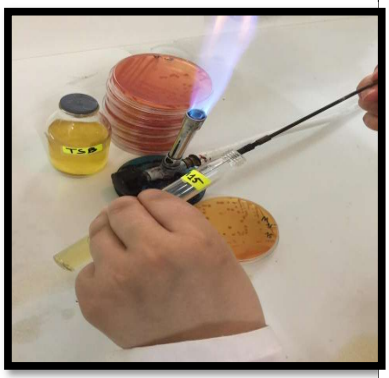
Pour cette méthode, la formation de biofilm a été évaluée en utilisant des microplaques à 96 puits selon les recommandations de (**Tendolkar et *al*., 2004)** et **(Stepanovic et *al*., 2007)** avec légère modifications**.** En bref, des isolats ont été cultivés à 37 °C au bouillon TSB.

Les microplaques utilisées sont en polystyrène comportant 96 puits **(de forme U)** sur lesquelles les bactéries vont adhérer et former un biofilm(POILAB SCIENTIFIC Co Ltd,UK.)

❖ **Mode opératoire** :

1- Prélever quelques colonies bien siolées a partir du milieu Hectoen et l'ensemencer dans 5ml de bouillon TSB puis incuber à 37°C pendant 18 à 24h.
2- Après incubation, une dilutions D1 a été effectuée :50 TSB glucosé à 1% (100µL de TSB dans 4.95 ml de TSB glucosé 1%).
3- Remplir les puits de la microplaque stérile avec 150µL de cette dilution D1, la suspension bactérienne a été inoculée en triplicate, puis incuber à 37°C pendant 24 h (Les puits de la colonne 12 ont été remplis avec 150µL TSB : contrôle négatif)
4- Recouvrir la microplaque et incuber à 37°C pendant 24 h .
5- Après incubation vider délicatement les puits de la microplaque puis lavés avec 200µL de PBS (3fois).
6- Fixer à 60°C pendant 60 min (étuve).
7- Colorer les biofilm éventuellement formé par 150µL cristal violet 0.1% (éliminer cette solution après 15min par rinçage au l'eau distilée……)
8- laver les puits 3 fois avec l'eau distillée (les plaques ont été séchées à la température ambiante).
9- Ré-solubiliser le cristal violet fixé sur les parois des puits avec 150µL d'éthanol à 95%, ensuite la plaque a été recouverte du couvercle (pour réduire au minimum l'évaporation d'éthanol) et laissée à la température ambiante pendant au moins 30min, puis la lecture a été effectuée dans le lecteur MP96 (Safas monaco)

1-ensemencement dans milieu TSB



2-Dilution dans le milieu TSB



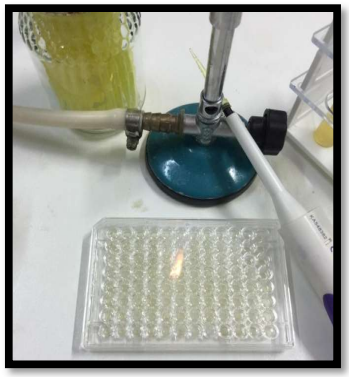
3-rempliçage de la microplaque



4-incubation de la microplaque



5-recouverture d la microplaque



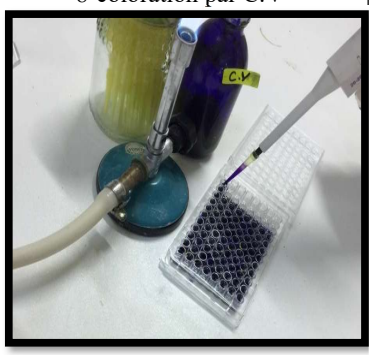
6-rinçage par PBS



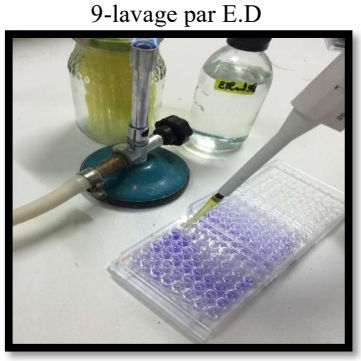
7-la fixation



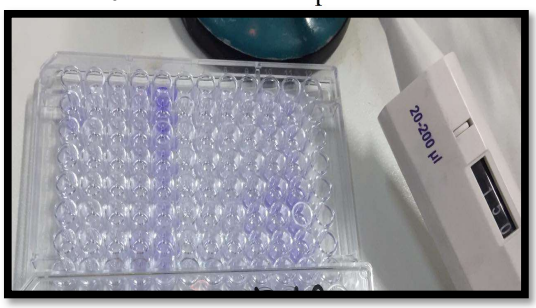
8-coloration par C.V



9-lavage par E.D



10- résolubilisation par l'éthanol



11-lecture par le lecteur MP96

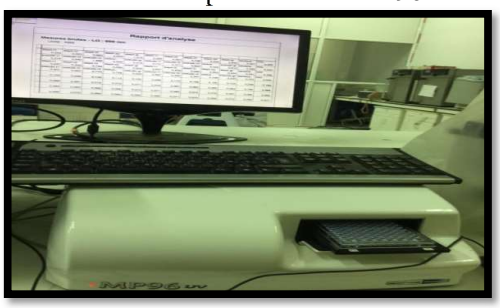


Figure 12: les étapes de la méthode de formation de biofilm TCP

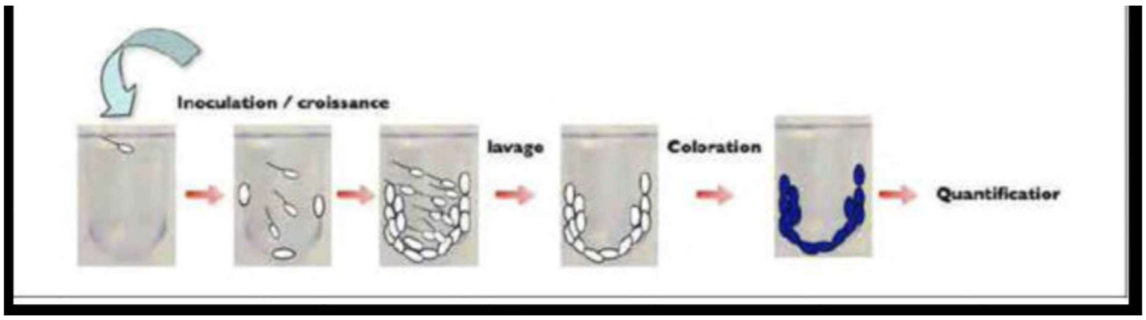


Figure 13: Principe des techniques de quantification des biofilms (Laurent, 2011).

❖ **Lecture de la microplaque :**

La quantification de biofilm formé au niveau de la microplaque se fait par moyen de deux méthodes; une méthode d'estimation subjective directe dites visuelle qui consiste à voir à l'œil nu la formation du biofilm qui se fait préférentiellement sur les bordures des puits, se caractérisent par l'apparition d'un anneau variable d'une souche à l'autre (figure 13).

Soit par une méthode indirecte qui se porte sur la mesure de la DO à 600 nm au lecteur de microplaque (Safas ® monaco MP96).

Les valeurs de la DO ont été considérées comme un indice de bactéries qui adhérent à la surface et forment des biofilms. La classification de la formation de biofilm selon les critères de **Stepanovic et al., 2007** est basée sur les valeurs de DO obtenus (Tableau 7).

Tableau 7 : Classification de la formation de biofilm selon **Stapanovic et al., 2007.**

Moyennes des valeurs de DO	**Formation de Biofilm**
DO lue ≤ DOnc	–
DOnc< DO lue ≤ 2XDOnc	±
2XDOnc < DO lue ≤ 4XDOnc	+
DO lue> 4XDOnc	++

Notes : - = Absence ; ± = faible ; + = Modérée ; ++ = Forte ;**DOnc :** la moyenne des DO des Contrôles négatifs.

4.3. Etude de l'efficacité de quelques désinfectants sur la formation du biofilm :

4.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Dans cette partie de l'étude expérimentale de l'efficacité de quelques désinfectants aux souches préalablement testées par son pouvoir de former le biofilm (détérmination de la CMI et CMB), différents désinfectants ont été testé. Selon les résultats de l'essai de la formation de biofilm, huit souches ont été choisis pour étudier l'efficacité de divers désinfectants sur la formation de biofilm. Ces souches ont été choisies en prenant en considération leur potentiel de formation de biofilm (faible, moyen ou fortement formatrices), ainsi que la disponibilité des microplaques et les milieux et réactifs. Il est important de signaler que le temps accordé pour l'achèvement de ce travail est un facteur limitant qui influe sur le nombre de souches choisis pour cet essai.

Le choix a été fait d'explorer la CMI pour les espèces les plus présentes/importantes dans les cas de mammites bovines à savoir *E. coli, K. oxytoca* . Après analyse de la DO (6 à 9 valeurs) de turbidité, les valeurs de base ont été éliminées, et l'isolat n'a pas été pris si plus de 2 à 3 valeurs discordantes ont été remarquées. La décision de choisir concernant les deux espèces *E.coli* et *K. oxytoca* a été axée sur la fait de prendre 02 isolats faiblement producteurs de biofilms et 02 isolats moyennement producteurs de biofilms pour *K.oxytoca* et 3 isolats producteurs faiblement de biofilms et 1 isolat moyennement producteur de biofilms pour *E.coli* (tableau 8).

Tableau 8 : Les souches utilisées pour tester l'efficacité de désinfectants sur la formation du biofilm

Souches	moyennes de DO	formation du biofilm
M46	0.19	**faible(*)**
M77	0.21	**faible(*)**
M62	0.50	**moyenne (**)**
M70	0.28	**faible (*)**
M37	0.22	**faible (*)**
M74	0.19	**faible (*)**
M13	0.35	**miyenne (**)**
M15	0.43	**moyenne (**)**



Figure 14 : les désinfectants utilisés (photo originale)

✓ **Mode opératoire**

La CMI est la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance du l'organisme présent dans les puits de faciliter la lecture des tests de microdilution et l'enregistrement des résultats peuvent être utilisés tant qu'il n'y a pas la capacité de discerner la croissance dans les puits (**CLSI,2012**) donc la CMI indique le niveau le plus bas d'agent antimicrobien qui inhibe la croissance bactérienne.

La technique utilisée dans cette partie de l''étude de l'efficacité des désinfectants sur la formation de biofilm et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est la technique de plaque de culture de tissu (TCP) de **Stapanovic et al., 2007** expliquée auparavant. Les désinfectants utilisés ont subi une série de dilution selon les instructions de la norme (**CLSI,2012**). Les étapes de la technique se résument comme suit :

1. prélever quelques colonies et l'ensemencer dans 5ml de bouillon TSB, et incuber à 37°C pendant 18 à 24h.
2. Remplir tous les puits avec 100µl de bouillon TSB, à l'exception de la colonne n° 01 et n°12.
3.préparer une dilution a la concentration la plus élevé de désinfectant.

4. Remplir la colonne n°1 avec 200µl de la concentration préparée.

5. Transférer 100µl des puits n°01 au prochain n°02 et bien mélanger. Répéter cette opération successivement pour les puits suivants : n°02 n°03 n°04…… jusqu'à n°10. A la fin, jeter les 100 µl supplémentaires de n°10 (les huit rangés de A à H correspond aux huit souches sélectionnées, les puits n°1 jusqu'ai puits n°10 sert pour les dilutions décroissantes du désinfectants testé, le puits n°11 et n°12 sont réservés aux contrôle positif et négatif, respectivement).

6. Répéter l'opération pour les autres rangées (B-H).

7. Préparer l'inoculum pour chaque isolat (un isolat pour une rangée) : diluer dans le bouillon TSB les suspensions bactériennes pour obtenir une concentration bactérienne de **0,5 McF**, ensuite diluer dans TSB cette concentration de 0,5 McF à 1:150 (transférer 50µl de la suspension dans 7.45ml de TSB pour obtenir une concentration finale d'environ 10^6 CFU/ml.

8. Dans les 15 min qui suit, ajouter 100 µl d'inoculum à chaque puits de n°01 à n°11 (contrôle positif). Puis remplir la colonne n°12 avec 200µl de TSB non ensemencé (contrôle négatif) .

9. Recouvrir la microplaque et incuber à 37°C pendant 24 h.

10. Comparer le taux de croissance dans les puits contenant l'agent antimicrobien avec le taux de croissance dans les puits de contrôle de la croissance (contrôle négatif).

Parfois, nous trouvons une légère croissance bactérienne qui peut conduire à de mauvais résultats, donc nous la comparons à un contrôle négatif et positif.

11. Effectuer les lectures comme indiqué par le guide de lecture **EUCAST (2022)** visuellement d'abord, puis par le lecteur de microplaque à 600nm.

Nous avons fait 15 essais pour déterminer CMI. La concentration du CHX a été calculé en pesant 10g et en faisant la méthode triple où nous avons trouvées la concentration égale à 0,01%.

PVP-I 10%	A.P 5%	CHX
1. Mauvais essai 2. essai avec 1% 3. essai avec 2% 4. essai avec 3% 5. essai avec 1,5%	1. essai avec 1% 2. essai avec 0.1% (3fois)	1. deux mauvais essais avant le calcul de la concentration du CHX 2 .essai avec 0.004% 3. essai avec 0.001% 4. essai avec 0.0001% 5. essai avec 0.000025%



Figure 15: essai avec 0.1% A.P



Figure 16 : essai avec 1.5% PVP-I



Figure 17 : essai avec 0.000025% CHX

Photos originales

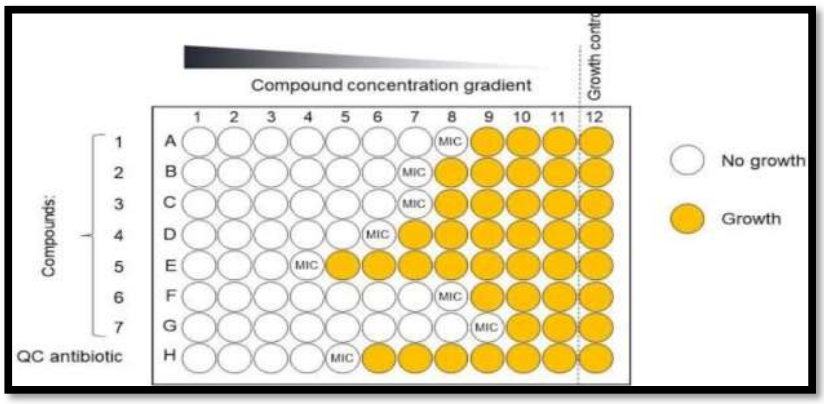


Figure 18 : photo représente l'interprétation des CMI

4.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB):

La concentration minimale bactéricide (**CMB**) est la plus faible concentration d'un agent antibactérien nécessaire pour tuer une bactérie particulière.

La CMB est identifiée en déterminant la concentration la plus faible d'agent antibactérien qui réduit la viabilité de l'inoculum bactérien initial donc la CBM indique le niveau le plus bas d'agent antimicrobien qui entraîne la mort microbienne.

La CBM est un paramètre accepté pour l'évaluation des nouveaux antimicrobiens, et il est fréquemment utilisé comme un outil de recherche pour fournir une prédiction de l'éradication bactérienne**(Nathally Claudiane de Souza Santos et al , 2020)**

✓ **Mode d'opératoire :**

1. Préparer des boites de pétri contenant le milieu Muller- Hinton, avec une épaisseur de la gélose de 4mm, boites bien séchées.

2**.** Poser en spot une goutte de 10µl de suspensions bactériennes, correspondant à un puits CMI et des puits ne montrant aucune croissance (avec des concentrations plus élevées que la CMI du désinfectant testé).

3. Incuber les boites à 37C° pendant 18 à 24h.

4. Faire une lecture de l'éventuelle croissance bactérienne, l'absence de la croissance bactérienne pour la plus faible concentration de puits dans laquelle la solution bactérienne a été spoté indique la CMB du désinfectant testé. Il est possible que la CMB soit égale à la CMI ou plus élevé.

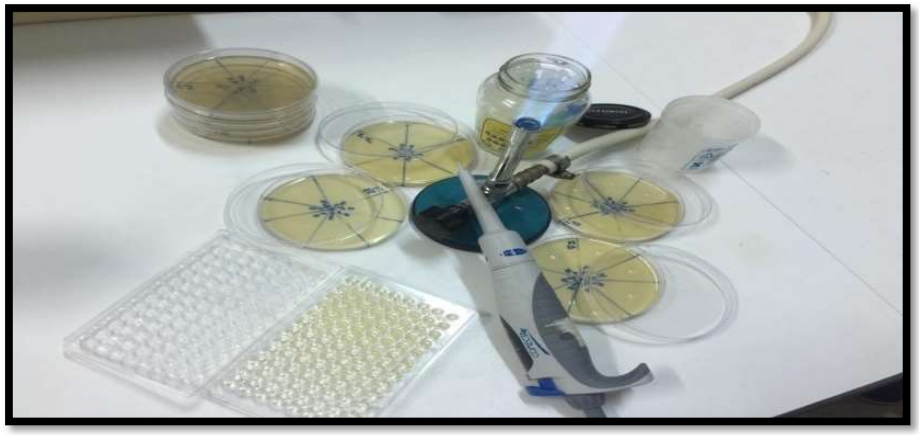


Figure 19 : détermination la CMB (photo originale)

4.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des huit souches testéés a été réalisée par la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé Muller-Hinton selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CA-SFM, 2010), et celles du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) illustrées dans la manuel de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), version 2011 (STANDARDISATION DE L'ANTIBIOGRAMMEA L'ECHELLE NATIONALE..).

Les antibiotiques utlisés ainsi que leurs charges sont:

GEN: GENTAMICINE 10 µg.
N:NEOMYCIN 30µg.
NA : ACIDE NALIDIXQUE 30µg
SXT: TRIMETHOPRIME+SULFAMETHOXAZOLE 25µg
CAZ : CEFTAZIDIME 30µg .
AMP : AMPPICILLIN 10µg
AMC : AMOXOCILLIN+ACIDE CALVULONIQUE 30µg
CT : COLISTIN 10µg
C : CHLOROMPHENICOL 30µg
KF: CEFALOTINE 30µg .
AML: AMOXICILLIN 30µg.
CTX :CEFOTAXIME 30µg
TE:TETRACYCLINE 30µg
CRO : CEFTARIAXONE 30µg

✓ **Technique de l'antibiogramme :**

Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18-24 heures sur milieu d'isolement (gélose Hectoen). Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, déchargées dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et ajustée jusqu'à atteindre une opacité équivalente à 0.5 McF à l'aide d'un densitomètre McFarland.

Le milieu Mueller-Hinton (MH) **(**Annexe**)** coulé en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm est utilisé, l'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées**.** L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur

lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Pétri est ensemencée.

✓ **Application des disques d'antibiotiques :**

Les disques sont déposés (maximum 6 pour une boite de 90mm) à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à la pince stérile. Ils sont espacés de 24 mm, centre à centre. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé. Les boîtes sont ensuite incubées immédiatement pendant 18-24 heures à 37°C.

✓ **Méthode de lecture :**

Les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans le tableau de lecture, puis la bactérie est classée dans l'une des catégories: sensible, résistant ou intermédiaire (Tableau: valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries, Médecine vétérinaire**)** (STANDARDISATION DE L'ANTIBIOGRAMMEA L'ECHELLE NATIONALE..).



Figure 20 : Préparation l'étalon de 0.5 Mac Farland (photos originales)



Figure 21 : Ensemencement avec l'écouvillon. (photo originale)

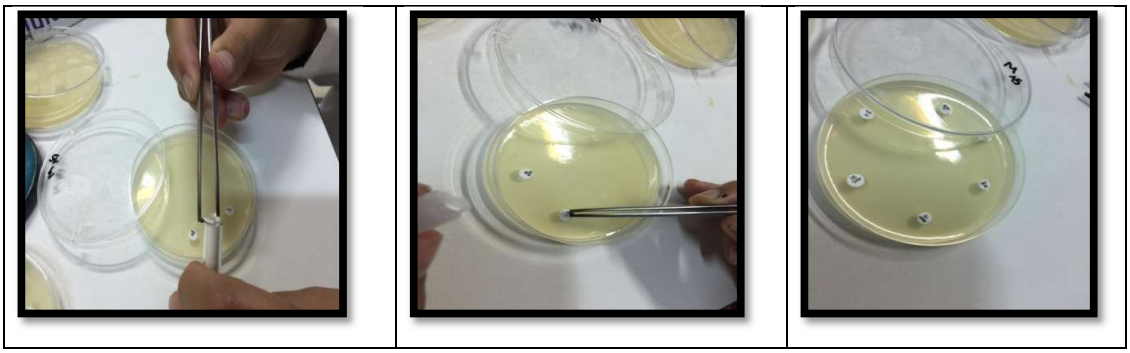


Figure 22 : Application des disques d'antibiotiques (photos originales)

4.5. Recherche des β-lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries :

Les BLSE désignent des enzymes « β-lactamases » produites par les entérobactéries, Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter spp. entraînant une diminution de l'activité des céphalosporines de 3ème génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et des monobactames (aztréonam), mais n'ayant aucune activité vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, moxalactam) ni des carbapénèmes (imipénème).

Selon les recommandations du CLSI (M100-S21), la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité des entérobactéries, Pseudomonas spp. et Acinetobacter spp. Aux céphalosporines n'est plus obligatoire. La détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière. On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

- céfotaxime (CTX ≤ 27mm),
- ceftazidime (CAZ ≤22mm),
- ceftriaxone (CRO ≤ 25mm),
- aztréonam (ATM ≤ 27mm).

Test de synergie pour détection de la BLSE (STANDARDISATION DE L'ANTIBIOGRAMMEA L'ECHELLE NATIONALE. , 2011.).

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de β-lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam).

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline+acide clavulanique (AMC 20/10µg) à 30mm centre à centre d'un disque de C3G (Céfotaxime : CTX 30µg ou Ceftriaxone : CRO 30µg). Incuber 18H à 35°C. Pour les autres BLSE de classe A (CTX-M, CMT, ...) :Le test de synergie doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC à 30mm centre à centre d'un disque de : CAZ, CTX ou CRO et ATM en raison de l'existence de phénotypes de résistance différents (céfotaximase ou ceftazidimase ...).

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques :

- AMC et CTX
- AMC et CAZ
- AMC et ATM.

4.6. Conservation des souches :

Les souches testées ont été conservées au congélateur à -18 °C dans du TSB (Bouillon Tryptone Soja) additionné du 30% de glycérol.



Figure 23 : Conservation des souches (photo originale)

CHAPITRE 5

Résultats & Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Caractères épidémiologiques des échantillons analysés :

Dans la présente étude, des échantillons de lait issus de mammites cliniques ont été prélevés dans cinq différentes régions du Nord Algérien (Sidi Belabes, Médéa, Guelma, Ain Defla, Boumerdès). Un total de 70 échantillons de lait de mammites ont été prélevés à partir de 25 fermes d'élevage de bovins laitier. Le tableau 9 présente les données épidémiologiques des échantillons prélevés.

Tableau 9 : Description des échantillons de lait de mammites prélevés.

La région	**Nombre d'échantillons prélevés**	**Taille de troupeau (vaches laitières)**	**Stade de lactation des vaches**
Sidi Belabes	25	4 à 32	(23) pendant lactation
			(1) premier trimestre
			(1) troisième trimestre
Médéa	4	15 à 30	(1) premier trimestre
			(2) deuxième trimestre
			(1) troisième trimestre
Guelma	15	8 à 20	(15) pendant lactation
Ain Defla,	16	1 à 20	(6) premier trimestre
			(3) deuxième trimestre
			(4) troisième trimestre
			(3) hors lactation
Boumerdès	10	5 à 50	(3) premier trimestre
			(4) deuxième trimestre
			(1) troisième trimestre
			(2) hors lactation

Selon les résultats présentés dans **le tableau 9** Nous observons que les mammites surviennent à la fois dans des petits élevages (taille de troupeaux entre 1 et 8 vaches) et dans des grand élevages où le nombre des vaches laitières est estimé entre 20 à 50 vaches. Le caractère épidémiologique des mammites peut être influencé par différents facteurs (condition d'hygiène des étables, le germe en cause, matériel de la traite, procédures de nettoyage et désinfection). Les mammites peuvent toucher une seule vache d'une façon sporadique ou survenu dans un élevage d'une façon épizootique en affectants un nombre important de

vaches laitières. En considérant les voies de contamination, entré et passage des bactéries dans le trayon, les bactéries à caractères épizootique sont généralement transmissent via les excréments des vaches dans les fermes sales et mal nettoyées, soit à travers les godets de la machine à traite **(Poutrel, 1985).**

Autre, les résultats montent que 92,85 % de cas de mammites survenait pendant la période de lactation (du premier au troisième trimestre) dont la plus part (84%) sont des vaches multiparts. Les mammites sont rarement observées durant la période tarissement (hors lactation), sauf dans le cas de mammites chroniques qui persistent suite à un passage d'une forme subaiguë sans guérison bactériologique **(Weisen, 1974 ; Poutrel, 1985).** En fait, la période de tarissement représente la période idéale de prévention des mammites déclenchant juste après le vêlage, par administration d'antibiotiques par voie galactophore. Cette pratique est mal appliquée dans les élevages, où les éleveurs ne rendent pas à cette stratégie sauf lors d'observation des signes généraux ou locaux de modifications de l'aspect de lait.

2. Analyses bactériologiques et identification des espèces bactériennes :

Selon les objectifs tracés dans la présente étude et la méthodologie choisie, seulement des souches d'entérobactéries responsables de mammites cliniques ont été isolées et identifiées. Après enrichissement des 70 échantillons de lait dans un bouillon TSB durant 24 h, il a été constaté que 66 échantillons ont donné un aspect trouble. L'ensemencement sur gélose sélectif des entérobactéries (milieu Hektoen) des TSB troubles a permis d'obtenir 30 (45,45%) cultures positives **(Figure 24).**

Des aspects morphologiques divers des colonies bactériennes sur ce milieu ont été repérés par observation macroscopiques (photos en annexe). La culture sur milieu Hektoen démontre une variabilité marquée des aspects culturaux (colonies rugueuses ou lisses, crémeuses à contours réguliers), de tailles variables entre 1et 3 mm. La plupart des colonies présentait la couleur saumon orange, ce virage de couleur est un indice de la fermentation de lactose contenait dans le milieu.

Après purification des colonies obtenues, la réalisation de la coloration de Gram a permet de révéler des bactéries d'aspect caractéristique d'entérobactéries (Bacilles Gram négatif groupés en amas, diplo-bacilles et parfois isolés). La réalisation du test d'orientation (test oxydase) a donné un résultat négatif témoignant un caractère commun stable des entérobactéries.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'identification biochimique des espèces bactériennes isolées par la galerie miniaturisée API 20E, a permet d'assigner 23 isolats à différentes espèces bactériennes **(Tableau 10)** Par contre, la lecture des codes obtenus dans le logiciel APIWEB n'a pu donner un résultat concluant pour 7 isolats, en fait ces isolats appartiennent forcement à une espèce de la famille des *enterobacteriaceae* car possèdent les caractères communs de la famille (BG-, oxydase négative, résistance aux sels biliaires, glucose positif).

Tableau 10 : Répartition des souches d'entérobactéries isolées et identifiées

La région	**Nombre d'échantillons**	**Nombre d'isolats**	**Espèces bactériennes identifiées**
Sidi Belabès	25	11	(2) *Klebsiella pneumoniae*
			(1) *Salmonella sp*
			(4) non identifiés
			(3) *Klebsiella oxycota*
			(1) *Raoultella sp*
Boumerdès	10	3	(1) non identifies
			(2) *E. coli*
Ain Defla	16	6	(4) *E. coli*
			(1) *Seratia odorifera*
			(1) *Serratia liquefaciens*
Guelma	15	9	(4) *Klebsiella oxycota*
			(2) *E. coli*
			(1) *Serratia marcescens*
			(2) non identifies
Médéa	4	1	(1) *Klebsiella oxycota*

Selon les résultats de l'identification des espèces bactériennes impliquées dans les mammites cliniques chez les bovins **(Tableau 10),** nous remarquons que la plupart des isolats appartiennent aux deux espèces *E. coli* (8 isolats) *et Klebsiella oxycota* (8 isolats). *Escherichia coli e*st classé parmi les agents pathogènes incriminés dans les mammites bovines, elle provoque une inflammation de la glande mammaire chez les vaches laitières autour de la parturition et en début de lactation avec des symptômes cliniques locaux et systémiques. Il est évident que la gravité de la mammite bovine à *E. coli* est principalement

déterminée par des facteurs liés à la vache plutôt que par la pathogénicité de l'agent pathogène envahissant **(Burvenich et *al*., 2003).** Il est admet que les mammites chez les bovins sont généralement causées par des coques à Gram positif (*S.aureus, S. agalactiae,…*). Néanmoins, *E.coli* est considéré comme la bactérie prédominante dans le groupe des bacilles Gram négatif responsables des mammites bovines **(Gianneechini et *al*., 2002).** Dans la même tendance, **Kalmus et *al*., 2006**, rapportent que les agents pathogènes les plus fréquemment isolés des glandes mammaires chez les génisses étaient *E. coli* (22,1 %), *Streptococcus uberis* (19,1 %) et les staphylocoques à coagulase négative (8,8 %). En comparaison, le principal agent pathogène chez les vaches multipares présentant une mammite clinique à la parturition était *S. aureus* (11,2 %) (**Kalmus et *al*., 2006)**.

Klebsiella pneumoniae et *Klebsiella oxytoca* sont des agents étiologiques importants de la mammite clinique et peuvent entraîner des pertes importantes de production de lait et la mortalité des vaches atteintes. Une forte prévalence de mammites causées par *Klebsiella* spp peut survenir lorsque des matériaux de litière organiques, en particulier de la sciure de bois, sont utilisés, car ils constituent le principal réservoir de cette espèce. C'est un problème particulier pendant les mois d'été lorsque les températures ambiantes et l'humidité élevées offrent un environnement de croissance idéal pour ces organismes **(Podder et *al*., 2014).** D'autres auteurs suggèrent que l'utilisation des procédures classiques de l'isolement et l'identification ne permet pas réellement de distinguer des espèces mal connues dans cette pathologie, des espèces comme *K. variicola* et *K. oxytoca* sont cachées en faveur de l'espèce *K. pneumoniae* **(Oliver et *al*., 2011).**

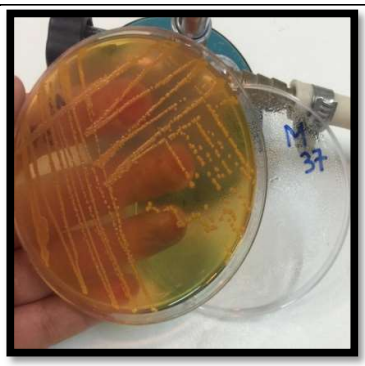
		
Escherichia coli	*Klebsiella pneumoniae*	*Raoultella sp*
		
Serratia liquefaciens	*Klebsiella oxytoca*	*Enterbacteriaceae*

Figure 24 : Les différents aspects des colonies d'entérobactéries trouvées

3. Résultats du potentiel de Formation de Biofilm :

Le potentiel de formation de biofilm des entérobactéries responsables de mammites (n=30) été analyser par la méthode TCP selon les recommandations de Stepanoviç *et al.,* 2007. L'analyse du potentiel de formation de biofilm est basée sur l'absorbance du Crystal violet fixé (voir chapitre IV) ; et les souches sont classées en : 1) forte productrice (**SBP**), 2). Modérée (**MBP**), 3). Faible (**WBP**) et non productrice (**NBP**).

L'analyse du potentiel de production a été obtenue sur trois répétitions en triplicates. Le tableau 11 présente les valeurs de DOs obtenues et la catégorisation des souches en SBP, MBP, WBP.

Les résultats de la méthodes TCP a démontré que l'ensemble des souches ont la capacité de production de biofilm ; néanmoins, nous avons constaté une grande variabilité de ce potentiel entre les différentes souches et au sein de la même espèce. Soixante pourcent (60%)

des isolats ont présenté un faible potentiel de production biofilm, alors que 40% ont présenté soit un potentiel modéré à fort.

Parmi les espèces les plus isolées, 3/8 isolats de *E coli* ou de *K oxytoca* ont présentés un potentiel de production de biofilm modéré à fort. Alors que les isolats de *K pneumoniae* ont présentés systématiquement une forte production de biofilm.

Quatre sur sept (4/7) d'isolats d'entérobactéries non identifiable ont présenté un potentiel de production de biofilm modéré/fort ; il est à signalé que du fait que l'identification biochimique API20E n'a pas pu déterminer avec certitude l'espèce, il est à recommander de les explorer en avantage ces isolats avec des méthodes de biologie moléculaire (MALDI-TOF, ribosome 16S).

D'après ces résultats, la technique de microplaque à 96 puits s'avère une bonne méthode pour le dépistagede la formation du biofilm in vitro. Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (**Racha et al., 2012**).

Tableau n° 11 : Caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries isolées. (Moyenne).

ID Isolat	Espèce	1er Répétition Moy	1er Répétition Moy	1er Répétition Moy	Total (3 Rép) Moy	Estimation de biofilm
T (-)	-	0,10	0,12	0,12	0.1	-
M01	*Enterobacteriaceae*	0.12	1.15	1.12	0.79	SBP
M02	*Enterobacteriaceae*	0.42	2.65	2.61	1.89	SBP
M09	*Salmonella spp*	0.21	0.46	0.33	0.33	MBP
M10	*Enterobacteriaceae*	0.16	0.38	0.27	0.27	WBP
M11	*K pneumoniae*	1.10	2.89	1.96	1.99	SBP
M12	*Raoultella spp*	0.13	0.37	0.27	0.25	WBP
M13	*Klebsiella oxytoca*	0.17	0.49	0 .40	0.35	MBP
M15	*Klebsiella oxytoca*	0.18	0.54	0.56	0.43	MBP
M16	*Klebsiella oxytoca*	0.11	1.44	1.60	1.05	SBP
M18	*K pneumoniae*	2.07	1.81	1.10	1.66	SBP
M20	*Enterobacteriaceae*	0.18	0.28	0.46	0.30	MBP
M26	*Klebsiella oxytoca*	0.25	0.22	0.20	0.23	WBP
M27	*Enterobacteriaceae*	0.11	0.20	0.23	0.18	WBP
M28	*Enterobacteriaceae*	0.13	2.48	2.40	1.67	SBP
M30	*Klebsiella oxytoca*	0.13	0.26	0.34	0,24	WBP
M31	*Klebsiella oxytoca*	0.13	0.27	0.32	0,24	WBP
M34	*Escherichia coli*	0.13	0.24	0.27	0,21	WBP
M37	*Klebsiella oxytoca*	0.17	0.25	0.23	0,22	WBP
M38	*Escherichia coli*	0.14	0.19	0.31	0,21	WBP
M46	*Escherichia coli*	0.13	0.21	0.22	0.18	WBP
M48	*Serratia liquefaciens*	0.20	0.19	0.20	0.19	WBP
M52	*Serratia odorifera*	0 .34	0.17	0.37	0.29	WBP
M55	*Escherichia coli*	0.42	0.20	0.21	0.27	WBP
M56	*Enterobacteriaceae*	0.13	0.26	0.35	0.24	WBP
M62	*Escherichia coli*	0.69	0.46	0.36	0.50	MBP
M69	*Escherichia coli*	0.20	0.25	0.27	0.24	WBP
M70	*Escherichia coli*	0.33	0.26	0.29	0.28	MBP
M73	*Serratia marceseme*	0.18	0.58	0.37	0.31	WBP
M74	*Klebsiella oxytoca*	0.16	0.21	0.19	0.19	WBP
M77	*Escherichia coli*	0.15	0.17	0.31	0.21	WBP

4. Détermination de la susceptibilité aux désinfectants (MIC/MBC) :

Huit isolats (4 *E. coli ;* 4 *Klebsiella oxytoca*) sur 30 souches ont été sélectionnés pour déterminer leurs susceptibilités aux trois désinfectants (Acide peracétique, Chlorhexidine et Povidone Iodine) ; en termes de MIC (minimum inhibitory cencentration) sur plaques de microtitration **(Standard EUCAST, 2022)** et MBC (minimum bactéricidal cencentration) par culture en spot sur gélose. La figure 25 représente des photographies exemplaires des deux paramètres.

Le tableau 12 et 13 présentent les différents valeus de MIC et MBC de chaque désinfectant (Povidone iodine PVP-I, Chlorhexidine CHX et Acide peracétique AP).

Les résultats obtenus démontrent une grande variabilité ; en termes de force désinfectant, le CHX s'avère le plus acif avec des valeurs plus faible de MIC et MIC_{90} pour inhiber la croissance bactérienne des différents isolats. Aucune différence n'a été notée entre les souches de *K. oxytoca* et *E. coli*.

Tableau 12 : MIC (minimum inhibitrice concentration) des différents désinfectants

	Désinfectants (mg/L)					
	Povidone – iodine		**Chlorhexidine**		**Acide peracétique**	
Isolats	**MIC intervalle**	**MIC 90**	**MIC intervalle**	**MIC 90**	**MIC intervalle**	**MIC 90**
Total (n=8)	3750-7500	7500	0.0078-0.0156	0.0156	15.625-31.25	31.25
K. oxytoca (n=4)	3750-7500	7500	0.0156	0.0156	15.625-31.25	31.25
E. coli (n=4)	7500	7500	0.0078-0.0156	0.0156	15.625-31.25	31.25

MIC= Minimum inhibitory concentration ; MIC_{90}= MIC qui inhibe 90% des isolats ;

Les résultats des concentrations bactéricides démontrent aussi une grande différence. Le désinfectant chlorhexidine se démontre le plus puissant en exprimant plus faibles MBC et MBC_{90} (0.125 mg/L) ; L'acide peracètique et le Povidone ont exprimés des MBC de 250mg/L et 15.000 mg/L, respectivement. Nous avons observé que les concentrations bactéricides MBC dans les trois désinfectants sont deux fois à quatre fois plus concentré que les concentrations inhibitrices MIC.

Nous avons observé qu'on moyenne, les isolats d'*E. coli* nécessite plus de concentration d'acide peracétique que les isolats de *K. oxytoca* (250 *vs* 31.25 mg/L, respectivement) ; néanmoins, une souche d'*K. oxytoca* (M37, voir annexe) s'évérée la plus tolérante avec MBC de 500mg/L. La concentration PVP-I MBC_{90} qui tue 90% de *K Oxytoca* s'avère la valeur max de 15000 mg/L.

Tableau 13 : MBC (minimum bactericid concentration) des différents désinfectants

	Désinfectants (mg/L)					
	Povidone – iodine		**Chlorhexidine**		**Acide peracétique**	
Isolats	**$MBC_{intervalle}$**	**MBC_{90}**	**MBC intervalle**	**MBC_{90}**	**MBC intervalle**	**MBC_{90}**
Total (n=8)	3750-15 000	15000	0.0078 – 0.125	0.125	15.6 – 500	250
K. oxytoca (n=4)	3750-7500	15000	0.0156 – 0.125	0.0312	15.6 – 500	31.25
E. coli (n=4)	7500-15 000	7500	0.0078 – 0.125	0.0312	125 - 250	250

MBC= Minimum bactericid concentration ; MBC_{90}= MBC qui inhibe 90% des isolats

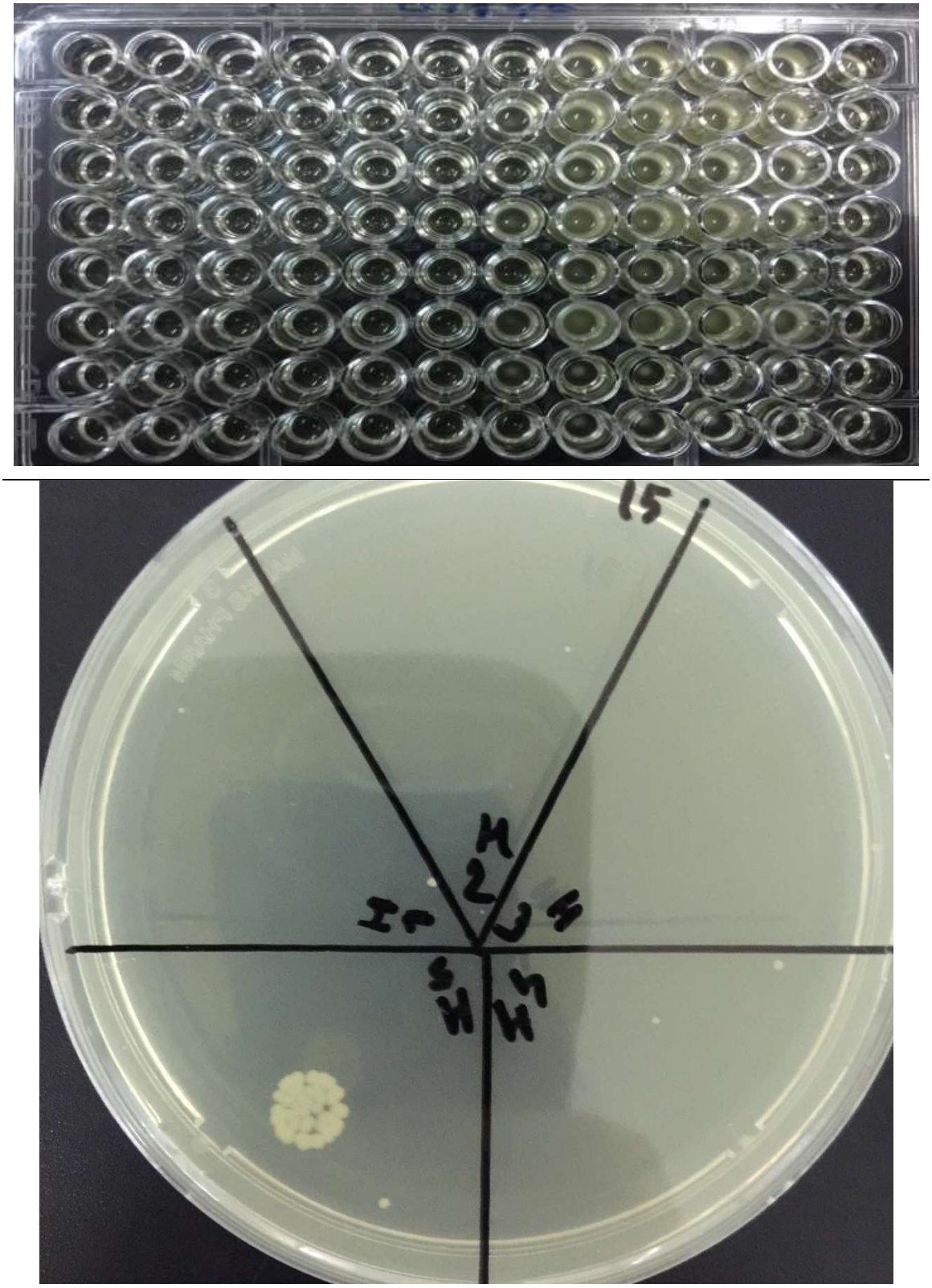


Figure 25 : Photographie personnelle présentant les résultats exemplaires de MIC (96-puits) et MBC (culture en spot).

5. Susceptibilité aux désinfectants et potentiel de production de biofilm /espèces.

La figure 26 présente la susceptibilité des différents isolats d'entérobactéries choisis en termes de leurs potentiels de production de biofilm. D'après les résultats ci-présents, en comparaison, les cultures en puits avec des concentrations non inhibitrices (faibles concentrations de désinfectant) ont présentés des valeurs DO comparable avec le control positif. Ce qui est intéressant, ce qu'on remarque sur le comportement des isolats en termes de leurs potentiels de production de biofilm. Dans toutes les concentrations non inhibitrices, Les isolats modérément producteurs de biofilm (MBP) présentent des valeurs DO de turbidité inférieurs à ceux des isolats faiblement producteurs de biofilm (WBP). Ce comportement pourrait être dû à la capacité des bactéries productrices de biofilm et d'en fabriquer une matrice extracellulaire pour y s'est adhérer. La turbidité la plus faible dans ce groupe (MBP) est liée à l'attachement des bactéries à cette matrice et qui ne sont plus en suspension. Les bactéries du groupe (WBP) ont tendance à s'y restent plus en suspension, ce qui augmente respectivement la valeur de turbidité.

La figure 27 et la figure 28 présentent la susceptibilité des isolats de *K oxytoca* et d'*E. coli* respectivement terme du potentiel de production de biofilm (MBP, WBP). Nos résultats démontrent que les isolats de *K. oxytoca* (MBP) ont présenté une turbidité plus faible en comparaison avec les isolats *K. oxytoca* (WBP). Alors que les isolats d'*E. coli* ont présentés des valeurs de turbidité équivalentes entre MBP et WBP.

Plusieurs études précédentes stipulent que l'utilisation inappropriés de désinfectants peuvent induire aux bactéries une adaptabilité / tolérance et une résistance croisée aux antibiotiques. Comprendre l'émergence de la susceptibilité aux désinfectants et à la résistance aux antibiotiques -au sein des établissements (médicales ou agroalimentaires) où une large utilisation de désinfectant est utilisée- s'avère d'une importance pertinente.

Des études précédentes ont montré que les bactéries Gram+ diffèrent des bactéries Gram- en termes de tolérance aux biocides ; **(Morrissey et *al.* (2014)** démontrent qu'une grande partie des isolats tolérants aux biocides appartenaient à des entérobactéries isolées, comme prévu dans l'environnement d'échantillons de lait. En dis concordance, la plupart des isolats de notre étude étaient susceptible à au moins un seul biocide. Néanmoins, nous avons observé une variabilité de MIC/ MBC importante entre les différents désinfectants exploités. **Arioli et *al.* (2013)** n'ont également trouvé aucune co-tolérance systématique entre deux ou plusieurs biocides testés. Cependant, quelques isolats dans la présente étude ont montré une co-résistance aux biocides et aux antibiotiques.

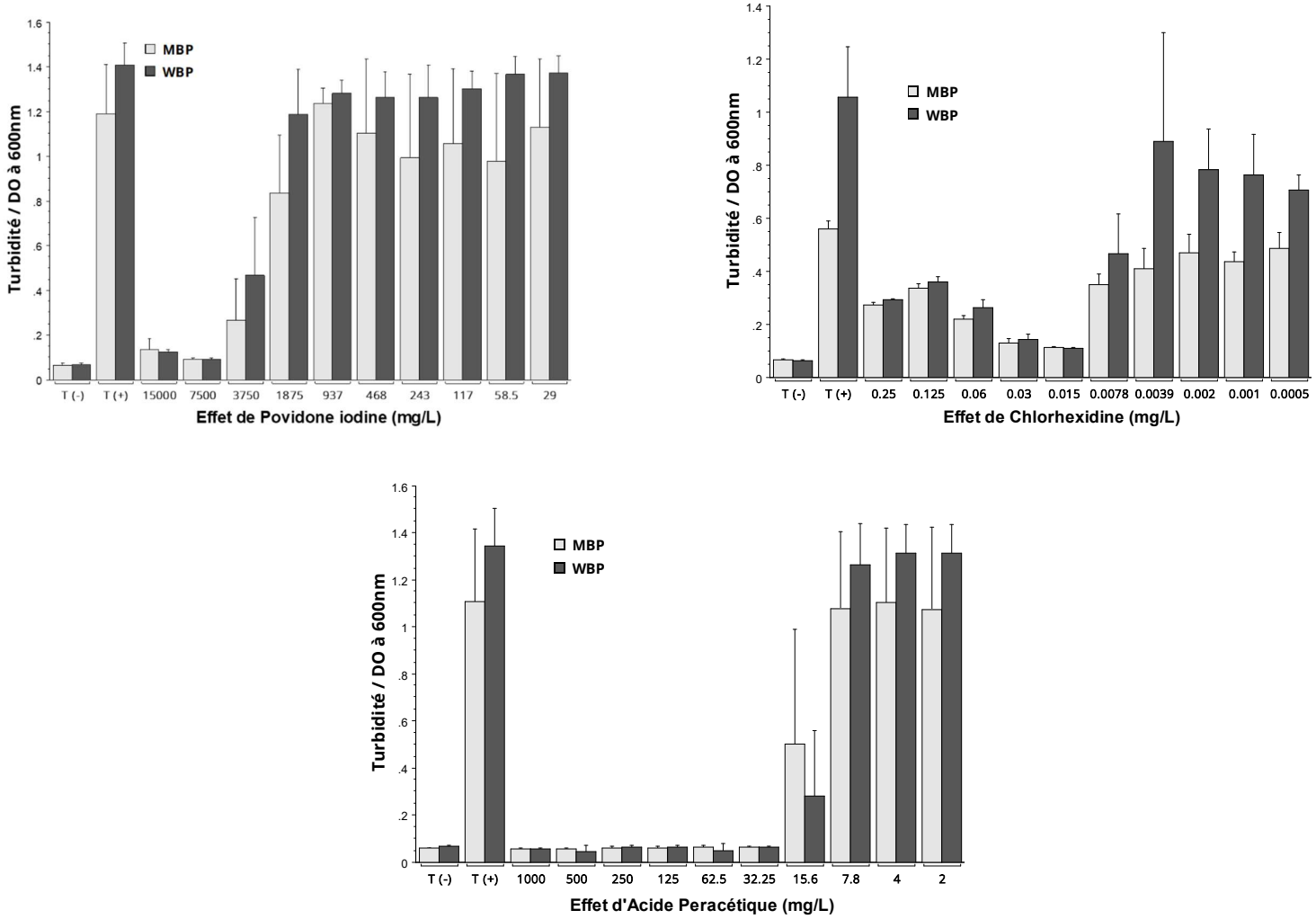


Figure 26 : La susceptibilité aux désinfectants (PVP-I, CHX, AP) en terme du potentiel de production de biofilm (MBP *vs* WBP).

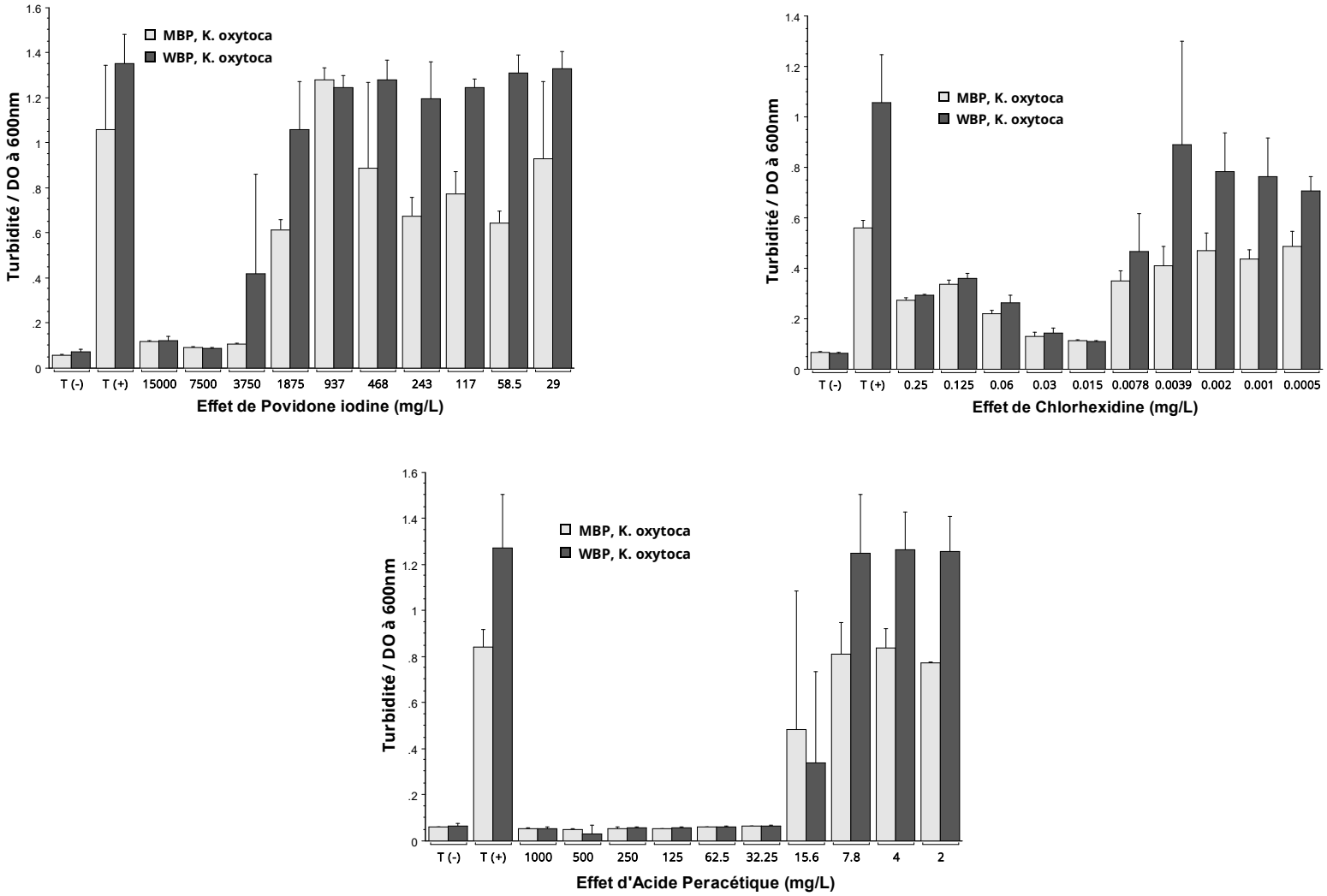


Figure 27 : La susceptibilité aux désinfectants sur les isolats d'*K. oxytoca* en terme du potentiel de production de biofilm (MBP *vs* WBP).

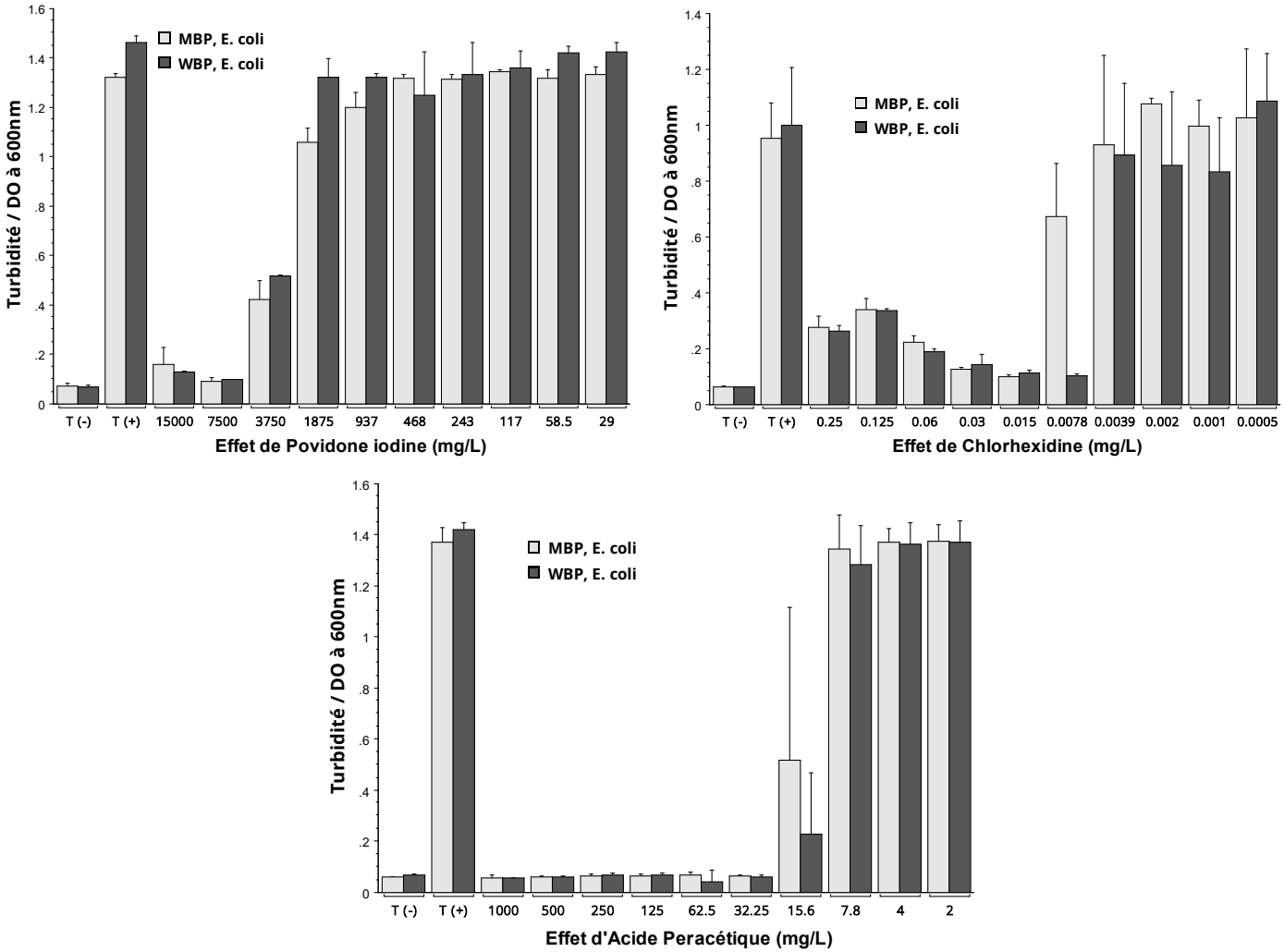


Figure 28 : La susceptibilité aux désinfectants sur les isolats d'*E. coli* en terme du potentiel de production de biofilm (MBP *vs* WBP).

La capacité des bactéries à s'attacher aux surfaces abiotiques et la haute résistance des bactéries sessiles aux biocides sont les principales sources d'inquiétude pour de nombreuses industries, y compris médical et agroalimentaire **(coquet et *al.*, 2017).**

Les interactions entre les bactéries et leur environnement jouent un rôle essentiel dans la formation de biofilms sur les surfaces abiotiques. Chez *E. coli*, la capacité à former des biofilms est corrélée à la forte augmentation de l'adhérence initiale chez les bactéries surproductrices de curli **(coquet et *al.*, 2017).** Dans certaines souches *d'E. coli*, le curli et la cellulose sont les principaux constituants de la matrice extracellulaire du biofilm et contribuent ainsi à la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens et désinfectants. **Rodjers et *al.*, (2016)** ont montré que des concentrations médicalement pertinentes de chlorhexidine [0,1 % et 1 % (p/v)] augmenté la rigidité des biofilms.

Le Povidone- iodine, La chlorhexidine et l'acide peracétique sont des désinfectants utilisés couramment en raison de son activité à large spectre. Ils sont principalement utilisés pour décontaminer les instruments et la peau afin de prévenir les infections bactériennes. Les niveaux de CMI des désinfectants exploités dans la présente étude ont été faibles aux valeurs rapportées pour les souches cliniques **(Amorim et *al.*, 2004 ; Rodjers et *al.*, 2016).**

Il a été démontré que la température à 37 °C augmente l'effet désinfectant de 10 µg ml−1 alors qu'un effet bactériostatique est observé à 30°C pour la même concentration antiseptique. Généralement, l'application pratique et courante des différents désinfectants s'avère appliqué à des températures plus faible d''ambiance (25C°). Une hypothèse pour expliquer cette observation pourrait être une modification de la fluidité membranaire, qui stimule des changements affectant la pénétration de désinfectant. Des investigations complémentaires seraient alors nécessaires pour explorer une telle hypothèse.

Il a été observé que la capacité d'internalisation de désinfectant n'est pas associée à capacité de formation de biofilm. Ce dernier pourrait fournir un avantage de survie distinct qui permet aux agents pathogènes d'éviter l'action des antimicrobiens présents dans le milieu et de y résister **(Silva et *al.*, 2014).**

La tolérance aux différents désinfectants est souvent médiée par des pompes d'efflux à large spécificité du substrat **(Poole, 2007).** L'exploration des isolats tolérants aux biocides et et aux profils génétiques de la résistance aux désinfectant est d'une importance majeure.

5. Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de la résistance aux antibiotiques concernant les huit souches choisis isolées sont présentés dans le tableau 14

Tableau 14 : Résultats de sensibilité aux antibiotiques

Antibiotiques	Souches bactériennes								
	E. coli (n=4)			*Klebsiella oxytoca* (n=4)			Total (n= 8)		
	S	R	I	S	R	I	S	R	I
Ampicilline (AMP)	25%	75%	0%	75%	25%	0%	50%	50%	0%
Amoxicilline (AML)	25%	75%	0%	75%	25%	0%	50%	50%	0%
Amoxicilline+Acide clavulanique (AMC)	50%	50%	0%	25%	75%	0%	38%	62%	0%
Cefalotine (KF)	0%	75%	25%	75%	25%	0%	38%	50%	12%
Néomycine (N)	0%	50%	50%	50%	0%	50%	25%	25%	50%
Gentamicine (GEN)	75%	0%	25%	100%	0%	0%	88%	0%	12%
Acide nalidixique (NA)	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (SXT)	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
Tétracycline (TE)	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%
Colistine (CT)	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
Chloramphénicol (C)	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%

Les résultats révèlent que la totalité des souches (100%) étaient résistantes à au moins un antibiotique testé. Le taux de résistance à la tétracycline était le plus élevé (100%), suivi par celui de Amoxicilline+Acide clavulanique avec un taux de 62%. Aucune réssitance n'a était observés pour les antibiotiques suivant : Chloramphénicol, Acide nalidixique, Triméthoprime+ sulfaméthoxazole, Colistine et la Gentamicine.

En comparant les résultats de sensibilité aux divers antibiotiques entre les deux espèces : *E. coli* et *Klebsiella oxytoca,* on observe que le même profil de résistance est enregistré pour les antibiotiques suivants : Chloramphénicol, Triméthoprime+ sulfaméthoxazole, Tétracycline, Colistine et l'Acide nalidixique. Par contre, les souches d'*E. coli* sont plus résistantes à l'Ampicilline, Amoxicilline, Néomycine et Céfalotine par rapport les souches de *Klebsiella oxytoca.*

En ce qui concerne la recherche des β-lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les souches d'entérobactéries choisis dans la présente étude, les résultats de test de synergie pour détection de la BLSE n'a pas montré des profil relevant de la présence des enzymes de β-lactamases à spectre élargi (pas d'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'antibiotiques) (**Figure 29).** Ce résultat montre que les antibiotiques de classe des céphalosporines de 3ème génération (C3G) (céfotaxime,

ceftriaxone, ceftazidime, Ceftiofur) restent toujours actifs sur des souches d'entérobactéries responsables de mammite bovines.

La détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière (CLSI (M100-S21), car la plupart des souches d'entérobactéries (*E. coli, K. pneumoniae*) responsables de maladies nosocomiales ont une tendance de résister à divers classes d'antibiotiques et produire des β-lactamases à spectre élargi. Cette interprétation évoque l'attachement des souches isolées à l'hôte (vaches) et exclu l'hypothèse de transmission des souches hospitalières vers l'élevage d'un côté, et d'autre coté minimise le risque de transmission des souches bactériennes vers l'homme via la consommation de lait potentiellement contaminé surtout lors de mammites sub-cliniques.

Le faible taux de résistance observé pour les deux molécules Chloramphénicol et Gentamicine peut être justifié que ces antibiotiques sont testé uniquement dans le cadre de l'épidémio-surveillance **(Anonyme 1)**. Le Chloramphénicol est n'est plus utilisé en antibiothérapie. Les aminoglycosides (gentamicine) sont utilisés (en particulier lorsque l'association est recommandée) pour traiter les infections à en milieu hospitalier ou communautaire. En revanche, cet antibiotique est non homologué à être utilisé dans le traitement des infections en médecine vétérinaire.

La tétracycline a été préférentiellement choisie pour le traitement et la prophylaxie des infections chez les animaux d'élevage, en raison de son spectre large et son temps d'élimination retardé **(Ardic et *al*., 2005).** En Algérie, les tétracyclines sont utilisées dans le domaine vétérinaire d'une façon très intense et abusive, le taux élevé de résistance à la tétracycline dans les souches isolées de mammite bovines pourrait expliquer en partie nos résultats.

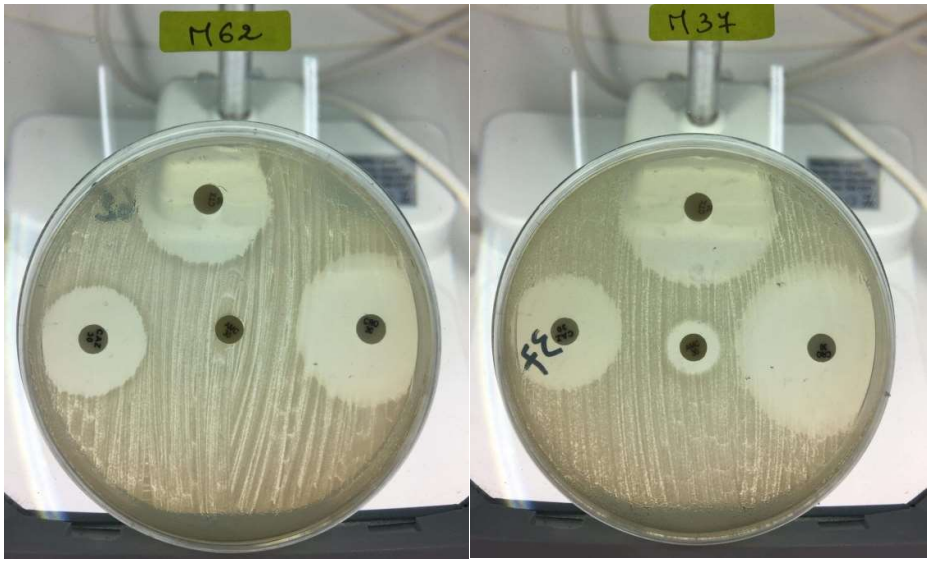


Figure 29 : Photos de test de synergie pour recherche de BLSE (photo personelle).

6. Relation entre potentiel de production de biofilm et profil de l'antibiorésistance :

Les résultats d'interaction entre le potentiel des souches bactériennes à former le biofilm et leur profil de résistance aux antibiotiques sont présentés dans le tableau15.

Tableau 15: Interaction entre capacité de formation de biofilm et l'antibiorésistance

ID Isolat	Espèce	Total (3 Rép) Moy	Estimation de biofilm	Profil d'antibiorésistance	Multi résistance (MDR)
M46	*Escherichia coli*	0.18	WBP	KF-TE-N	OUI
M77	*Escherichia coli*	0.21	WBP	AMC- KF-TE	OUI
M62	*Escherichia coli*	0.50	MBP	AMP-AML-AMC-TE	NON
M70	*Escherichia coli*	0.28	MBP	KF-TE-N	OUI
M37	*Klebsiella oxytoca*	0,22	WBP	AMP-AML-AMC-TE	NON
M74	*Klebsiella oxytoca*	0.19	WBP	KF-TE	NON
M13	*Klebsiella oxytoca*	0.35	MBP	AMP-AML-AMC-TE	NON
M15	*Klebsiella oxytoca*	0.43	MBP	AMP-AML-AMC-TE	NON

Dans ces résultats, les profils d'antibiorésistance montrent que trois souches d*'E.coli* (75%) sont qualifiées comme multirésistance (Multi Drug Resistance, MDR), ces souches présentent une résistance à trois antibiotiques de classes différentes. Par contre, aucune souche de *K. oxytoca* ne montre ce profil de MDR.

Outre, seulement une souche d'*E.coli* qualifié MDR a montré un potentiel modéré de formation de biofilm, les deux restantes sont faiblement formatrices de biofilm. Les résultats découlant ici suggèrent que la relation entre la résistance aux antibiotiques et la capacité de formation de biofilm est faible. Il est admet que le déclanchement d'une infection mammaire est étroitement liée aux facteurs liés à l'animal (lactation, hygiène, les maladies sous-jacentes, …) et d'autres concernent la ou les agents pathogènes incriminés **(Burvenich et *al*., 2003).** En fait, la formation de biofilm est considérée comme facteur de virulence rendant la bactérie en cause plus agressive pour le parenchyme mammaire, augmente le temps de persistance dans la mamelle et diminué l'efficacité de l'antibiothérapie. Les bactéries formants de biofilm se trouvent enrobées dans une matrice extracellulaire protectrice qui diminue le passage et la pénétration de la molécule d'antibiotique vers son cible **(Ito et *al*., 2009).**

Conclusion Générale

Conclusion et recommandations

Chez les bovins, la mammite est la maladie la plus courante et qui responsable d'importante pertes économiques, du fait à la diminution de la production laitière. Les entérobactéries sont habituellement impliquées dans ces infections mammaires. Les infections mammaires dû aux entérobactéries sont souvent attribuables aux biofilms ce qui engendre une tolérance aux désinfectants et perte de sensibilité aux divers d'antibiotiques.

Cette étude menée pour explorer la tolérance aux désinfectants (Povidone-iodine, Chlorhexidine et Acide peracétique) des isolats d'entérobactéries responsables de mammites cliniques et investiguer la relation entre formation de biofilm ces souches et la résistance croisé aux désinfectants et aux antibiotiques.

Les principaux résultats de cette étude sont :

A partir d'un total de 70 échantillons de lait de mammites, 30 souches d'entérobactérie ont été isolées set identifiées dans la plupart appartiennent aux deux espèces *E. coli* (8 isolats) *et Klebsiella oxycota* (8 isolats).

Les résultats de la méthode TCP ont démontré que l'ensemble des souches ont la capacité de production de biofilm ; néanmoins, nous avons constaté une grande variabilité de ce potentiel entre les différentes souches et au sein de la même espèce. Soixante pourcent (60%) des isolats ont présenté un faible potentiel de production biofilm, alors que 40% ont présenté soit un potentiel modéré à fort.

Huit isolats (4 *E. coli ;* 4 *Klebsiella oxytoca*) sur 30 souches ont été sélectionnés pour déterminer leurs susceptibilités aux trois désinfectants (Acide peracétique, Chlorhexidine et Povidone Iodine) ; en termes de MIC sur plaques de microtitration et MBC par culture en spot sur gélose. Les résultats obtenus démontrent une grande variabilité ; en termes de force désinfectant, le CHX s'avère le plus acif avec des valeurs plus faibles de MIC et MIC_{90} pour inhiber la croissance bactérienne des différents isolats. Aucune différence n'a été notée entre les souches de *K. oxytoca* et *E. coli*. Les isolats d'*E. coli* nécessitent plus de concentration d'acide peracétique que les isolats de *K. oxytoca* (250 *vs* 31.25 mg/L, respectivement) ; néanmoins, une souche d'*K. oxytoca* (M37, voir annexe) s'évérée la plus tolérante avec MBC de 500mg/L. La concentration PVP-I MBC_{90} qui tue 90% de *K Oxytoca* s'avère la valeur max de 15000 mg/L.

Conclusion et recommandations

Les résultats d'étude de la sensibilité aux antibiotiques révèlent que la totalité des souches (100%) étaient résistantes à au moins un antibiotique testé. Le taux de résistance à la tétracycline était le plus élevé (100%), suivi par celui de Amoxicilline+Acide clavulanique avec un taux de 62%. Aucune résistance n'a était observés pour les antibiotiques suivant : Chloramphénicol, Acide nalidixique, Triméthoprime+ sulfaméthoxazole, Colistine et la Gentamicine. Les résultats de test de synergie pour détection de la BLSE n'ont pas montré du profil relevant de la présence des enzymes de β-lactamases à spectre élargi.

Les résultats d'interaction entre le potentiel des souches bactériennes à former le biofilm et leur profil de résistance aux antibiotiques, trois souches d*'E.coli* (75%) sont qualifiées comme multirésistance (Multi Drug Resistance, MDR), ces souches présentent une résistance à trois antibiotiques de classes différentes. Par contre, aucune souche de *K. oxytoca* ne montre ce profil de MDR. Les résultats découlant ici suggèrent que la relation entre la résistance aux antibiotiques et la capacité de formation de biofilm est faible.

Au terme de ce travail, les mammites causées par les entérobactéries chez les bovins nécessitent une attention particulière en matière de diagnostic, suivie et traitement. Il est préférable de faire un antibiogramme avant d'instaurer une antibiothérapie en minimisant l'acquisition de la résistance. En plus, des procédures du nettoyage et désinfection des étables, matériel de traite avec des désinfectants testé actif s'avère obligatoire.

Références

A

- Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M. 2000. Comprendre le biofilm et ses enjeux. onelife-biofilmfree / biofilm-education.
- Alnnasouri M, Rondags E, Fick M. 2007. Dégradation des mycotoxines par voie biologiques. Rapport Master2 recherche. ENSAIA. INPL Nancy- France.
- Alnnasouri M. 2010. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France Appl. Environ. Microbiol. 52, pp l242-|246
- Amorim CVG,Aun CE, Mayer MPA.2004.Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol.Braz Oral Res 18:242-246.
- Anand S, Singh D, Avadhanula M, Marka S. 2014. Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes. Compre. Revi in Food. Science and FoodSafety. 13. pp 18-33
- Ando T, Itakura S, Uchii K, Sobue R, Maeda S. 2009. Horizontal transfer of non-conjugative plasmid in colony biofilm of *Escherichia coli* on food-based media. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1865–1869.
- Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu T.2005. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. Int J Antimicrob Agents, 26(3):213-218.
- Arioli S, Elli M, Ricci G, Mora D, 2013. Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. Int. J. Food Microbiol. 163 (1).
- Aumeran C, Balestrino D, Forestier C. 2020. Biofilms bactériens et santé. Encyclopédie de l'environnement. pp 1-7.
- Aye AM. 2015. Mise en évidence du système de communication "Quorum Sensing" impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. Thèse de doctorat en aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Microbiologie / Biochimie. Université de Toulon. France.

B.....

- Behlau I, Gilmore MS. 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. Arch Ophthalmol. 126, pp 1572-1581. 26
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM. 2008. Escherichia coli biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 322. pp 249-289
- Benkhaldi. 2017. Activité antimicrobienne des extraits végétaux application à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière. mémoire de master en Biologie Option : Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE de TLEMCEN Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers : p1.
- BLAINS S: Interets et techniques de l'identification bacterienne des germes de mammites au cabinet veterinaire. Journées Nationales des G.T.V, Tours 2004 : 811-820 p.
- BOUAZIZ O .2020-2021.ours Pathologie de la Reproduction ,Etude générale des mammites des vaches laitières . A4 .
- Bradley A , Green M. 2000. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. Journal of dairy science.83(9). 1957- 1965.
- Bradley AJ. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. The Veterinary Journal, 164(2). 116-128.
- Bragg R, Meyburgh CM, Lee JY, Coetzee M.2018. Potential treatment options in a post-antibiotic era. *Infectious Diseases and Nanomedicine III. Springer, Singapore,* pp. 51–61.
- Branger A, Richer M-M, Roustel S. 2007. microbiochimie et alimentation. Ed educagri. pp 131-140.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V ; Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27:9, 1017-1032.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L.2003. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. Vet Res. Sep-Oct;34(5):521-64.

C.....

- Carlie SM, Boucher CE, Bragg RR. 2019. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resist. Updates* 48, 100672.
- Carlie SM, Boucher CE, Bragg RR.2020. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates* 48 , 100672.
- Chaoyu Tong, Hong Hu, Gang Chen, Zhengyan Li , Aifeng Li , Jianye Zhang. 2021.Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research* 195 , 110897.
- Characklis WG, Marshall KC. 1990. Biofilms. pp 341-394.
- Characklis WG. 1973. Attached microbioal growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. Water Res. 7. pp 1249-1258.
- Charoenlap N, Jiramonai L, Chittrakanwong J, Tunsakul N, Mongkolsuk S,Vattanaviboon P. 2018. Inactivation of ahpC renders Stenotrophomonas maltophilia resistant to the disinfectant hydrogen peroxide. *Anton Leeuwint J. G*. 112, 809–914.
- Clarke TE, Romano V, Chirgadze YN, Klomsiri C, Chirgadze NY. 2011. Crystal structure of alkyl hydroperoxidase D like protein PA0269 from Pseudomonas aeruginosa: homology of the AhpD-like structural family. *BMC Struct. Biol*. 11, 27.
- Clinical and Laboratory Standards Institute https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf
- Coguet L, Obry A, Borghol N, Hardouin J, Mora L, Othmane A, Jouenne T. 2017.
- Impact of chlorhexidine digluconate and temperature on curli production in Echerechia coli : consequence on its adhesion ability. AIMS Microbiology 3(4): 915-37.
- Costerton J.W, Stewart P.S. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284, pp 1318-1322.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng K.J. 1978. How bacteria stick. Sci. Am. 238, pp 86-95.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber D R, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. Annual Rev in Microbiol. 49(1), pp 711-745.
- Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. Inter J Antimicrobial Agents. 11, pp 217-721. 6

- Costerton JW. 2004. A short history of the development of the biofilm concept. Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors.Microbial biofilms. ASM Press. 69.

D

- De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 60:4339–4344.
- Delavat, F, Miyazaki, R, Carraro, N. 2017. The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 512–537.
- Delihas N.2011. Impact of small repeat sequences on bacterial genome evolution.*Genome Biol. Evol.* 3, 959–973.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiological Reviews. 15, pp 167-193
- Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8 (9), pp 881-890.
- Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. 2008. Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 61:1053–1056.
- Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM , Piddock LJV, Luisi BF.2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol*. 16, 523–539.
- Dumas C. 2007. Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. pp 306.
- Espinasse F, Page B, Cottard-Boulle B. 2010. Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. Rev Francophone des Laboratoires. pp 51-63.
- EUCAST,https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Reading_guide_BMD_v_4.0_.pdf

F

- FAROULT, B. : Les mammites subcliniques et les mammites cliniques aiguées. Maladies des bovins 3eme éditions France Agricole 2000, 64-75 p
- Fernandes JBC, Zanardo LG, Galvão NN .2011.Escherichia coli from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. J Vet Diagn Investigat;23:1146-52.
- Filloux A, Vallet I. 2003. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, Med/Sci. 19, pp 77-83.
- Furi L, Haigh R, Al Jabri ZJH.2016. Dissemination of novel antimicrobial resistance mechanisms through the insertion sequence mediated spread of metabolic genes. *Front. Microbiol.* 7.

G

- Garret TR. 2008. Bacterial adhésion and biofilm on surface. Sci direct
- Gianneechini R, Concha C, Rivero R. 2002. Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Vet Scand **43,** 221.
- Gordon M, 1985**.** Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue b Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. Journal of Clinical Microbiology, 20 (6): 996-1006.
- Habimana O, Steenkeste K, Fontaine-Aupart MP, BellonFontaine MN, Kulakauskas S, Briandet R. 2011. Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* 77:367–368.

H

- Hamadi F, Latrache H, El Ghmari A, Ellouali M, Mabrrouki M, Kouider N. 2004. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Annals of Microbiology. 54, pp 213-225.
- Hamidia M, Hall R.2018. The AbaR antibiotic resistance islands found inAcinetobacter baumannii global clone 1 - Structure, origin and evolution. *Drug Resist. Updat.* 41, 26–Hanzen Ch,(2008).Physiologie de la glande

mammaire et dutrayon de la vache laitière, faculté de médcine vétérinaire,p 6-7-9-10.

- Henrici AT. 1933. Studies of Freshwater Bacteria: A Direct Microscopic Technique
- Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song Z J, Moser C, Jensen P. and Bjarnsholt. T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. Intern J of Oral Sci. 3(2), pp 55-65.
- hse.ie https://www.hse.ie/eng/about/who/healthwellbeing/our-priority-programmes/hcai/hcai-amr-information-for-patients-and-public/patient-leaflets/translated-patient-leaflets/quest-ce-que-les-blse-esbl.pdf
- Husain F.M, Ahmad .I, Shahnawaz Khan .M, Al-Shabib N.A. 2015. L'extrait de Trigonella foenum-graceum (graine) interfère avec les traits régulés par Quorum Sensing et la formation de biofilm dans les souches de Pseudomonas aeruginosa et Aeromonas hydrophila.
- Husain FM, Ahmad I, Asif M, Tahseen Q. 2013. Influence de l'huile de girofle sur certaines fonctions régulées par quorum-sensing et biofilm de Pseudomonas aeruginosa et Aeromonas hydrophila. J Biosci .38. pp 835-844
- Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Ahmad E, Tahseen Q, Khan MS, Alshabib NA. 2015. Les sous-CMI de l'huile essentielle de Mentha piperita et du menthol inhibent la détection de quorum médiée par AHL et le biofilm des bactéries Gramnégatives . Front Microbiol. 6, pp 420.

I.....

- Irie Y, Parsek MR. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322, pp 67- 84.
- Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S.2009. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms. Appl Environ Microbiol. 2009 Jun;75(12):4093-100.
- Jeyasekaran G. 2000. A Report on Diagnostics in Fish Diseases. Geelong Australia: Australian Animal Health Laboratory Commonwealth Scientific and Industrial Res Org. pp 42.

J

- Johnson CM, Grossman AD. 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): what they do and how they work. *Annu. Rev. Genet*. 49, 577–601.
- Julie –Hélène Fairbrother,(2014) Mammite Bovine A Escherichia Coli ; Identification et caractérisation de la persistance, mémoire présenté à la faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de maitre, es sciences vétérinaires , université de Montréal, p 6-7-8

K

- Kalmus P, Viltrop A, Aasmäe B. 2006. Occurrence of clinical mastitis in primiparous Estonian dairy cows in different housing conditions. Acta Vet Scand **48,** 21 .
- Kaplan JB. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. J Dent Res. 89, pp 205-218
- Kim M, Weigand MR, Oh S. 2018. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol*. 84, 7–19.

L

- Lambert RJW, Johnston MD. 2001. The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematical model. *J Appl Microbiol* 91:548–555.
- Langsrud S, Sidhu MS, Heir E, Holck AL. 2003. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *Int Biodeterior Biodegr* 51:283–290.
- Laurent F. 2011. Biofilm bacterien. Université de Médecine de Lyon.
- Lebeaux D, Ghigo J. 2012. Management of biofilm-associated infections: What can we expect from recent research on biofilm lifestyles. Med sci. 28, pp 8-9. pp 727-73
- les mammites j'anticipe ; https://les-mammites-j-anticipe.com/informations/qu-est-ce-qu-une-mammite

M.....

- Machado I, Coquet L , Jouenne. T, Pereira M.O. 2013. Proteomic approach to Pseudomonas aeruginosa adaptive resistance to benzalkonium chloride. *J. Proteomics*. 89, 273–279.
- Mah MS1 , Kenneth E. Mah MD, Eric J, Kezirian MD, William C. Dement MD .2011.
- Maher M.M., Jordan K.N., Upton M.E., Coffey A. 2001. Growth and survival ofE. coli O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. Journal of Applied Microbiology, 90: 201-207.
- Mangalappalli-Illathu AK, Korber DR. 2006. Adaptive resistance and differential protein expression of Salmonella enterica serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3588–3596.
- Mangalappalli-Illathu AK, Vidovic S, Korber DR. 2008. Differential adaptive response and survival of Salmonella enterica serovar Enteritidis planktonic and biofilm cellsexposed to benzalkonium chloride. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3669–3680.
- Marquez LF, Burgos JG, Aguayo CL, Pulido RP, Alvez A, Lucas R.2017.Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. Food Microbiology 62 .77-81.
- Marquez LF, Burgos JG, Aguayo CL., Pulido RP, Galvez A, Lucas R.2017. Characterization of biocide-toleranct bacteria isolated from cheese and dairy small medium enterprises. Food Microb. 62, 77-81..
- Martinez E, Marquez C, Ingold. A.2012. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2169–2172.
- Martinez LR, Casadevall A. 2007. Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Appl and Env Microb. pp 4592- 4601.
- Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra .W.2006.Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J Vet Med B .a;53:326-32.

- Mion S, Rémy B, Plener L, ÉChabrière, Daudé D. 2019. Quorum sensing et quorum Quenching Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence. méd/sci. 35, pp 31-8.
- Mogha K V, Shah N P, Prajapati JB, Chaudhari AR. 2014. Biofilm a threat to dairy industry. Indian J. Dairy Sci.
- Morrissey I,Oggioni MR,Knight D ,Curiao T,Coque T,Kalkanci A, Martinez JL.2014.Evaluation of epidemiological cut-off vallues indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms.PLos one , e86669.
- Murugesan SD, Ramar T, Periasamy S, Sridhar A, Srinivasan S, Ramasamy T. 2018. Effet combiné d'une rutine flavonoïde naturelle de Citrus sinensis et d'un antibiotique conventionnel gentamicine sur la formation de biofilm de Pseudomonas aeruginosa.

N

- Nguyen KT, Piastro K, Gray. TA Derbyshire KM. 2010. Mycobacterial biofilms facilitate horizontal DNA transfer between strains of Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* 192:5134–5142.
- Nobbs A, Lamount RJ, Jenkinson H. 2009. Streptococcus adherence and colonization. Microb and Mole Bio Rev. 73(3), pp 407-505.
- Nontaleerak B, Duang-Nkern J, Wongsaroj L, Trinachartvanit W, Mongkolsuk. S.2020. Roles of the AhpD-family protein RcsA in reactive chlorine stress resistance and virulence in Pseudomonas aeruginosa. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e01480.
- Nostro. A, Roccaro A.S, Bisignano .G, Marino. A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F., Blanco AR. 2007. Effets de l'origan, du carvacrol et du thymol sur les biofilms de Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis. J. Med. Microbiol. 56, pp 519-523. 175. Novick R.P., Geisinger E. 2008. Quorum sensing in Staphylococci. Annu Rev Genet. 42, pp 541-564.

O

- Oliver SP, Pighetti GM, Almeida RA. 2011 .Mastitis pathogens: Environmental pathogens J.W. Fuquay (Ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd ed.), Academic Press (2011), pp. 415-421
- Ouyang J, Sun F, Feng W, Sun Y, Qiu X, Xiong L, Liu Y, Chen Y. 2016. La quercétine est un inhibiteur efficace de la détection de quorum, de la formation de biofilm et des facteurs de virulence chez Pseudomonas aeruginosa. J. Appl Microbiol. 120, pp 966–74.

P

- Palmer A, Chait R, Kishony R, 2018. Nonoptimal gene expression creates latent potential for antibiotic resistance. *Mol. Biol. Evol. 35,* 2669–2684.
- Paquin JL, Block JC, Haudidier K, Hartemann P, Colin F, Miazga J, Levi Y. 1992. Effet du chlore sur la colonisation bactérienne d'un réseau expérimental de distribution d'eau. J. Water Sci. 5(3), pp 399-414.
- Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev*. 31, 1–61.
- Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, Skinderso ME, Givskov M, Nielsen J. 2005. Conception et synthèse rationnelles de nouveaux inhibiteurs de détection de quorum dérivés d'homosérine lactones acylées et de produits naturels à base d'ail. Org Biomol Chem. 3, pp 253–62.
- Philips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. 2011. Biofilms made easy. 1(3), pp 1-
- Podder MP, Rogers L, Daley PK, Keefe GP, Whitney HG, Tahlan K.2014. Klebsiella species associated with bovine mastitis in Newfoundland. PLoS One.;9(9):e106518. Published 2014 Sep 2. doi:10.1371/journal.pone.0106518
- Poole K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann. Med.39, 162e176.
- Poutrel. B.1985.Généralités sur les mammites de la vache laitière,Recueil de médcine vétérinaire.161(6-7) :497-511.

R.....

- Rasamiravak T, Vandeputte OM, Pottier L, Huet J, Rabemanantsoa C, Kiendrebeogo M, Andriantsimahavandy A, Rasamindrakotroka A, Stévigny C, Duez P, El Jaziri M. 2015. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation et persistance, ainsi que la production de quorum sensing facteurs de virulence dépendants, sont perturbés par un ester coumarate triterpénoïde isolé de Dalbergia trichocarpa , une légumineuse tropicale . PLoS One. pp 10.
- Revue médicale suisse **https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2009/revue-medicale-suisse-220/que-signifie-betalactamases-a-spectre-elargi-en-pratique**
- Rodgers N,Murdaugh A.2016.Chlorhexidine-induced elastic and adhesive changes of Escerichia Coli cells zithin a biofilm .Biointerphases 11:031011.
- Roux A, Ghigo J. 2006. Bacterial biofilms, Académie-veterinaire- de France. 159(3), pp 261-268.
- Rowen D. Frandson, W. Lee Wilke, Anna Dee Fails Wiley-Blackwell.June 2009. Anatomy and Physiology of Farm Animals 7th Edition.

S.....

- Sebastian Am,Christopher Th,Rex Mi , Glnn Ti.2022. Antimicrobial Chemotherapy https://books.google.dz/books?id=8vPxoTh6U44C&pg=PA25&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- SeriesF,Seegers H.l'intervention du vétérinaire face à un problème de mammites :2-Adapther les méthodes à l'évolution de l'épidémiologie. journées Nationales des G.T.V .26 au 28mai 2004.147-156.
- SERIEYS F. 1995. Le point sur les mammites des vaches laitières. ITEB, Paris : 65 p

Spormann AM. 2008. Physiology of microbes in biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322, pp 17- 36.

Squinazi F. 2013. Biofilm & Matériaux : des réseaux intérieurs de distribution de l'eau. pp 4-10.

- Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6ème Edition, version ;2011,pp 162-163.

- Stepanovic , Vukovic D, Dakic I, Savic BS, Vabic-Vlahovi M. 2000**.** Amodified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.Journal of Microbiological Methods. 40: 175-179.

Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135–138.

- Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol . 2(2), pp 95-108

T

- Tendolkar , , Arto S. Baghdayan, Michael S. Gilmore, Nathan Shankar.2004. https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/IAI.72.10.6032-6039.2004

Todd BR, Gerald RF. 2001. Bakers‘ Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. Sci. 291(5505), pp 878 – 88

- Tong C, Hu H, Chen G, Li Z, Li A, Zhang J.2021. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. Environ Res.
- Tremblay YD, Hathroubi S, Jacques M. 2014. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. Canadian J. Vet Res. 78(2), pp 110-116.
- Trembley DNJ, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. 2015. High-Throughput Microfluidic Method To Study Biofilm formation and host-pathogen interactios in pathogenic Eschirichia coli. American Society For Microb.

V

- Van Houdt R, Michiels C. 2005. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. Res Microb.156, pp 626-633.
- Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, VanHoudt R. 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol*. 43, 709–730.

W

- Wassenaar T, Ussery D, Nielsen L, Ingmer H. 2015. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in Staphylococcus species. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5, 44–61.
- WEISEN JP .1947. La stratégie de la lutte anti-mammite. La prophylaxie des mammites. Ed. Vigot Frère, Paris, 43-79 p.

Z

- Zhou Q, Tang M, Zhang J.2017. Is the potential Interconnection between antibiotic susceptibility and disinfectant resistance a threat to food safety. *Agric. Sci. Technol*. 18, 1033–1037.
- Zobell CE. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. 46, pp

ANNEXES

. Appareillage :

Les appareils et les milieux de culture utilisés :

Appareillage	**Petit matériel**
•autoclave (MEMMERT) • Bain marie (MEMMERT) • Balance de précision à **KERN ALS 220-4N** • Balance (Denever instrument) • Etuve bactériologique 37°C (MAMMERT) • Agitateur magnétique chauffant (SELECTA) • Vortex • Réfrigérateur à 4C° • Congélateur •lecteur 96 **(Safas monaco)** •incubateur (MEMMERT) •densitmétre	• Bec bunsen • Microplaques • Micropipettes (200µl 1000µl 10µl) • Tubes à essai stériles; • Portoirs pour tubes • Anse de platine • les eppendorf 1,5 ml; 2ml, • Boites de Pétrie en plastique • Ecouvillons; • pince • Embous Jaunes , bleus et blanc • Flacons de 200 ml stérile; • Spatule; • Barreaux magnétiques; • Erlens meyers; • Eprouvettes • Entonnoirs; • Béchers;

Les Appareils et les matériel utilisés.

ANNEXE 2

. Différents milieux, réactifs et solutions utilisés :

Milieux	Réactifs
Milieux solides	
• Gélose nutitive	• Glycérol (80%);
• Gélose Mueller Hinton	• Disques d'antibiotiques en cartouche
• gélose hektoren	• Eau physiologique (0,9 %);
	• Eau distillée;;
Milieux liquides	• HCl
• BHIB (bouillon heart iron bread)	• NaOH
• TSB	• Acide péracitique 5%
•TSB glucosé	• polyvidone idée 10%
	• Cristal violet
	• Ethanol 96%
	• Tampon PBS
	• chlorhexidine

Milieux, réactifs et colorants utilisés.